

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE MUCINA
CITOPLASMÁTICA UTILIZANDO LA LECTINA DE *Salvia bogotensis***

**TESIS DE MAESTRIA
REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN CIENCIAS
-BIOQUÍMICA.**

JOSE CAMILO TORRES ROMERO

**DIRECTOR
PROFESOR GERARDO PEREZ**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

2010

**TÍTULO: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE MUCINA
CITOPLASMÁTICA UTILIZANDO LA LECTINA DE *Salvia bogotensis***

**TITLE: PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CITOPLASMATIC
MUCIN USING the *Salvia bogotensis* LECTIN**

RESUMEN:

Las mucinas son un grupo de glicoproteínas altamente O-glicosiladas, utilizadas como biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades como fibrosis quística y cáncer. Para identificarlas se han utilizado Lectinas, capaces de reconocer específicamente glicoconjugados. El objetivo del presente trabajo fue purificar parcialmente proteínas citoplasmáticas ricas en antígeno Tn de las líneas celulares MCF-7 y HeLa empleando la lectina de *Salvia bogotensis* (LSBo).

Para realizar el aislamiento de la mucina se usó cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B, el acople de la lectina sobre el soporte se realizó siguiendo el protocolo de Hermanson. Se sembraron extractos citoplasmáticos derivados de las líneas celulares, posteriormente se eluyó la fracción retenida con gradiente discontinuo de pH (2,5-11,4). Se obtuvieron tres picos de proteína a los cuales se les realizó electroforesis en SDS. Se observó la presencia de una banda predominante de aproximadamente 65 kDa en todas las fracciones eluidas indicando así la posible presencia de la misma proteína en las fracciones retenidas y también diferentes afinidades hacia la Lectina. Se evaluó mediante western blot el reconocimiento por parte de diferentes anticuerpos policlonales y se encontró que la proteína aislada es de tipo mucina, seguidamente se procedió a evaluar su estructura glicosídica mediante la utilización de algunas lectinas. Para evaluar la pureza de la banda aislada se procedió a realizar electroforesis bidimensional encontrando proteínas con pesos moleculares muy similares pero con puntos isoeléctricos ácidos diferentes.

Los resultados muestran la existencia de una proteína citoplasmática con diferentes afinidades hacia LSBo tanto en HeLa como en MCF-7.

ABSTRACT:

Mucins are a group of high molecular weight glycoproteins highly O-glycosylated, used as biomarkers for diagnosis of diseases such as cystic fibrosis and cancer. Lectins are proteins that have been used to identify specific glycoconjugates. The aim of this work was to purify partially a cytoplasmic protein rich in Tn antigen from cell lines MCF-7 and HeLa using affinity chromatography with *Salvia bogotensis* lectin (SBoL).

To isolate the mucin we used affinity chromatography on SBoL-Sepharose 4B. Cytoplasmic extracts from HeLa and MCF-7 cell lines were eluted with discontinuous gradient of pH (2.5 to 11.4). We obtained three peaks in retained fraction and were evaluated with SDS-PAGE. The results showed the presence of a predominant band of approximately 65 kDA in retained fraction, indicating the possible presence of the same protein in them and different affinities toward the lectin. The protein was tested by Western blot using different polyclonal antibodies and we found that protein is mucin-like. After that we tested its glycosidic structure using some lectins. To assess the purity of the isolated band was performed with bidimensional electrophoresis and found some spots with a very similar molecular weight but different isoelectric points.

The results showed the existence of a cytoplasmic protein in HeLa and MCF-7 cell lines with different affinities to LSBo

PALABRAS CLAVE:

Biomarcadores, Mucinas, Antígeno Tn, Lectinas

KEYWORDS:

Biomarker, Mucins, Tn antigen, lectins.

INDICE

	Pag
INTRODUCCIÓN	2
1. HIPOTESIS	3
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. MARCO TEORICO	4
3.1. Labiadas	4
3.1.1. Descripción botánica	4
3.1.2. Distribución y Hábitat	4
3.1.3. <i>Salvia bogotensis</i>	7
3.2. Lectinas	8
3.2.1 Lectinas de Labiadas	9
3.3. Mucinas	12
3.3.1. Estructura de las Mucinas	13
3.3.2. Estructura y biosíntesis de los antígenos de O-glicosilación simple.....	16
3.4. O-glicosilación incompleta y cáncer.....	17
3.5. Significado biológico de la glicosilación	22
4. MATERIALES Y METODOS.....	23
4.1. Aislamiento de la Lectina	23
4.1.1. Extracción de la Lectina	23
4.1.2. Tratamiento con Pectinex.....	23
4.1.3. Cromatografía intercambio Iónico.....	23
4.1.4. Cromatografía de afinidad.....	24
4.1.5. Pruebas de hemoaglutinación	24
4.1.6. Cuantificación de proteína.....	25
4.2. Aislamiento de la mucina citoplasmática.....	25
4.2.1. Fraccionamiento Subcelular de Proteínas.....	25
4.2.2. Cromatografía de afinidad sobre LSBo-Sepharosa 4B.....	25
4.2.3. DOT-BLOT	26
4.2.4. Marcación de la lectina.....	26
4.3. Caracterización parcial de la mucina citoplasmática.....	27
4.3.1. Western blot	27
4.3.2. Determinación Peso Molecular	27
4.3.3. Determinación de la Interacción entre LSBo y mucina Citoplasmática.....	27
4.3.4. Determinación del punto isoeléctrico	27
4.3.5. Electroforesis Bidimensional.....	27
5. RESULTADOS Y DISCUSION.....	28
5.1. Aislamiento de la lectina de <i>Salvia bogotensis</i>	28
5.2. Aislamiento de la mucina citoplasmática	39
5.3. Caracterización parcial de mucina citoplasmática.....	48
6. CONCLUSIONES	58
7. PERSPECTIVAS	59
8. BIBLIOGRAFIA	61

INDICE DE FIGURAS

	Pag
1. Planta de <i>Salvia bogotensis</i>	7
2. Estructura de mucinas membranales.....	14
3. Estructura de mucinas poliméricas	15
4. Antígeno Tn	17
5. Biosíntesis básica de los N y O-glicanos	18
6. Comparación estructural de dos antígenos tumorales	19
7. Biosíntesis de los <i>cores</i> que generan los antígenos tumorales	20
8. Procedimiento para la extracción y purificación de la lectina de <i>Salvia</i>	22
9. Metodología para el aislamiento de las proteínas ricas en antígeno Tn. .	25
10. Perfil cromatográfico de una cromatografía de intercambio aniónico	31
11. SDS-PAGE de cada una de las etapas de purificación	32
12. Cromatografía de afinidad sobre (aMSB)-Sephariosa 4B	33
13. Cromatografía de afinidad LSBo- Invertasa-Sephariosa 4B	36
14. SDS-PAGE de lectina no retenida en soporte Invertasa Sephariosa 4B. .	37
15. SDS-PAGE de lectina no retenida en soporte Invertasa Sephariosa 4B.....	38
16. SDS-PAGE de fracciones citoplasmáticas de HeLa y MCF-7	40
17. Detección de proteínas portadoras de Antígeno Tn	40
18. Detección de Acido Sialico, N-acetilglucosamina y antígeno Tn.	41
19. Cromatografía afinidad sobre LSBo sephariosa 4B	42
20. Electroforesis sobre fracciones de cromatografía afinidad sobre (LSBo) ...	44
21. DOT BLOT realizado con fracciones citoplasmáticas de HeLa y MCF-7...	45
22. ELLSA de fracciones sobre Proteinas tipo Mucina con VvB4	46
23. ELLSA de fracciones sobre proteínas tipo con LSBo	46
24. Westernblot sobre Proteina tipo Mucina de HeLa	47
25. Westernblot sobre Proteina tipo Mucina de MCF-7	47
26. PAGE-SDS utilizado para determinar el peso molecular	48
27. Dot Blot para la evluacion del reconocimiento por anticuerpos	49
28. Dot Blot con diferentes lectinas sobre fracción HeLa pH 2,5	51
29. Dot Blot con diferentes lectinas sobre fracción HeLa pH 8,8	51
30. Dot Blot con diferentes lectinas sobre fracción MCF-7 pH 8,8	52
31. Electroforesis utilizada para la determinación de punto isoeléctrico.....	54
32. Electroforesis bidimensional de fracción homogenizada de MCF-7	55
33. Electroforesis Bidimensional de fracción citoplasmática de HeLa pH 2,5....	56
34. Electroforesis Bidimensional de fracción citoplasmática de MCF-7 pH 8,8	57

INDICE DE TABLAS

	Pag
1. Diversidad de géneros de Labiatae en Colombia	6
2. Taxonomía salvia bogotensis	8
3. Obtención de los extractos de <i>Salvia bogotensis</i>	28
4. Actividad de fracciones no retenidas en intercambio iónico	30
5. Porcentajes de acoplamiento de aMSB a la Sepharosa 4 B	31
6. Actividades obtenidas en cromatografía de afinidad	34
7. Fracciones citoplasmáticas obtenidas por ultracentrifugación	39
8. % de acoplamiento de LSBo-Sepharosa 4B	41
9. Cantidad de proteína acoplada en tercer soporte	43
10. Separación de Glicoproteínas citoplasmáticas	43
11. Lectinas con las que se evaluaron proteínas aisladas.....	50
12. Patrón de sembrado de las fracciones citoplasmáticas en Dot Blod	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AHL	Lectina de <i>Amarantus hypocondriacus</i>
aMSB	asialo Mucina Submaxilar Bovina
BCA	Acido Bicinconínico
BSA	Albumina Sérica Bovina
DAB	Diaminobenzamidina
DEAE	Dimetil Amino Etilo
DLL-P2	<i>Dioclea lehmanni</i> II
EGF	Factor epidermal de crecimiento
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent assay
ELLSA	Enzyme-linked Lectinosorbent assay
Fuc Ts	Fucosil transferasas
GAL	Lectina de <i>Galactia lindenni</i>
GPA _N	Glicoforina A
GTs	Glicosiltransferasas
LDN	GalNAc α 1-4GlcNAc
LSBo	Lectina de <i>Salvia bogotensis</i>
MAL	<i>Maackia amurensis</i>
Me Man	Metil manosido
NIDO	Secuencia homóloga Nidogen
NR	Fracción No Retenida
PAA	PAA
PBS	Buffer Fosfato Salino
ppGalNAc-Ts	N-acetilgalactosaminiltransferasas
RER	Retículo Endoplásmico Rugoso
SEA	Modulo de Esperma, enteroquinasas y agrinas
Sia	Ácido siálico
SLa	Sialil lewis A
SLx	Sialil-Lewis X
SLY	Sialil Lewis Y
STn	Sialil-Tn
STs	Sialil transferasas
TAAS	Antigenos Asociados a Tumor
TBS	Tris Buffer Salino
VNTR	Dominio Mucínico
VvB4	Isolectina B4 de <i>Vicia villosa</i>
VWD	Factor Von Willebrand
WGA	<i>Triticum aestivum</i>

INTRODUCCIÓN

Las mucinas son un grupo de glicoproteínas de muy alto peso molecular ricas en O-glicosilación presentes en células epiteliales y asociadas con procesos de protección a factores ambientales. Se caracterizan por poseer variaciones en el número de repeticiones en tándem de secuencias ricas en serina, treonina y prolina; por su amplio polimorfismo se evidencia gran variedad de presentaciones de las repeticiones. Se pueden expresar de manera intermembranal o secretada dependiendo de la presencia o ausencia de un dominio intermembranal en la secuencia peptídica (Gendler y Hattrup, 2007). Su distribución y niveles de glicosilación han sido útiles como biomarcadores para diagnosticar enfermedades como fibrosis quística, asma y cáncer, expresando en este último gran cantidad de antígeno Tn. (Brockhausen, 1999).

La transformación maligna que ocurre en células cancerígenas conlleva a la mutación estructural y funcional de glicosiltransferasas asociadas con la O-glicosilación de proteínas, de tal manera que la elongación que se da en el aparato de Golgi a partir de N-acetilgalactosamina no se da; y por lo tanto este antígeno, que usualmente debe estar enmascarado, queda expuesto.

La expresión del antígeno Tn se asocia entonces con la transformación maligna de células, sirviendo así como indicador de células cancerígenas. Para utilizar esta fuente importante de información, se han utilizado un grupo de proteínas o glico proteínas llamadas Lectinas, capaces de identificar de una manera específica y con altos niveles de afinidad glicoconjugados. (Peumans y Van Damme, 1995)

Dentro de las lectinas estudiadas se han reportado gran variedad de ellas aisladas de las Labiadas, con capacidad de reconocer el antígeno Tn, especialmente las pertenecientes al género *Salvia*. En este trabajo se utilizaron los avances realizados por el grupo de investigación de proteínas (GRIP) de la Universidad Nacional de Colombia en sus estudios sobre lectina de *Salvia bogotensis* y su capacidad de reconocer antígeno Tn (Vega y Pérez, 2006), como herramienta para identificar y aislar mucinas citoplasmáticas que según evidencia preliminar (Vega, 2004) podrían encontrarse en fracciones citoplasmáticas de líneas celulares MCF-7 y HeLa.

1. HIPÓTESIS

La Lectina de *Salvia bogotensis* interactúa con el antígeno Tn de glicoproteínas citoplasmáticas derivadas de líneas celulares MCF- 7 y HeLa; y podría ser utilizada para el aislamiento de estas proteínas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Purificar y caracterizar parcialmente a partir de la utilización de Lectina aislada de *Salvia bogotensis*, mucinas citoplasmáticas ricas en antígeno Tn.

2.2. Objetivos específicos

- Aislar mediante cromatografía de intercambio iónico y de afinidad Lectina de *Salvia bogotensis*.
- Identificar mucinas citoplasmáticas utilizando Lectina de *Salvia bogotensis*.
- Caracterizar la mucina purificada en cuanto a peso molecular, punto isoeléctrico, porcentaje de glicosilación e interacciones con la lectina.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Labiadas

3.1.1. Descripción Botánica

La familia de las Labiadas, en la que se encuentran categorizadas plantas como la menta, el mastranto y la salvia, es conocida botánicamente con los nombres de Labiatae (por la presencia de labios en sus flores) o Lamiaceae (por el nombre del género tipo de la familia, *Lamium*). En la familia se caracterizan plantas aromáticas constituidas principalmente por hierbas o arbustos (rara vez árboles como en *Hyptidendron* o *Lepechinia*), provistas en todas sus partes de glándulas secretoras de aceites esenciales volátiles (que son muy variados en esta familia). Los tallos son usualmente cuadrangulares y las hojas siempre opuestas; las inflorescencias son terminales o laterales, de aspecto racemoso (espigas o panículas), constituidas por agrupaciones de flores de tipo cimoso, que se ubican en cada par de brácteas. Las flores presentan cáliz bilabiado o regular de cinco piezas parcialmente soldadas, que a veces crece rodeando el fruto, y la corola tiene los pétalos unidos, simetría dorsiventral, con una parte cilíndrica (tubo) y otra rasgada que consta de cinco lóbulos parcialmente soldados y orientados formando dos labios; el superior frecuentemente recto y en forma de casco (gálea), suele proteger a los estambres y el inferior trilobado y más extendido, sirve como plataforma a los insectos en el proceso de polinización. Los estambres son siempre menos de cinco, generalmente cuatro (dos pares) o a veces sólo dos, como ocurre en *Salvia* y en *Rosmarinus*. El ovario, que es súpero y de dos carpelos, desarrolla un nuevo tabique transversal asociado a la presencia de un estilo ginobásico (que se conecta al ovario por su base), dando lugar a un fruto característico de cuatro nueces libres (tetranúcula). Este es uno de los caracteres más distintivos de esta familia, que la diferencia de otras cercanas, como las verbenáceas, acantáceas o escrofulariáceas. (Fernández-Alonso y Rivera-D, 2006)

3.1.2. Distribución y Hábitat

La familia Labiatae está compuesta aproximadamente de 224 géneros y 5600 especies en todo el mundo. En Colombia se ve representada por 23 géneros y 284 taxones (especies y subespecies) (Wagstaff y Olmdtead, 1997) de los cuales 186 son nativos y sólo una pequeña parte (17 especies) son plantas foráneas, que en la actualidad se encuentran naturalizadas formando parte integrante de la flora colombiana (Tabla 1) (Fernández-Alonso y Rivera-D, 2006). Hay además, otras 21 especies de labiadas exóticas, ampliamente cultivadas en Colombia por sus variados usos (condimento, medicinal, mágico-religioso, ornamental). Nueve géneros que pertenecían a la familia "Verbenaceae" son ahora identificados como

Labiatae, y en total aportan 79 especies nativas. Con respecto a las grandes divisiones dentro de la familia Labiatae, en Colombia tenemos representantes de cuatro subfamilias y tres tribus, siendo la subfamilia Nepetoideae y las tribus Ocimeae y Mentheae, las que poseen mayor número de géneros nativos en Colombia (Tabla 1). La diversidad de labiadas en Colombia puede considerarse equivalente a la registrada en Perú, con 20 géneros y 190 especies o en Ecuador con 21 géneros y 135 especies (Brako y Zarucchi, 1993), (Jorgensen y León-Yañez, 1999). Pero esta diversidad es notablemente inferior a la de México, cuyo territorio cuenta con 27 géneros y 520 especies nativas (Ramamoorthy y Elliot, 1993). Los géneros más diversos en Colombia son *Salvia* con 83 taxones e *Hyptis* con 42, ambos son, a su vez, los más diversos de la familia en territorio Americano. Le siguen en importancia otros cuatro géneros: *Scutellaria* (22 especies), *Satureja* (14 especies), *Stachys* (13 especies) y *Lepechinia* (10 especies). En tiempos recientes se adelantaron algunas contribuciones o revisiones parciales en esta familia para Colombia, de donde resultaron nuevas especies y combinaciones en los géneros *Hyptis*, *Lepechinia*, *Salvia*, *Satureja* y *Scutellaria* (Fernández-Alonso y Rivera-D, 2006)

Subfamilia	Tribu	Género	No. taxones Mundo	No. taxones-Colombia	Nativos	Naturalizados	Cultivados
Lamioideae		<i>Lamium</i> *	40	2	0	1	1
		<i>Leonorus</i> *	10	1	0	1	
		<i>Leonotis</i> *	15	2	0	1	1
		<i>Marrubium</i> *	30	1	0	1	0
		<i>Stachys</i>	300	13	11	1	1
Nepetoideae	Menthaea	<i>Lepechinia</i>	30	10	10	0	0
		<i>Melissa</i> *	3	1	0	0	1
		<i>Mentha</i> *	25	4	0	2	2
		<i>Mintostachys</i>	12	3	3	0	0
		<i>Obtegoeria</i>	1	1	1	0	0
		<i>Origanum</i> *	36	2	0	0	2
		<i>Rosmarinus</i> *	2	1	0	0	1
		<i>Salvia</i>	922	83	78	3	2
		<i>Satureja</i>	180	14	13	0	1
		<i>Thymus</i> *	350	1	0	0	1
	Ocimeae	<i>Catoferia</i>	4	1	1	0	0
		<i>Eriope</i>	28	1	1	0	0
		<i>Hyptidendrum</i>	16	1	1	0	0
		<i>Hyptis</i>	300	42	42	0	0
		<i>Marsypianthes</i>	5	1	1	0	0
		<i>Ocimum</i>	150	7	1	3	3
		<i>Plectranthus</i> *	210	6	0	3	3
	Prunelleae	<i>Prunella</i> *	7	1	0	1	0
Teucroideae		<i>Ajuga</i> *	40	1	0	0	1
		<i>Teucrium</i>	100	2	1	0	1
Scutellarioideae		<i>Scutellaria</i>	300	22	22	0	0
TOTAL			3116	224	186	17	21

Tabla 1. Diversidad de géneros de Labiatae en Colombia, con información sobre taxones (especies y subespecies) nativos, naturalizados y cultivados (adaptado y actualizado de Fernández-Alonso *et al.* 2003). Con asterisco se señalan los géneros no nativos de Colombia (según Fernández-Alonso y Rivera-Díaz. 2006)

3.1.3. *Salvia bogotensis*



Figura 1. Planta de *Salvia bogotensis*, tomada de <http://www.siac.net.co>

La *Salvia bogotensis* (taxonomía tabla 2) es una planta de pequeño o mediano porte, rara vez superando el metro de altura. Las hojas son típicamente estrechas y buladas por el haz. Las inflorescencias son moderadamente cortas y las flores con una corola de color azul intenso (Figura 1) (Fernández-Alonso y Rivera-Díaz, 2006). Conocida también como Almoraduz en Cundinamarca, Escobillo, Salvia o Valero en Boyacá, este arbusto, abarca una amplia serie de enclaves áridos o semiáridos en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca, desde el Sur de la Sabana de Bogotá (Mosquera), hasta la región de Chita y Cocuy en Boyacá, donde asciende a mayor altitud, presentando formas con indumento foliar más denso en ambas caras. Los enclaves intermedios donde también se encuentra esta especie son: la región de Samacá y Tunja-Cucaita, el sector Tibasosa- Paz

del Río, Santa Rosa-Floresta y región del lago de Tota” (Fernández-Alonso y Rivera-Díaz, 2006). Su taxonomía se resume en la tabla 2.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Salvia</i>
Especie	<i>Salvia bogotensis</i>

Tabla 2. Resumen las particularidades taxonómicas de *Salvia bogotensis* (Fernández, 2003).

3.2. Lectinas

El inicio del estudio de las lectinas se originó con los trabajos realizados por Stillmark en 1888 cuando descubrió el fenómeno de aglutinación de los eritrocitos mediado por extractos de semillas de castor (*Ricinus communis*). Esta proteína fue posteriormente denominada Ricina (Sharon y Lis, 1972). Más tarde, Hellin descubrió que el extracto tóxico de semillas de *Abrus precatorius* también producía hemoaglutinación y la proteína responsable fue denominada Abrina.

La primera lectina que fue obtenida en forma cristalina fue aislada de *Canavalia ensiformis* y se le llamó concaivalina A en 1919. (Sharon y Lis, 1972).

Los trabajos de Boyd y Shapleigh (1954) abrieron el camino para el estudio de las lectinas al tratar de definir las, pero su interpretación no fue uniforme debido al desconocimiento de sus funciones fisiológicas.

En la actualidad se han usado diferentes formas de definir las pero las más aceptadas comparten los siguientes criterios: las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune, que reconocen específicamente y reversiblemente carbohidratos, con capacidad para aglutinar células y precipitar glicoconjugados. (Goldstein et al, 1980) En las plantas, la mayoría de estas moléculas están presentes en los cotiledones y endospermos de las semillas y constituyen de 2 a 10% del total de proteína de éstas. Se ha propuesto que dentro de la planta, estas proteínas pueden relacionarse con regulación fisiológica, defensa mecánica contra el ataque de microorganismos, almacenamiento de proteínas, transporte de carbohidratos, estimulación mitogénica y reconocimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* (Pusztai, 1991).

La gran importancia de las lectinas se debe fundamentalmente a sus propiedades biológicas como la interacción con grupos sanguíneos específicos, aglutinación de linfocitos, eritrocitos, espermatozoides, plaquetas, bacterias y células tumorales, inducción de la mitosis en el linfocito y efectos citotóxicos sobre los linfocitos (Sharon y Lis, 2004).

Desde 1963 los estudios iniciados por Aub (Pusztai, 1991) describen que las lectinas de plantas pueden distinguir entre células normales y células malignas y que la diferencia está en la superficie celular; en otras palabras, que la alteración de la superficie celular es propiedad de células cancerígenas.

Los glicoconjugados de las superficies celulares son conocidos por su importante desempeño en las interacciones célula-célula, tales como el reconocimiento, la comunicación y adhesión (Gabiús, 2001). Tales interacciones son también importantes en la tumorigénesis, progresión del tumor y metástasis (Gabiús y Gabiús, 1997).

Durante la diferenciación celular y la transformación maligna, la biosíntesis de las cadenas de oligosacáridos de glicoproteínas es frecuentemente alterada y esta alteración puede ser detectada por las lectinas (Fan et al, 2004a). Dentro de los estudios de membrana se ha reportado el uso de lectinas para investigar cambios estructurales en las superficies celulares (Sharon y Lis, 2004); así como la identificación de algunos antígenos propios de células transformadas tal como el Tn (Vega y Pérez, 2006).

3.2.1. Lectinas de Labiadas

El trabajo pionero realizado por Bird y Wingham (1974, 1976, 1982) reveló la presencia de lectinas, principalmente en especies de *Salvia*. Las lectinas de Labiatae pueden reconocer el antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr) que se asocia a una variedad de carcinomas (Springer, 1984) y son por lo tanto potencialmente útiles en la detección del antígeno en células transformadas.

El estudio de las Labiadas ha crecido sustancialmente desde los años 70 cuando aparecieron 570 publicaciones, actualmente la cantidad de artículos publicados supera los 2000 enfocados principalmente hacia el estudio de metabolitos secundarios, mucilagos, cariotipo y morfología comparativa de miembros de la familia Lamiaceae originarios de Eurasia y Norte América. También se han reportado estudios al respecto sobre plantas de la familia originarias de África, América Central y Sur América donde para el año 2000 las publicaciones se acercaban a 27. Actualmente el interés se ha enfocado hacia la diversidad de carbohidratos y de proteínas presentes en ellas, especialmente las lectinas que ya gozan de relevancia debido a la diversidad de funciones que han presentado.

En trabajos realizados desde 1974 se reportan la presencia de aglutininas (lectinas) en extractos salinos de semillas de 5 especies de *Salvia* de 8 ensayadas (*S. horminum*, *S. farinacea*, *S. haematodes*, *S. sclarea turkestanica* y *S. sclarea*) que reconocían el antígeno Tn (α -GalNAc/Ser/Thr), donde el determinante inmunohistoquímico es la N-acetilgalactosamina (Bird y Wingham, 1974). En 1976 se reporta la presencia de aglutininas del tipo T y Tn en 6 nuevas especies de *Salvia* de 13 ensayadas (*S. aethiopsis*, *S. nemorosa*, *S. sclareoides*, *S. taraxacifolia* y *S. verbenaca*) que contienen cantidades variables de la proteína. Posteriormente 9 lectinas más se describen con capacidad Tn-eritroaglutinante (*S. aurea*, *S. candelabrum*, *S. forskohlei*, *S. grandiflora*, *S. japonica*, *S. nilotica*, *S. superba*, *S. transylvanica* y *S. verticilata*) (Bird y Wingham, 1976). En 1982 se detalla el reconocimiento de la lectina de *Salvia lyrata* al factor Tn (Bird y Wingham, 1982). Aunque se ha reportado la presencia de estas proteínas Tn-aglutinantes en el género, no lo ha sido su respectiva purificación; en este sentido, hay que mencionar que todas estas especies pertenecen a los subgéneros *Salvia Benth* y *Sclarea Benth* que predominan en Eurasia y en zonas templadas de Norteamérica siendo las más estudiadas; por el contrario, las especies pertenecientes al subgénero tropical *Calosphace* (Benth) (más de 450) permanecían prácticamente inexploradas en este aspecto. En otros géneros de Labiadas también se han encontrado lectinas de semillas que reaccionan específicamente con el antígeno Tn (*Hyptis* sp. y *Marrubium velutinum*) (Bird y Wingham, 1982).

La primera lectina de Labiadas aislada y caracterizada fue la de *Salvia sclarea* por Piller y colaboradores en el año de 1986 (Piller et al, 1986); quienes reportaron una glicoproteína de 50 kDa que presenta una constante de asociación de $1,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ para eritrocitos Tn, que al parecer no necesita la presencia de cationes divalentes para su actividad eritroaglutinante. Una caracterización más detallada fue realizada por Medeiros y colaboradores (Medeiros et al, 2000), quienes la describieron como una glicoproteína homodimérica de 60 a 61 kDa con sub unidades de 30 a 31 kDa unidas por puentes disulfuro; este grupo estableció la estructura del oligosacárido y la reactividad de la lectina sobre glicopéptidos Tn sintéticos comparándola con algunos anticuerpos monoclonales anti-Tn (Osinaga et al, 2002). La interacción de esta lectina con líneas celulares tumorales y su capacidad de reconocimiento del antígeno Tn en células provenientes de tumores fue descrita por Piller y colaboradores (1990 a). Por otro lado no se ha estudiado la naturaleza de la eventual glicoproteína que pudiera ser reconocida a nivel de la membrana celular de células epiteliales (Vega, 1997). Piller y sus colaboradores delinearon la especificidad de esta lectina y la compararon con 6 lectinas que reconocen residuos de GalNAc y concluyeron que era la más específica hacia residuos de GalNAc-O-(Ser/Thr) (Piller et al, 1990 b) utilizándola en estudios sobre la iniciación de la síntesis de proteínas O-glicosiladas en la línea celular K562 (leucemia) donde aislaron proteínas ricas en antígeno Tn (Piller et al, 1990 a). Por otra parte, esta lectina se ha utilizado en estudios de caracterización de

glicoforinas (Wu et al, 1995 a; Lee et al, 1981) y en aglutinación de eritrocitos de personas que presentan el síndrome Tn (Kamitani et al, 1992). El grupo de Sharon estudió la lectina aislada de las semillas de *Molucella laevis* cuyos resultados han sido resumidos por Lis y Sharon (1994); la proteína presenta rasgos estructurales muy particulares que no se han encontrado en otras lectinas. La proteína nativa tiene un peso molecular de 130 kDa y está formada por tres subunidades, una de 67 kDa (compuesta por dos cadenas de 46 y 28 kDa unidas por puentes disulfuro) y dos subunidades de 42 y 26 kDa. La secuencia N-terminal mostró que las subunidades de 26 y 28 kDa difieren principalmente en dos residuos de cisteína por lo tanto se ha propuesto que la subunidad de 26 kDa es un producto de procesamiento de la de 28 kDa semejante a lo que pasa con otras lectinas (i. e. *Dolichs biflorus*). La especificidad hacia el antígeno Tn fue determinada por ensayo de ELISA (Duk et al, 1992) con varias glicoproteínas. Finalmente se determinó una actividad de aglutinación dual de tipo A+Tn (Duk et al, 1992); la evaluación de la actividad hacia eritrocitos O^{NN} debida a la glicoforina A^{NN} (GPA_N), mostró que el tratamiento de los eritrocitos con neuraminidasa elimina la especificidad M y los N fueron más fuertemente aglutinados, por lo tanto se propuso que la GPA_N contiene un pequeño número de residuos no sustituidos o que están parcialmente desialilados.

En el año 2003 el grupo de Wang aisló una lectina de las hojas de *Glechoma hederacea* que se describió como una proteína tetramérica de 130 kDa con subunidades de 28 kDa unidas por puentes intercatenarios. (Wang et al, 2003a) En condiciones reductoras se encontraron dos bandas de 28 y 26 kDa que representan el 66 y 34 % respectivamente del total de la proteína y presentan el mismo N-terminal, por lo tanto se concluyó que son glicoforinas de la lectina con diferente grado de glicosilación. Esta lectina es específica hacia residuos de GalNAc y aglutina mejor los eritrocitos de conejo tripsinizados que los del grupo A. Con resonancia de plasmón se determinó su especificidad frente a mucinas y fetuinas desialilada. Con ensayos de clonación molecular se determinó su secuencia y se observó homología con lectinas de leguminosas al igual que una estructura tridimensional similar obtenida por modelado molecular (Wang et al, 2003a). Se ha establecido que esta lectina presenta propiedades insecticidas (Wang et al, 2003b).

Recientemente se estudió la lectina de *Salvia bogotensis* perteneciente al subgénero Calosphace por Vega y Pérez (2006), se reportó como una proteína de aproximadamente 39 kDa con la capacidad de aglutinar eritrocitos Tn humanos. El reconocimiento del antígeno por parte de las lectinas de Labiadas hace de esta proteína una herramienta útil para los estudios inmunohistoquímicos y celulares. Los estudios realizados por el grupo de Brewer en el año de 2007 (Dam et al, 2007), evaluaron la afinidad de la lectina de la soja para el reconocimiento hacia el antígeno Tn presente en Pancarcinoma, se determinó la afinidad relativa utilizando Mucina Submaxilar Porcina, se encontró mediante ensayos de eritroaglutinación que por lo menos 0,2nM de la mucina era capaz de inhibir la

aglutinación entre la lectina y eritrocitos humanos Tn. Para evaluar la actividad de las lectinas se han descrito variedad de métodos partiendo de su capacidad para reconocer carbohidratos, los métodos comúnmente utilizados son los de eritroaglutinación, precipitación con carbohidratos y cromatografía de afinidad sobre gel solido y Enzyme-linked Lectinosorbent assay (ELLSA), una modificación del ELISA convencional, donde el equivalente al anticuerpo primario resulta ser la Lectina en estudio. Comparado con los otros métodos mencionados su ventaja es facilitar una evaluación cuantitativa en función de la interacción entre la lectina con el glicoconjugado. Los autores han reportado la especial atención que se le deben tener a los pigmentos (usualmente Polifenoles) y a las pectinas para el tratamiento y reconocimiento de las lectinas en los extractos crudos debido a que ellos pueden llevar a resultados incorrectos al influir en la solubilidad de las proteínas y en algunos casos interferir con la asociación entre las lectinas con eritrocitos por lo cual deben ser en la medida de lo posible eliminados de las muestras tal como lo indican Vega y Pérez (2006), todas estas apreciaciones se deben tener en cuenta para el desarrollo de cualquier trabajo enfocado hacia el establecimiento de protocolos de aislamiento de este tipo de lectinas.

3.3. Mucinas

Las mucinas son un grupo de glicoproteínas de alto peso molecular (200-2000 kDa) (Christine y Gendler, 2008) aunque se han reportado mucinas citoplasmáticas de 30 a 45 kDa (Freire et al, 2005 y Croce et al, 2003) expresadas usualmente en tejidos endoteliales y asociadas con procesos de lubricación, mantenimiento de la capa hidratada sobre el epitelio y de protección al servir como barrera para agentes patogénicos y tóxicos (Gendler y Hattrup, 2007); se caracterizan por ser altamente O-glicosiladas al presentar un número variable de repeticiones en tándem (VNTR) ricas en serina, treonina y prolina llamadas dominio mucínico. Los grupos hidroxilo de treonina y serina proporcionan los sitios para la O- glicosilación extensiva encontrada en mucinas maduras. Los oligosacáridos de estas glicoproteínas pueden proporcionar entre 50-90% de su masa molecular cuando está madura, dependiendo del tipo de mucina y del patrón de las glicosiltransferasas expresadas en la célula de origen. El abundante número de cadenas laterales de carbohidratos, combinadas con la forma escarpada de los dominios en tándem de las repeticiones mucínicas, dan lugar a una estructura en brocha característica de estas proteínas ligadas a membrana que en ocasiones se puede proyectar hasta 1500 nm desde la superficie celular. El gran tamaño y su extensiva glicosilación desempeñan papeles importantes en su función.

Las mucinas se pueden dividir en dos subfamilias según su localización. Las mucinas (secretadas) gelificantes son enteramente extracelulares y las mucinas superficiales asociadas a la membrana celular mediante un dominio transmembranal, una región C terminal ubicada a nivel citoplasmático y un

dominio extracelular donde se ubican los dominios VNTR (Gendler y Hatstrup, 2007).

Las mucinas secretadas, que carecen de un dominio transmembranal y que se ubican en los espacios extracelulares están representadas por: MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8 y MUC19. El otro grupo se caracteriza por la presencia de un dominio transmembranal, al cual pertenecen: MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 y MUC20. (Martínez-Antón et al, 2006).

3.3.1. Estructura de las Mucinas

Existe gran variedad de tipos de mucinas, lo que dificulta una generalización sobre la descripción estructural; en este sentido, utilizaremos a modo de ejemplo una de las mucinas apicales más estudiadas por su distribución y frecuencia como lo es MUC1. Las mucinas superficiales de la célula se componen típicamente de dímeros de subunidades disímiles, ligados por enlaces no covalentes. La subunidad más grande es enteramente extracelular y altamente glicosilada, en el caso de algunas mucinas como MUC1 y MUC4, integrada casi enteramente por el dominio de VNTR (Gendler y Hatstrup, 2007).

Después de la traducción, un solo polipéptido precursor en MUC1 se escinde en el retículo endoplasmático en dos fragmentos de heterodímeros (Lan et al, 1990). El más grande abarca la secuencia de la señal N-terminal y el dominio de VNTR de 20- 100 repeticiones de secuencias GSTAPPAHGVTSAPDTRPAP (en el ser humano) (Gendler et al, 1990). El dominio extracelular varía en tamaño para este caso desde 120 hasta 300 kDa dependiendo del patrón de glicosilación característico de cada tejido. El fragmento más pequeño de MUC1 es colectivamente llamado MUC1-CT y contiene una región extracelular de 51 residuos (con aproximadamente cinco sitios de N u O-glicosilación), un dominio corto transmembranal y 72 aminoácidos en la región C-terminal .

La N-glicosilación ocurre en el retículo endoplasmático donde el péptido sufre un clivaje y posteriormente es transportado al aparato de Golgi donde se realizará la O-glicosilación (Rose y Voynow , 2006). La N y O-glicosilación ocurren en MUC1, aunque la mayoría de los sitios disponibles son específicos para O-glicanos. El clivaje del polipéptido precursor MUC1 ocurre durante el plegamiento de la proteína (Levitin et al, 2005). El sitio del clivaje es N-terminal del residuo de serina en un motivo de G- -SVVV encontrado en el módulo del SEA (entiéndase por SEA motivo encontrado inicialmente en proteínas de esperma, enteroquinasas y agrinas) del dominio extracelular MUC1 (Parry et al, 2001). Tal como se muestra en la Figura 2.

El segmento N-terminal de Muc1 contiene un péptido señal que dirige la localización de la proteína madura en la membrana apical de células epiteliales polarizadas, mientras que los primeros tres residuos (CQC) del dominio citoplásmico están implicados en la retención en la membrana plasmática (Pemberton et al, 1996). La palmitoilación de estos tres aminoácidos permite el reciclaje de MUC1 en la superficie apical sin afectar endocitosis, que es controlado por fosforilación de las secuencias YTNP y del YHPM de MUC1-CT (Kinloug et al, 2006). MUC1 es por lo tanto muy útil como marcador de la localización apical en tejidos epiteliales normales (Gendler, 2001).

El dominio extracelular de MUC16 también se caracteriza por presentar gran número de repeticiones en tándem (O'Brien et al, 2001). La subunidad más pequeña de la mucina ligadas a membranas consiste en una región extracelular, el dominio simple de paso Transmembranal y el segmento citoplasmático C-terminal.

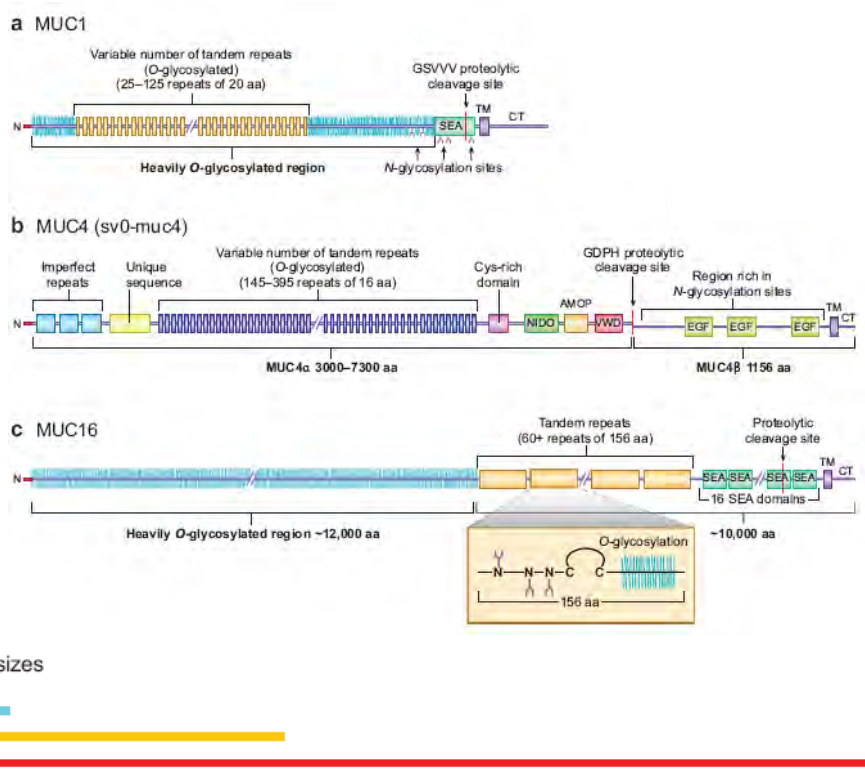


Figura 2. Estructura de algunas mucinas transmembranales sintetizadas en el sistema respiratorio representadas por (a) MUC1, (b) MUC4 y (c) MUC16. Los dominios mostrados incluyen la secuencia señal N-terminal (rojo), módulos SEA, dominio transmembranal TM, C-terminal (CT); Secuencia homóloga nidogen (NIDO); dominio asociado a adhesión en MUC4 y otras proteínas (AMOP); Factos von Willebrand (VWD); y regiones del factor epidermal de crecimiento (EGF). Tomado de (Gendler y Hatrup, 2007).

La otra subfamilia de mucinas está constituida por mucinas secretadas de carácter monomérico o polimérico que, a diferencia de las de membrana, se sintetizan en células especializadas del epitelio “*goblet cells*” y glándulas submucosales “*mucous cells*” (Hovenberg et al., 1996 y Wickstrom et al., 1998.), representadas (principalmente MUC 6, MUC5B, MUC5AC y MUC2. Véase figura 3.

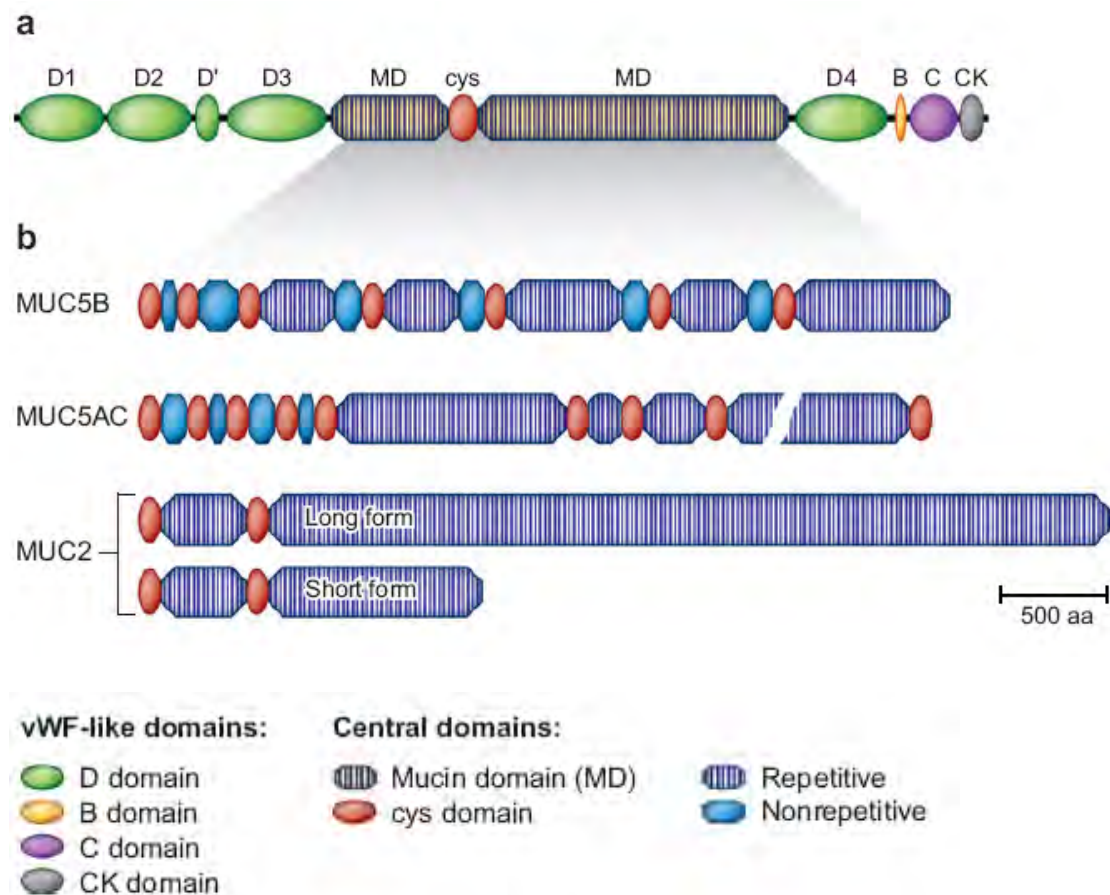


Figura 3. Estructura de mucinas poliméricas de vías aéreas. (a) Representación genérica de mucina polimérica. El N- y C terminal de los monómeros están unidos mediante el factor von Willebrand (dominios D,B,C y CK). La región central contiene dos dominios mucinicos (MD) y uno rico en Cys. (b) Organización de los dominios centrales de MUC5B, MUC5AC y MUC2. Secuencia repetitiva (rayado azul) y no repetitiva (azul) de dominios mucinicos. El dominio central de MUC5B y MUC5AC reporta variación significativa. Nótese la ausencia de dominio transmembranal. Tomado de Thornton et al, (2008).

3.3.2. Estructura y biosíntesis de los antígenos de O-glicosilación simple.

La complejidad estructural de las cadenas oligosacáridas de tipo O es mucho mayor que las de tipo N y ello se puede evidenciar por la existencia de gran diversidad de variantes en función de la ausencia, presencia o repeticiones de monosacáridos a partir de los cuales ocurre la elongación de la cadena. (Van den Steen et al, 1998) . Esta gran diversidad, que hace extremadamente difícil la caracterización de los oligosacáridos con uniones de tipo O, es consecuencia de un complejo mecanismo de biosíntesis. Contrariamente a lo que sucede en el inicio de la N-glicosilación, en la O-glicosilación los azúcares son transferidos individualmente y luego de que la cadena polipeptídica ha terminado de ser sintetizada son incorporados en el aparato de Golgi.

15

La presentación estructural de las cadenas peptídicas con enlaces glicosídicos tipo O, varía según el tipo celular y el tejido analizado dependiendo en gran medida del perfil de glicosiltransferasas, de sus funciones relativas, de la distribución celular de las enzimas y de las secuencias peptídicas glicosilables (Osinaga, 2002).

La primera reacción de O-glicosilación es la que forma el antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr) y consiste en la adición de GalNAc a la cadena peptídica a partir del azúcar activado UDP-GalNAc que por acción de enzimas conocidas como UDPGalNAc: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasas (ppGalNAc-Ts), enlaza el carbohidrato a un residuo de serina o treonina. A partir de esta estructura pueden formarse las diferentes elongaciones mediante la acción de glicosiltransferasas específicas, que actúan de manera secuencial.

3.4. O-glicosilación incompleta y cáncer

En células cancerígenas ocurren cambios importantes en los patrones de glicosilación de tal manera que muchos de los marcadores fenotípicos utilizados para la identificación de cánceres epiteliales corresponden a estructuras glicosiladas o al sector peptídico de las mucinas (Kim y Varki , 1997). Se ha encontrado que la mayoría de las células de carcinomas desarrollan una elongación incompleta de las cadenas sacarídicas con uniones de tipo O, formando estructuras menos complejas. Esto determina que algunos grupos de carbohidratos , que en las células normales se encuentran enmascarados por la adición de otros azúcares, queden expuestos en la superficie celular, resultando en la formación de nuevos antígenos asociados al cáncer. Los mejor caracterizados son los antígenos Tn (ver gráfica 4), TF y sialil-Tn, presentes en más del 90% de los carcinomas, por lo que son considerados marcadores de "pancarcinomas". (Hakomori, 1989)

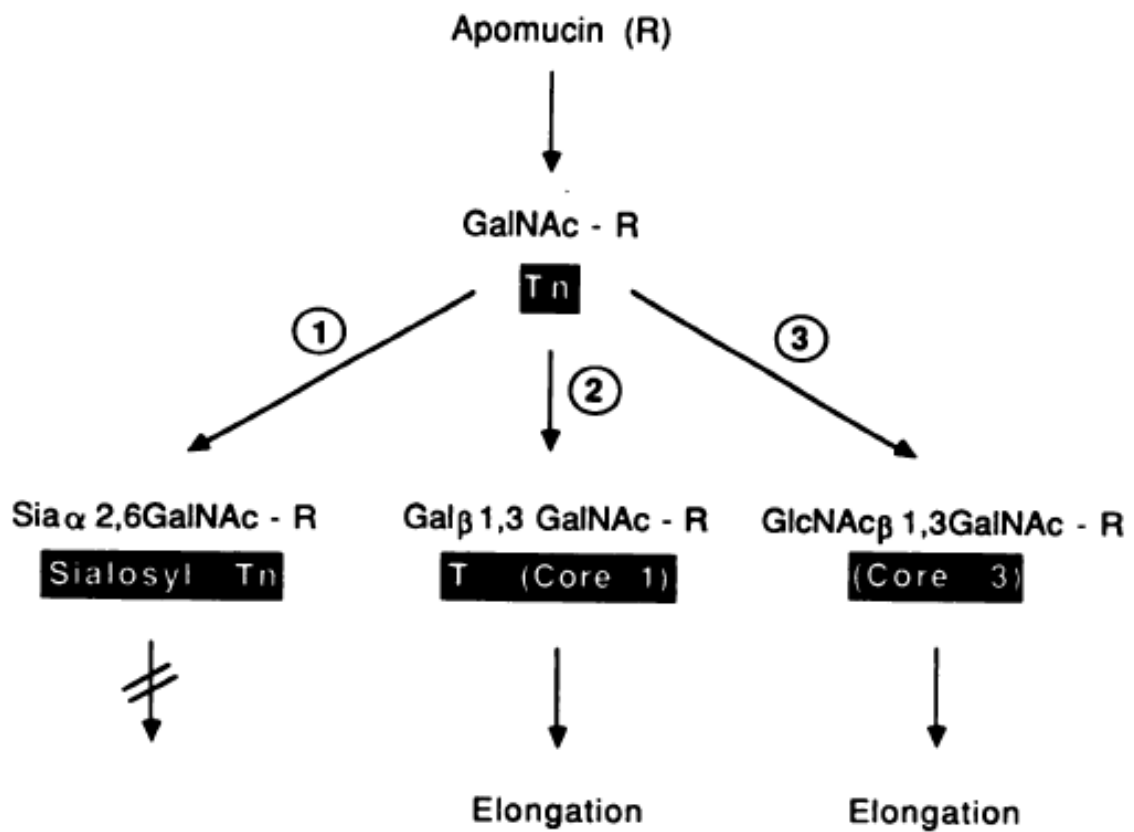


Figura 4. Se ilustra el antígeno Tn como el resultado de la ausencia de elongación por la pérdida de actividad de algunas glicosiltransferasas (Itzkowits et al. 1989)

La parte terminal en estas moléculas puede ser lineal o ramificada. Por ejemplo, las ramificaciones que parten de GlcNAc con enlace $\beta 1,6$ generan el antígeno H. El antígeno H es el precursor de los grupos sanguíneos del sistema ABO, de los antígenos asociados a tumor (TAAS, por sus siglas en inglés) sacarídicos, y de los antígenos Lewis (Varki. et al, 1999; Brockhausen et al, 1999) . Las ramificaciones que sufren, tanto el antígeno Tn como el antígeno T por acción de diversas sialil transferasas (STs) o fucosil transferasas (FucTs) dan origen a los antígenos tumorales SLx, SLa o sialil Lewis Y (SLY) (Löfling y Holgersso, 2009). El grado y tipo de glicosilación se encuentran regulados por las diversas GTs, que actúan secuencialmente en el RER para la N-glicosilación, o en el aparato de Golgi para la O-glicosilación, catalizando la unión específica entre un monosacárido y un glicano precursor. La expresión de estas enzimas depende del tipo de célula o tejido, pero también están reguladas por estímulos (Varki et al, 1999). A partir del antígeno Tn, la biosíntesis de los O-glicanos puede generar ocho diferentes cores. A partir de los cores, las cadenas sacarídicas se elongan o ramifican dando como resultado estructuras más complejas de O-glicanos tal como se muestra en las Figuras 6 y 7.

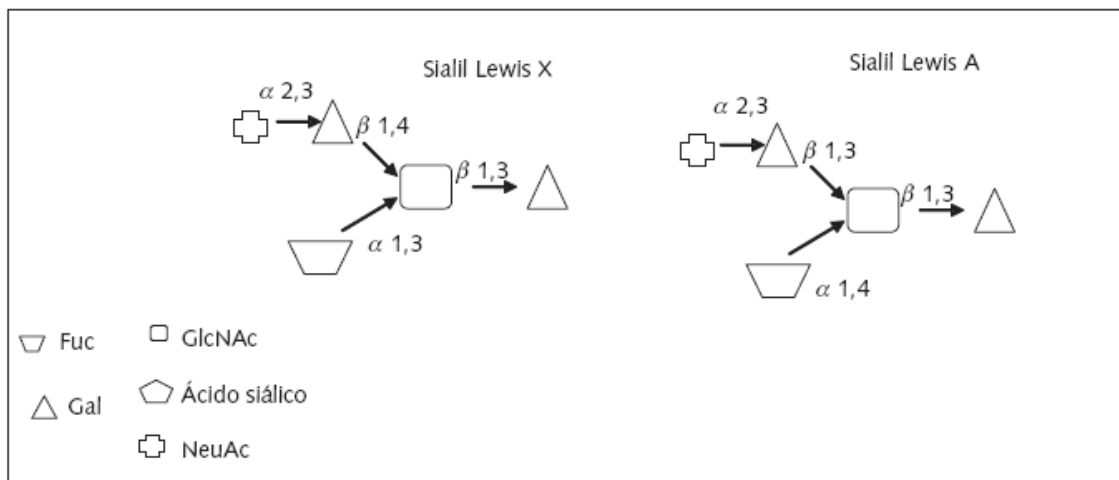


Figura 6. Comparación estructural de dos antígenos tumorales, la diferencia radica únicamente en el tipo de enlace entre los carbohidratos. Tomado y modificado de Thornton et al, (2008).

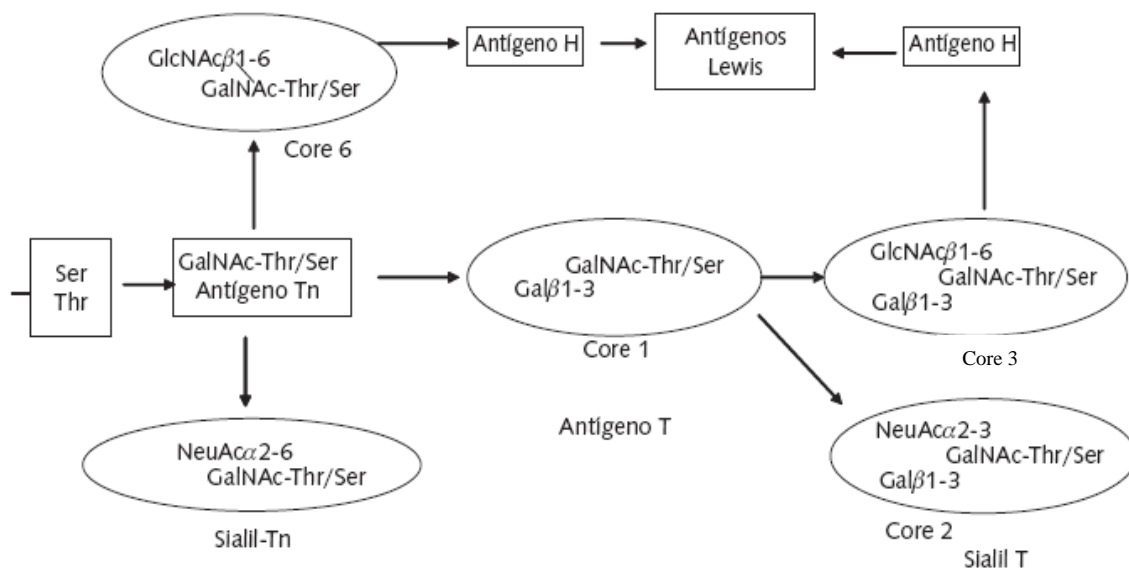


Figura 7. Biosíntesis de los *cores* que generan los antígenos tumorales más importantes. Tomado y modificado de Thornton et al, (2008).

El core 1 (Galβ1,3GalNAc) y el core 2 son los que generan la mayor parte de los TAAS sacarídicos (Varki et al, 1999), (Brockhausen et al, 1999). La biosíntesis de algunos glicanos es finalizada de manera normal o anticipada por la transferencia de ácido siálico (Sia) en las posiciones terminales de los carbohidratos (Brockhausen et al, 1999). Esta transferencia es mediada por alguna de las 12 diferentes STs específicas de célula o tejido hasta ahora conocidas en mamíferos (Broquet et al, 1991; Malisan y Testi, 2002). Los Sia son una familia de azúcares carboxilados de 9 carbonos, que se encuentran como monosacáridos terminales, tanto en N- como en O-glicanos. El Sia puede tener sustituciones de uno o más grupos hidroxilo con grupos acetilo, metilo, lactilo, fosfato o sulfato, con lo que cambia el significado biológico y las propiedades a las moléculas que lo contienen (Schauer et al, 1995; Varki y Varki, 2007). Por ejemplo, una expresión alterada del Sia puede estar asociada con el comportamiento de algunas neoplasias (Hedlund et al, 2008)

3.5. Significado biológico de la glicosilación.

Las modificaciones en los carbohidratos afectan las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, esto genera nuevas estructuras que pueden ser consideradas como determinantes antigénicos (epítopes) o como glicotopes, y pueden ser utilizados como marcadores moleculares (Hedlund et al, 2008). El tipo y grado de glicosilación influyen en la antigenicidad de las moléculas reconocidos por linfocitos T (Mouritsen et al, 1994).

Las mucinas son el mejor representante de los O-glicanos con core 1 y core 2. Presentan alteraciones en la glicosilación en células neoplásicas, estos cambios son responsables de la evasión de la respuesta inmune antitumoral (Couldrey y Green, 2000; Laidler y Lityńska, 1997) o bien del comportamiento invasivo de las células asociándolas a la progresión de la enfermedad (Hollingsworth y Swanson, 2004 ; Yamashita et al, 1995). Las modificaciones de los O-glicanos en el cáncer son frecuentes (Peracaula et al, 2008), como es el caso del melanoma donde hay un incremento del Sia acetilado en el carbón 9 en el gangliósido (tipo de esfingolípido con oligosacáridos y ácido siálico) y esta modificación favorece la diseminación de las células (Nicoll et al, 2003). La carcinogénesis es consecuencia de las señales que reciben las células (químicas, físicas y biológicas) provocando modificaciones moleculares y estructurales que alteran el proceso vital de la célula (Sheu et al , 2008). La mucina tipo 1 (MUC1) en cáncer puede sobreexpresar algún tipo de O-glicano rico en GlcNAc con terminaciones con Sia, porque las enzimas responsables (GlcNAc T y STs) están sobreexpresadas como respuesta a un estímulo, dando lugar a una forma hiperglicosilada, pero también existe el caso donde la biosíntesis está incompleta debido a que no se expresó alguna GTs responsable, por lo que se generan unas mucinas pobremente glicosiladas o con cadenas sacarídicas cortas, dejando expuesto el antígeno Tn (ver Figura 4). El SLx es otro antígeno presente en las mucinas conocidas como sialomucinas, pero al contrario de las anteriores, la presencia de SLx favorece la metástasis de cáncer de colon (Hanisch et al, 1996). Estos antígenos se han considerado como antígenos comunes en varios tipos de cáncer. La consecuencia biológica para cada subtipo de MUC1 es diferente, mientras que la altamente glicosilada favorece la progresión del tumor y es pobremente inmunogénica porque los epítomos antigénicos quedan cubiertos por las múltiples ramificaciones presentes en la parte sacarídica de la molécula; la forma MUC1 pobremente glicosilada, es altamente antigénica y participa en la activación de la respuesta antitumoral (Xu et al, 2005). Hasta el momento, se desconocen los mecanismos de regulación en ambos subtipos de MUC1, pero seguramente está asociado con los estímulos del microambiente (Lloyd et al , 1996); esto último ha despertado interés en la comunidad científica para utilizar al Muc1 en la inmunoterapia contra el cáncer (Stepensky et al, 2006).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El Desarrollo del proyecto se sustenta en tres fases:

1. Aislamiento de Lectina de semillas de *Salvia bogotensis*
2. Aislamiento de mucina citoplasmática utilizando la lectina
3. Caracterización de la mucina aislada

4.1. Aislamiento de la Lectina

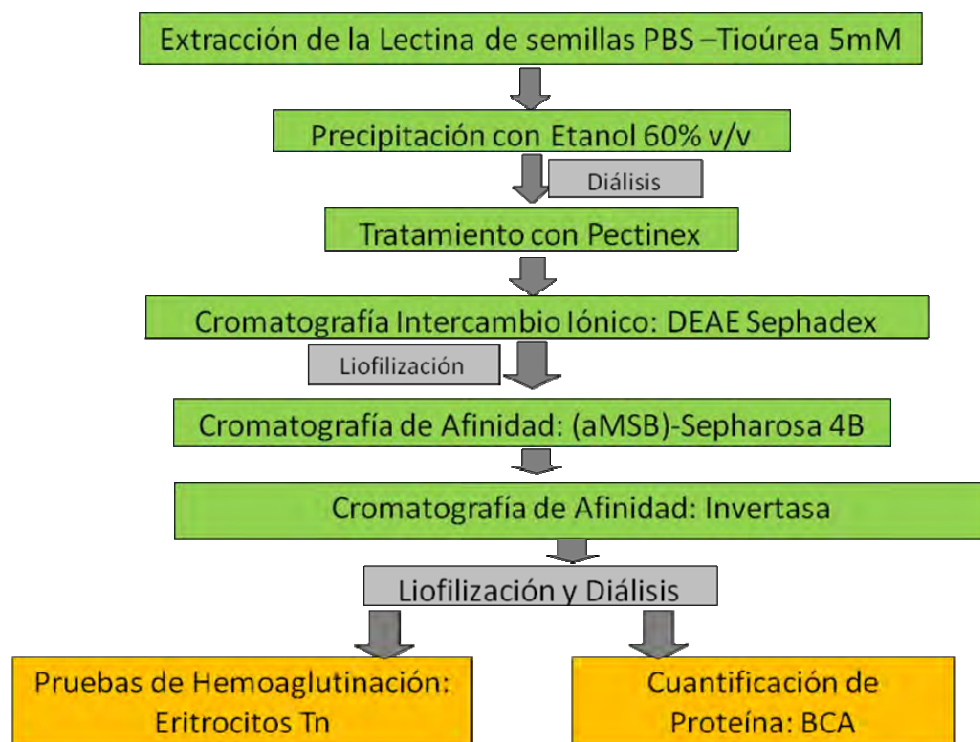


Figura 8. Esquema del procedimiento realizado para la extracción y purificación de la lectina de *Salvia bogotensis*.

4.1.1. Extracción de la Lectina

Las semillas de *Salvia bogotensis* fueron recolectadas en el área de Mondoñedo cerca a Bogotá, estas semillas se hidrataron durante 6 horas con PBS (20mM fosfatos; 150mM NaCl, pH 7.0-7.3) tiourea 5mM en relación 1/10 (p/v) y

posteriormente homogenizadas durante 12 horas a 4°C (Van Driessche et al., 1983); se centrifugó a 38000g a 4°C por 1 hora. A los pellets se les repitió el procedimiento dos veces, mientras que los sobrenadantes fueron almacenados a -20 °C.

Luego del procedimiento se realizó un “pool” con todos los sobrenadantes obtenidos, se realizó precipitación con etanol al 60%, el precipitado se reconstituyó y se trató con Pectinex. (Vega y Pérez, 2006)

4.1.2. Tratamiento con Pectinex

El Pectinex se utilizó para eliminar pectinas. Se ajustó el pH a 4.7 con ácido acético glacial adicionando por cada 2,5 ml de extracto 0,5 ml de buffer acetato 200mM. Se agregó Pectinex en relación de 40 µl /3 ml de extracto a 37°C durante 24 horas. Se centrifugó a 18000 rpm por 30 min, 4°C y al sobrenadante se le ajustó el pH a 7.0 con NaOH diluido para realizar pruebas de hemoaglutinación y cromatografía de intercambio iónico. El pellet fue descartado.

4.1.3. Cromatografía intercambio iónico

Con el objetivo de eliminar parcialmente pigmentos de la muestra (principalmente polifenoles) se realizó cromatografía de intercambio iónico. Se equilibró la muestra obtenida en el paso anterior (a los que se les adicionó 1/10 vol extracto total de TBS 10X, pH 7,2) en columna (2x15cm) DEAE-Sephadex equilibrada en TBS. La velocidad de elución fue generalmente constante (2ml/12 min), se recolectaron las fracciones no retenidas mediante seguimiento espectrofotométrico a 280 nm. Los pool obtenidos con las fracciones de mayor absorbancia fué liofilizado o concentrado mediante Amicon PM 10 y posteriormente reconstituido en buffer PBS para tratarlo en cromatografía de afinidad (Vega y Pérez, 2006).

4.1.4. Cromatografía de afinidad

Las muestras reconstituidas, obtenidas a partir de cromatografía de intercambio iónico, fueron sometidas a cromatografía de afinidad en columna Sepharosa 4B ligada a asialo Mucina Submaxilar Bovina preparada por Vega (1997). Se eluyó inicialmente con PBS pH 7.2 y posteriormente se procedió a almacenar el pool de fracciones no retenidas con alta absorbancia a 280 nm. Se realizó elución de fracciones retenidas cambiando el pH de la columna mediante Tris OH (50 mM) pH 11.4. Cada una de las fracciones obtenidas a pH básico se neutralizó de inmediato con HCl 0,01 N. El pool obtenido con las fracciones de más alta absorbancia fue almacenado. Las fracciones no retenidas fueron liofilizadas inmediatamente, mientras que las fracciones de la proteína retenida fueron dializadas contra Bicarbonato de Amonio 20 mM 3 veces (cada 8 horas) y

posteriormente liofilizadas. Sobre las fracciones retenidas y no retenidas, se efectuaron pruebas de hemoaglutinación. (Vega y Pérez, 2006).

4.1.5. Pruebas de Eritroaglutinación

Para evaluar la actividad hemoaglutinante de la lectina se usó una suspensión de eritrocitos según la técnica descrita por Navarro y Perez (1978). Los eritrocitos Tn se prepararon por degradación enzimática de una suspensión de eritrocitos A+ al 10% con 0,05 unidades de Neuraminidasa, durante 1 hora a 37°C para exponer el antígeno T y posteriormente degradación con 30 unidades de B-galactosidasa para exponer el antígeno Tn, según el método expuesto por Hirohashi y colaboradores (1985) y Vega (1997). Los ensayos de eritroaglutinación se hicieron en microplaca con suspensiones eritrocitarias al 2% en PBS según lo descrito por Navarro y Perez (1978).

Se colocaron 500 ul de sangre grupo A en tubos eppendorf y fueron llevados a 1 ml con PBS, se centrifugó a 5000 rpm, 5 minutos a 4°C, se lavaron los eritrocitos de esta manera varias veces extrayendo el sobrenadante coloreado, los blancos consistieron en 100 microlitros de PBS + 50 microlitros de suspensión eritrocitaria y la evaluación de hemoaglutinación, se realizó con 50 ul de PBS + 50 microlitros de muestra + 50 ul de suspensión eritrocitaria sobre extractos crudos (Pérez, 1984).

4.1.6. Cuantificación de proteína

La cantidad de lectina aislada se cuantificó por el método del Acido Bicinconinico (BCA) (Smith et al., 1985) en microplaca para lo cual se realizó curva de calibración con solución de concentración conocida de Albumina Sérica Bovina (BSA) como patrón.

4.2. Aislamiento de la mucina citoplasmática

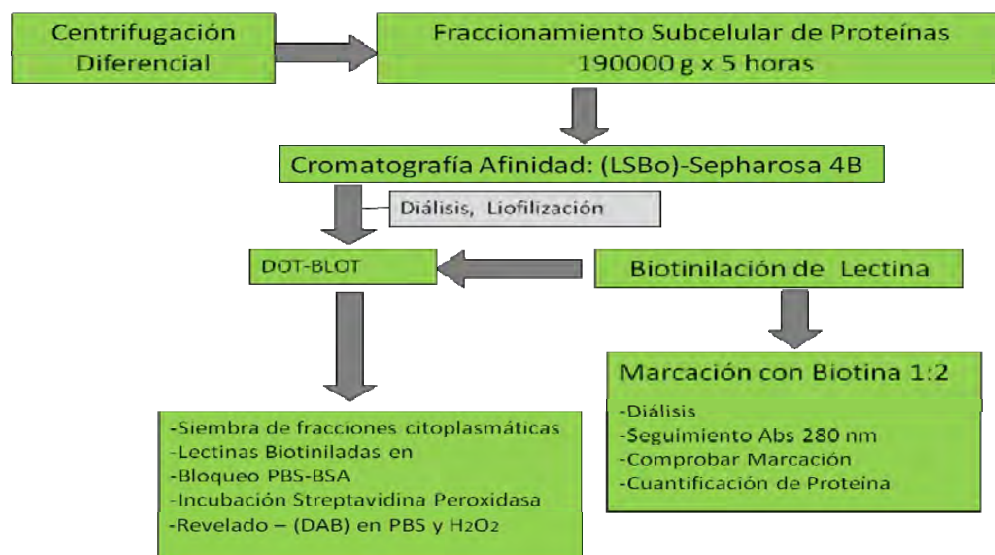


Figura 9. Esquema que representa la metodología seguida para el aislamiento de las proteínas ricas en antígeno Tn.

4.2.1. Fraccionamiento Subcelular de Proteínas

Las líneas celulares fueron obtenidas del laboratorio de Cultivo Celular del Departamento de Farmacia; la línea MCF-7 proviene de una efusión pleural de cáncer mamario. Las células se cultivaron a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ en DMEN (SIGMA, D-1152) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibióticos (100 U/ml Penicilina, 100 ug/ml Estreptomicina y 0.25 ug/ml Anfotericina). El procedimiento se desarrolló en dos experimentos, a nivel general el fraccionamiento de las proteínas de las líneas celulares HeLa y MCF – 7, se realizó por centrifugación diferencial según el método descrito por Storrie y Madden (1990) con modificaciones realizadas por Vega (2004). Se lavaron las células en TBS (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, KCl 140 mM, EDTA 2mM) pH 7.2, el homogenización se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos en TBS (Tris 10 mM, Sacarosa 0.25 M, NaCl 10 mM) adicionado con mezcla de inhibidores (El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM, Acido tetraacetico etilen glicol (EGTA) 5 mM, PMSF 2 mM, leupeptina 1ug/ml , aprotinina 1.2 ug/ml y pepstatina 10 ug/ml). El pellet se centrifugó a 2300 rpm durante 10 minutos, los sobrenadantes se recuperan para continuar el fraccionamiento y el pellet resultante fue utilizado para hacer reextracción. Se ultracentrifugó el sobrenadante a 45000 rpm (190000 g) durante 5 horas a 4 °C. El sobrenadante que contiene la fracción citoplasmática se recuperó y se almacenó a - 20°C. En el primer

experimento (luego de realizar ultracentrifugación) se obtuvo la fracción citoplasmática (I) y un pellet que fue resuspendido nuevamente para reextraer proteínas citoplasmáticas (Fracción citoplasmática II) en las que mismas condiciones mencionadas arriba; en el segundo experimento se realizó homogenizado una sola vez sin reextraer las proteínas del pellet obtenido en la ultracentrifugación.(Fracción Citoplasmática III) .

4.2.2. Cromatografía de afinidad sobre LSBo-Sepharosa 4B

Se realizó cromatografía de afinidad sobre Lectina *Salvia bogotensis* (LSBo) Sepharosa 4B según Hermanson et al (1992); oxidando la Sepharosa 4B para generar grupos aldehído y posteriormente acoplando la lectina para formar bases de Schiff estabilizadas con Cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃). (Esta columna es el soporte para que la mucina se fije de manera específica) La fase móvil fue PBS, se almacenó el pool de fracciones no retenidas con alta absorbancia a 280 nm, posteriormente se realizó elución de fracciones retenidas mediante gradiente discontinuo de pH (2,5-11,4). Los pool obtenidos con las fracciones de alta absorbancia fueron dializados, liofilizados y posteriormente almacenados a 4°C. Sobre las fracciones retenidas y no retenidas se efectuó DOT-BLOT directo y seguidamente se realizó cuantificación de proteína de la misma manera que lo expuesto en el numeral 4.1.6.

4.2.3. DOT-BLOT

Para hacer evidente cuáles de las fracciones eluidas en el gradiente de pH en la cromatografía de afinidad anteriormente mencionada interactúan con la lectina se realizó DOT BLOT directo tal como lo describe Vega (2004); la lectina de *Salvia bogotensis* se biotinila para ser utilizada como herramienta para evidenciar la presencia de proteínas que contienen antígeno Tn. 1ug de proteína derivada de fracción citoplasmática eluida en gradiente de pH discontinuo es evaluada con 0,2 ug de lectina.

4.2.4. Marcación de la lectina

Se siguió la metodología descrita por Wu et al (1995) con algunas modificaciones realizadas por Vega (2004). La marcación se realizó en PBS pH 7.5 en una proporción de lectina:biotina 1:2(Sulfo-NHS-LC-Biotina) en dos partes (cada 8 horas) para aumentar la eficiencia de marcación dada la hidrólisis del éster de la biotina. La biotina residual se eliminó por centrifugación con Nanosep 3kDa realizando varios lavados con PBS y controlando la retención de la proteína marcada por medidas de absorbancia a 280 nm. Posteriormente se procede a realizar diálisis.

4.3. Caracterización parcial de la mucina citoplasmática.

4.3.1. Western blot

Se realizó western blot según Freire y colaboradores (2005) con algunas modificaciones , luego de realizar SDS-PAGE sobre las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad (paso 4.2) se procedió a transferir la proteína a membrana de nitrocelulosa donde se evaluó la interacción con anticuerpos policlonales anti Muc1 y Anti Muc2, *Vicia villosa*, anticuerpos anti Tn y finalmente con la lectina de *Salvia bogotensis*.

4.3.2. Determinación Peso Molecular

Para determinar el peso molecular de la proteína se utilizó el método de SDS-PAGE descrito por Laemmli (1970) en condiciones descritas por Vega (2004).

4.3.3. Determinación de la Interacción entre LSBo y mucina Citoplasmática.

La interacción de la lectina de *Salvia bogotensis* con las mucinas se evaluó por ELLSA tal como lo describe Vega y Pérez (2006), las fracciones citoplasmáticas eluidas por gradiente de pH (2,5-11,4) fueron fijadas a las placas y la interacción fue evaluada mediante revelado con estreptavidina peroxidasa ABTS. Como control positivo se utilizó el reconocimiento de la lectina hacia asialo Mucina Submaxilar Bovina y se corroboraron los resultados con la isolectina B4 de *Vicia villosa*. Como blanco se utilizó el procedimiento utilizando la lectina sobre 1ug de de ASB.

4.3.4. Determinación del Punto Isoeléctrico

Se realizó la determinación del punto isoelectrico de la banda obtenida se realizó según el protocolo descrito por Olmos y colaboradores (1997) con modificaciones realizadas por Ardila (comunicación personal) que utiliza 500 voltios para la realización de la electroforesis.

4.3.5. Electroforesis Bidimensional

Para evaluar el perfil de la banda obtenida anteriormente (Ver 4.2) se procedió a realizar electroforesis bidimensional de esta banda tal como lo indica Robertson y colaboradores (1987) con modificaciones realizadas por Sánchez (Comunicación personal), que utiliza 4000 voltios en el ciclo de enfoque para la electroforesis en gradiente de pH discontinuo.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

El estudio de las lectinas manifiesta gran interés desde hace algunos años. En el grupo de investigación en proteínas se han encontrado múltiples lectinas con reconocimiento a diferentes antígenos, para este caso se trabajó con base en los resultados obtenidos y publicados por el grupo de investigación en proteínas en el año 2006, en los cuales se define a la lectina de *Salvia bogotensis* como una proteína capaz de reconocer el antígeno Tn. En este trabajo se utilizó esta propiedad para aislar proteínas citoplasmáticas ricas en antígeno Tn. Para lograr este objetivo lo primero que se debía hacer era aislar y purificar la lectina lo cual sustentó la primer etapa del trabajo.(Figura 8). Los resultados obtenidos se muestran y se discuten a continuación.

5.1. Aislamiento de la lectina de *Salvia bogotensis*

Los extractos iniciales de *S. bogotensis* (Tabla 3) se caracterizaron por ser coloreados y viscosos debido posiblemente al alto contenido de polifenoles y pectinas; en presencia de antioxidantes y reductores se ha reportado una pérdida de la actividad por parte de la lectina. Como resultado se evaluó que el método mas eficiente para extraer la lectina era con PBS debido a que la actividad de la lectina en los extractos crudos fue alta. Sin embargo, en estudios anteriores se reporta a la lectina de manera coloreada posiblemente por la asociación entre ellas con pigmentos presentes en las muestras de extractos crudos. Experimentos posteriores (Jiménez, 2000) con la lectina mostraron que la adición de Tiourea 5mM (Van Driessche et al, 1983) al buffer de extracción (PBS) reduce sustancialmente la oxidación enzimática conservándose la actividad de la lectina en un 80%. En consecuencia se seleccionó este extractante (PBS-Tiourea) tal como lo muestra Vega (2006) para las extracciones a nivel preparativo para la purificación de la lectina.

Peso semilla (g)	Volumen extracto (ml)	Vol Precipitado redisuelto (ml)	Aglutinación eritrocitos Tn	Proteína (mg/ml)	Ensayo ELLSA (%)
50	1320	450	+4 (100µl) 0.91 (µg /ml)	6.55	13.2
43	1280	350*	+4 (100µl)	N.D	N.D

Tabla 3. Obtención de los extractos de *Salvia bogotensis*

*Para mejorar la eficiencia en los métodos cromatográficos 268 ml del precipitado con etanol fueron tratados con una mezcla de poligalacturonasas (Pectinex) para reducir la viscosidad y posteriormente fueron centrifugados a 15.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Se observa que los extractos luego de la precipitación etanólica aglutinan fuertemente los eritrocitos tratados, mostrando una actividad de lectina importante con 100 ul de extracto.

El *pool* de extractos obtenidos completamente soluble en PBS-tiourea se precipitó con etanol frío al 60% (v/v); debido a la alta viscosidad que presentaron los extractos por la presencia de pectinas algunos de ellos se trataron con Pectinex para facilitar los procesos cromatográficos. Como resultado se obtuvo que en comparación con las fracciones que no se trataron con pectinex, la lectina no mostró disminución en su actividad (Tabla 4). Para obtener extractos más limpios y translúcidos se siguió el esquema reportado por Piller et al (1986) para *Salvia sclerea* con algunas modificaciones realizadas por Vega y Perez (2006) (Figura 8), realizando una cromatografía sobre DEAE-Sephadex para el precipitado con etanol, tratado y no tratado con Pectinex (Ver tratado con pectinex (Figura 10)). La actividad de la lectina se obtuvo en la fracción no retenida. La primera fracción se caracterizó por ser completamente soluble y sin pigmentos visibles; algunas proteínas contaminantes, polisacáridos y los pigmentos que presentaba el extracto fueron retenidos por la columna. En la Figura 11 se observa el control electroforético realizado para estos extractos, cuando se aplican 5 microgramos de proteína por carril. Se evidencia un bandeo definido producto de la limpieza que se ha hecho de los extractos debido a la previa eliminación de polisacáridos que pueden afectar la movilidad electroforética de las proteínas, las muestras evaluadas fueron tratadas con pectinex lo que mejora la resolución del bandeo. Según los reportes realizados por Vega (2004) quien describe un bandeo no definido electroforéticamente al evaluar fracciones de proteína no tratadas con pectinex muestran la incidencia del procedimiento para disminuir la viscosidad de las muestras. Los resultados obtenidos por Vega (2004) de purificación de la lectina mostraron la necesidad de modificar el esquema de obtención de la fracción cruda antes de realizar la cromatografía de afinidad. Las modificaciones realizadas por ella y aplicadas en este trabajo incluyen la extracción en presencia de PBS Tiourea, tratamiento con pectinex y remoción de pigmentos con DEAE Sephadex y permitieron obtener extractos más adecuados para los ensayos posteriores.

Fracción	Volumen (ml)*	Absorbancia 280 nm	ul en Aglutinación	Actividad Eritrocitos Tn y ELLSA	Proteína (mg/ml)	Título** (mg/ml)
25-4-08 ***	10	1,687	100	+3 ; (95%)	2,46	0,015
29-4-08 ***	15	1,756	100	+4 ; (74%)	1,80	N.D.
1-5-08 ****	19	2,973	100	+4	1,86	N.D.
2-5-08 ****	3	3,392	100	+4 ; (58%)	N.D.	N.D.
18-5-08 ***	2	1,035	100	+4	N.D.	N.D.
15-5-08 ****	7,5	2,613	100	+4	2,81	N.D.

Tabla 4. Se muestra la actividad de la lectina de algunas fracciones no retenidas en cromatografía de intercambio iónico evaluadas por ELLSA y eritroaglutinación.

* Volumen final de extracto luego de concentrar por Amicon PM 10, algunas de estas fracciones fueron tratadas con Pectinex para eliminar viscosidad.

** Mínima concentración de proteína requerida para observar eritroaglutinación.

*** Fracciones tratadas con Pectinex

**** Fracciones no tratadas con pectinex

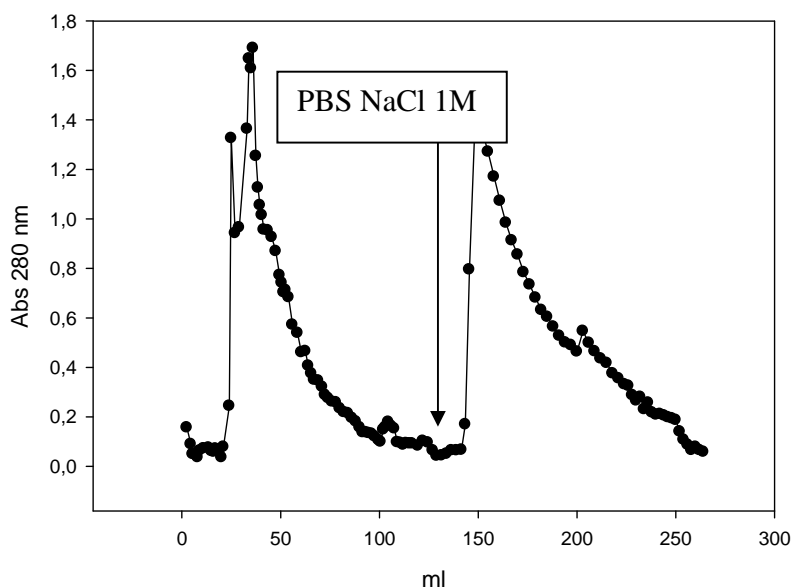


Figura 10. Perfil cromatográfico típico de una cromatografía de intercambio aniónico de los precipitados de etanol al 60% sobre columna de DEAE Sephadex (1,5 cm de diámetro x 15 cm de largo) luego de haber sido tratados con pectinex. Se observan dos picos, el primero corresponde a las fracciones no retenidas y el segundo corresponde a las fracciones retenidas y eluidas con PBS NaCl 1M

Purificación de la lectina de *Salvia bogotensis* mediante la utilización de la técnica de cromatografía de afinidad. Se usó el soporte de **asialo Mucina Submaxilar Bovina** acoplado a Sepharosa (aMSB-Sepharosa 4B) (Tabla 5) para realizar el aislamiento de la lectina. Los altos porcentajes de acoplamiento obtenidos muestran que muy probablemente el soporte derivatizado tiene una muy buena capacidad de retención de la lectina y por tanto permiten utilizar cantidades importantes de la fracción no retenida sobre DEAE mejorando la eficiencia de la separación.

Gel (ml)	Proteína Acoplada (mg)	% acoplamiento	mg/ml gel
20*	200	88,9	10
8**	17,8	35,6	2,2
10	150	98	15

Tabla 5. Porcentajes de acoplamiento de aMSB a la Sepharosa 4 B

*Sintetizado por aminación reductiva

** Sintetizado por aminación reductiva y glicidol

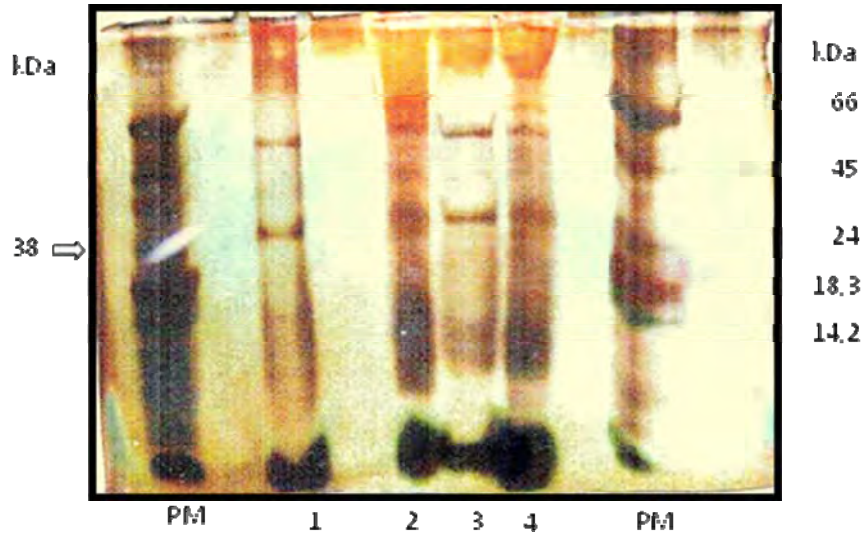


Figura 11. SDS-PAGE de cada una de las etapas de purificación
 Carril 1. Fracción Retenida por cromatografía de afinidad luego se ser tratada con Pectinex
 Carril 2. Extracto crudo precipitado con etanol 60%
 Carril 3. Fracción retenida por cromatografía de intercambio iónico
 Carril 4. Fracción No Retenida por cromatografía de Intercambio iónico
 PM marcadores de peso molecular

Las fracciones no retenidas de las cromatografías sobre DEAE-Sephadex derivadas de muestras tratadas y no tratadas con pectinex fueron sembradas sobre la columna de aMSB- Sepharosa 4B; la elución de la lectina se hizo a pH 11,4 como había sido reportado por Vega (1997) (Figura 12). Los ensayos de actividad y cuantificación para la fracción retenida después de dializarla y liofilizarla se presentan en la Tabla 6. Al concentrar la fracción o al reconstituir el liofilizado se observa muy poca precipitación o pigmentación, se obtiene una concentración del orden de 0,08 a 0,82 mg/ml y actividades por ELISA y eritroaglutinación altas; la diferencia de actividades con respecto a las obtenidas en las fracciones no retenidas en cromatografía de intercambio aniónico (Tabla 4) se debe a las condiciones drásticas de aislamiento donde la lectina pierde parte de su actividad, para la fracción no retenida se detecta poca actividad eritroaglutinante concordando con lo encontrado por Vega (2006).

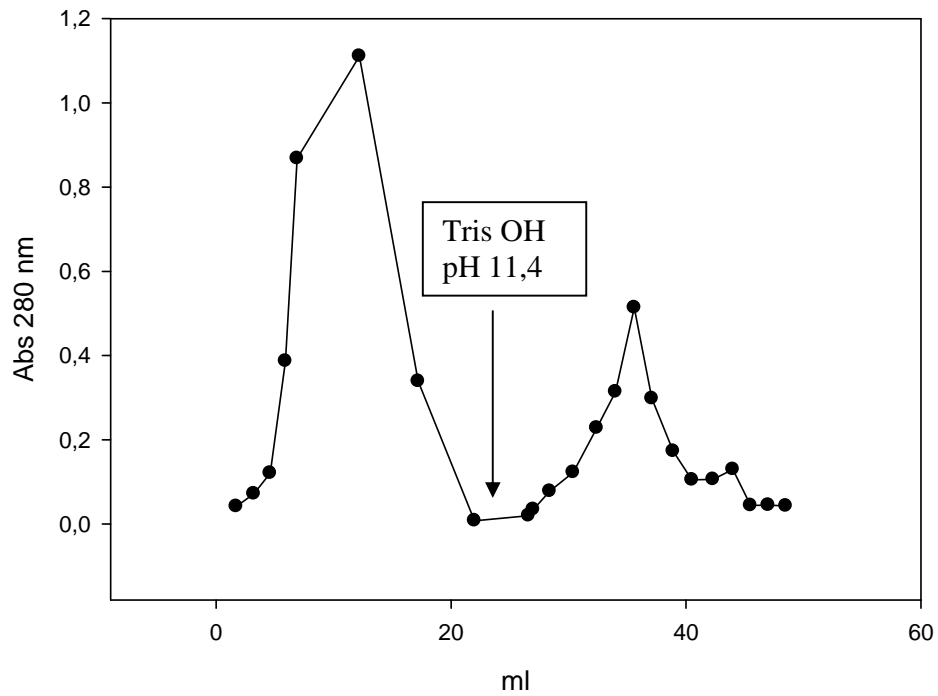


Figura 12. Cromatografía de afinidad de la fracción no retenida por DEAE sobre (aMSB)-Sepharosa 4B. El primer pico corresponde a fracciones no retenidas por el soporte, el segundo pico corresponde a la lectina eluida a pH 11,4.

Fracción retenida	Proteína (mg/ml)	Aglutinación Eritrocitos Tn o ELLSA
20-11-2*	0,330	+4
22-11-2	0,150	+2
5-12-2	0,084	+3
6-12-2	0,071	+3
11-12-2	0,259	+4
28-11-2	0,209	+2
30-11-2	0,305	+1
27-03-2*	0,820	+4
2-10-5	0,369	+3
28-04-08**	0,314	68,7%;(100ul)
29-04-08**	0,121	32,3%;(100ul)
30-04-08**	0,782	38,6%;(100ul)
27-03-09	0,778	+2
29-03-09	0,740	+2
21-04-09	0,391	+4
16-4-2	0,391	+3

Tabla 6. Actividades de algunas fracciones obtenidas en cromatografía de afinidad
 *Estas fracciones (volumen entre paréntesis) fueron acopladas a biotina, para posteriores ensayos de detección del antígeno Tn presente en glicoproteínas citoplasmáticas.
 ** Fracciones evaluadas adicionalmente por ELLSA.

Por PAGE (Figura 11) se observa para la fracción retenida y eluida a pH 11,4 en cromatografía de afinidad sobre soporte con asialomucina, una banda mayoritaria de aproximadamente 37 kDa, algunas veces se observa una banda de aproximadamente 70kDa que puede ser un agregado de la lectina concordando así con las observaciones realizadas por Vega (2004).

Teniendo en cuenta los hallazgos de Vega (2004) en función de inhibición de eritroaglutinación y elución de la fracción retenida en cromatografía de afinidad con GalNAc 200 mM se encontró que efectivamente se trata de las mismas bandas, que se obtienen en electroforesis Tris-Tricina, mediante elución por pH 11,4. Se observaron también bandas adicionales contaminantes. Aunque la elución con solución de GalNAc serviría como método menos drástico que el de pH básico, no se utilizó en el desarrollo de este trabajo debido a la poca cantidad de proteína que se reporta (Vega, 2004), a los altos costos del azúcar y a la frecuente presencia de contaminantes que absorben en el UV.

Para evaluar la actividad de la lectina se utilizaron eritrocitos Tn debido a que según reportes realizados por Vega (2004) estas lectinas no aglutinan eritrocitos A,B,O o T y si lo hacen con eritrocitos Tn. Se encontró que se necesita 12 ug de lectina para obtener una actividad de más 4 y 0,1 ug como la mínima cantidad de proteína para obtener actividad; los resultados concuerdan con lo expuesto por Vega (2004) que reporta 8 ug como la cantidad de proteína que se necesita para tener actividad eritroaglutinante de +4 y 0,06 ug como la mínima cantidad de proteína para obtener actividad. Las actividades por inhibición con carbohidratos no se ven afectadas por Glc, Gal ni GalNH₂ (Sanchez, 2003), (Vega,1997); como el mejor inhibidor se reportó (Vega, 2004) la N-acetil-D-galactosamina, lo que indica que el grupo acetil es importante para la actividad de la Lectina aunque con resultados recientes obtenidos mediante Microareglos de carbohidratos por Vega (2009) se comprueba lo contrario: es decir, se demuestra especificidad por parte de la lectina al antígeno Tn y no al GalNAc únicamente, las observaciones realizadas por la autora (como se explicará mas adelante) permiten pensar que el enlace O-glicosidico entre el GalNAc y la Serina o Treonina, juega un papel importante para el reconocimiento por parte de la lectina. La Mucina Submaxilar Ovina (MSO) inhibió la actividad de la lectina 3700 veces más que la GalNAc. Cuando se desialiló la Mucina Submaxilar Bovina (aMSB) la capacidad de inhibición se reporta como 8250 veces mayor que la de GalNAc debido a que se coloca gran cantidad de antígeno Tn en su superficie bajo estas condiciones (>>53%) (Wu et al.,2003). Estos reportes muestran la alta afinidad de la lectina por el antígeno Tn concordando por lo observado por Wu et al (2004) con la lectina de V vB4 y otras lectinas; con este efecto la afinidad de la lectina se incrementa notablemente cuando hay un gran numero de determinantes antigénicos dispuestos en grupos. Estos resultados sustentan la utilización del soporte aMSB-Sepharosa 4B como herramienta para la purificación de la lectina.

Con el objetivo de evaluar la especificidad de la lectina de *Salvia bogotensis* Vega llevó a cabo un análisis preliminar para determinar la especificidad más detallada de la LSBo empleando microarrays versión 4.2 (Propiedad intelectual del grupo “Lectin Application and Analysis Team” Tsukuba, Japón); el glicoarreglo contiene glicanos multivalentes tales como glicoproteínas naturales, neoglicoproteínas y glicanos conjugados a poliacrilamida (PAA) o BSA. Los ensayos se realizaron siguiendo la metodología descrita por Kuno et al, (2005); Uchiyama et al, (2008); Tatenno et al, (2008). El análisis mostró que la LSBo reconoce antígeno Tn (α -GalNAc-Ser/Thr) expuesto en asialo mucina submaxilar bovina (aMSB) y no reconoce solamente el epítipo α -GalNAc tal como había sido descrito previamente (Vega y Pérez, 2006); por otra parte se observó que la LSBo mostró preferencia por los disacáridos GalNAc α 1-3GalNAc (Di-GalNAc) y con menor extensión por GalNAc α 1-4GlcNAc (LDN). El análisis también mostró que la fracción retenida en cromatografía de afinidad sobre aMSB tiene la capacidad de reconocer glicanos tipo High Mannose (epítipo rico en Manosa) especialmente el proveniente de la estructura de invertasa. Con el objetivo de corroborar los resultados se procedió a realizar cromatografía de afinidad con Invertasa acoplada a Sepharosa 4B. Se sembraron fracciones retenidas y eluidas a pH 11,4 obtenidas en cromatografía de afinidad sobre soporte de asialo Mucina Submaxilar Bovina tal como se mostró en la Figura 12, luego de dializar y liofilizar, las muestras fueron equilibradas en PBS pH 7,2 150 mM NaCl, después de la elución de la fracción no retenida se procedió a eluir la lectina con PBS 0,2 M Metil Manosido (Me Man). El perfil cromatográfico obtenido se muestra en la Figura 13.

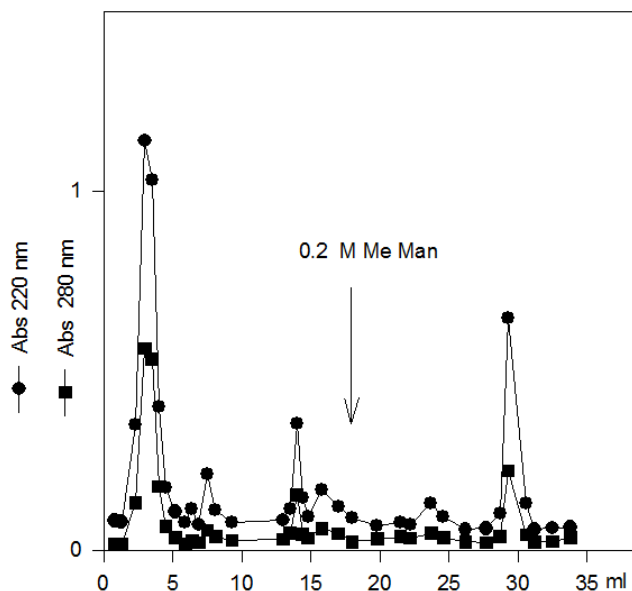


Figura 13. Cromatografía de afinidad LSBo- Invertasa-Sepharosa 4B

En la electroforesis (Figura 14) se presenta el patrón de bandeo de la muestra no retenida obtenida luego de realizar cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-Invertasa a la fracción retenida en cromatografía de afinidad sobre asialo Mucina Submaxilar Bovina (Figura 12) tal como se muestra en la Figura 8. Se observan bandas de aproximadamente 70 y 35 kDa concordando con el perfil obtenido con la lectina pura de la Figura 11 lo que permite pensar que se trata de las dos bandas reportadas para la lectina de *Salvia bogotensis* las que estas siendo parte de la fracción no retenida, las otras bandas visibles, posiblemente son el resultado de la elución de impurezas la del soporte (Sepharosa 4B-Invertasa) debido a que inicialmente no aparecían en las muestras sembradas.

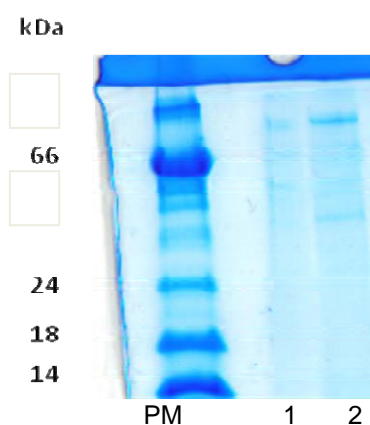


Figura 14. SDS-PAGE de diferentes cantidades de lectina no retenida en soporte Invertasa Sepharosa 4B.

En el caso de la fracción retenida en cromatografía sobre invertasa el resultado del control electroforético muestra proteínas de bajo peso molecular que no aparecen en la fracción no retenida (Figura 15); es decir, es posible que estas proteínas de bajo peso sean las que están reconociendo manosa por parte de la fracción retenida en cromatografía sobre asialo Mucina Submaxilar Bovina obtenida tal como se muestra en la figura 12. La presencia de diferentes bandas a lo largo del perfil confirma la presencia de proteínas contaminantes en el soporte.

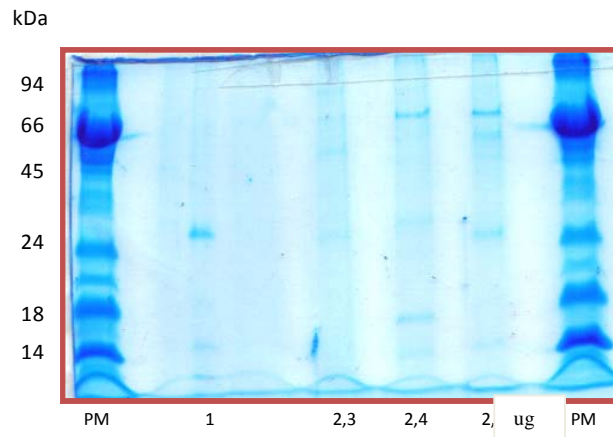


Figura 15. SDS-PAGE de diferentes cantidades de lectina retenida en soporte Invertasa Sepharosa 4B.

5.2. Aislamiento de la mucina citoplasmática.

El procedimiento para aislar proteínas ricas en antígeno Tn se resume en la Figura 9. Esperando que la lectina de *Salvia bogotensis* reconozca algunas glicoproteínas alteradas en las líneas celulares HeLa y MCF-7 que expresan en su superficie el antígeno Tn, se realizaron ensayos exploratorios en un primer experimento para obtener información sobre las proteínas citoplasmáticas que eran reconocidas por la lectina de *Salvia bogotensis* (LSBo) tal como había sido evidenciado por estudios previos de citoquímica con las líneas celulares HeLa y MCF-7 (Vega, 2004); para ello fué necesario obtener, por ultracentrifugación del lisado total, la fracción citoplasmática de estas líneas celulares para evitar contaminaciones con proteínas de membrana que tengan el antígeno Tn dentro de su estructura y de otros organelos. Para obtener el extracto citoplasmático se siguió la metodología descrita por Vega (2004); Posteriormente estas fracciones fueron analizadas por PAGE-SDS. El total de proteína citoplasmática recuperado se presenta en la Tabla 7.

Fracción	MCF-7			HeLa		
	ml	mg Totales de proteína	Concentración (mg/ml)	ml	ug Totales de proteína	Concentración (mg/ml)
Fracción Citoplasmática I	12	5,4	0,450	12	2,56	0,213
Fracción Citoplasmática II*	7	1,5	0,215	4	0,520	0,130
Fracción Citoplasmática III	13,5	8,64	0,64	14,5	11	0,76

Tabla 7. Fracciones citoplasmáticas obtenidas por ultracentrifugación

*Fracción obtenida luego de resuspender y repetir el procedimiento con el Pellet de la primera ultracentrifugación.

En el homogenizado y la fracción citoplasmática III de MCF-7 y de HeLa (Tabla 7), se evidencia una gran cantidad de bandas mayoritarias entre 20-66 kDa por SDS-PAGE lo que habla de la diversidad de las proteínas posiblemente encontradas en citoplasma de las dos líneas celulares (Figura 16).

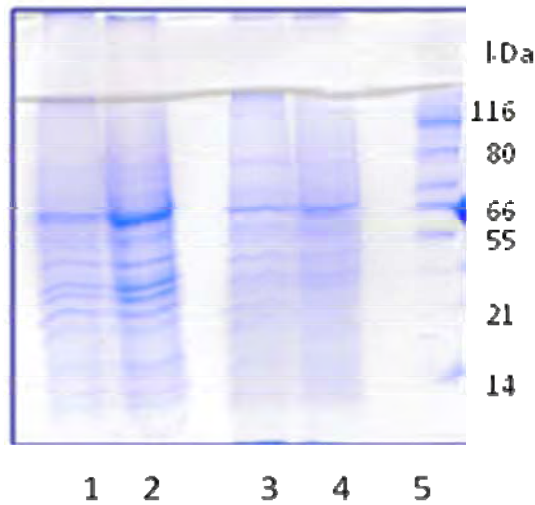


Figura 16. SDS-PAGE de fracciones citoplasmáticas de las líneas celulares HeLa y MCF-7. 1) 30 ug de Fracción citoplasmática MCF-7, 2) 60 ug de Fracción citoplasmática MCF-7, 3) 30 ug de Fracción citoplasmática HeLa. 4) 60 ug de Fracción citoplasmática HeLa y 5) Marcadores de Peso Molecular.

Las fracciones citoplasmáticas se evaluaron por Dot-blot con LSBo-biotinilada para detectar proteínas que presentaran el antígeno Tn; se colocaron 5 ul por punto de cada una de las fracciones, la lectina reconoció proteínas portadoras del antígeno en las fracciones de las dos líneas celulares (Figura 17)

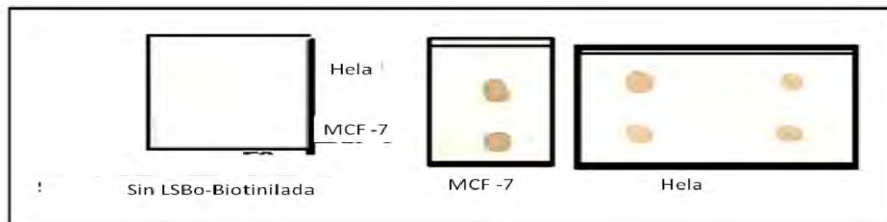


Figura 17. Detección de proteínas portadoras de Antígeno Tn en los Extractos citoplasmáticos

En los extractos citoplasmáticos también se detectó con la lectina de germen de trigo la presencia de proteínas que tienen en su estructura ácido siálico y N-acetilglucosamina (GlcNAc); estas glicoproteínas podrían ser portadoras del antígeno Sialil-Tn que también se expresa en células tumorales. Con la lectina VVB4 se corroboró la presencia de proteínas portadoras del antígeno Tn en los extractos citoplasmáticos de estas dos líneas celulares (Figura 18).

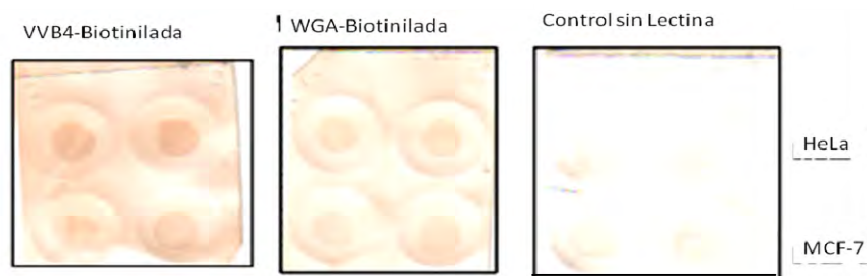


Figura 18. Detección de Proteínas portadoras de Acido Sialico, N-acetilglucosamina y antígeno Tn.

En el año 2006 Vega y Perez (2006) reportan el reconocimiento por parte de lectina de *Salvia bogotensis* del antígeno Tn presente en la asialo Mucina Submaxilar Bovina (aMSB), esta misma lectina fue utilizada para reconocimiento de proteínas a nivel citoplasmático en líneas celulares HeLa y MCF-7. Con estos antecedentes se utilizó la lectina de *Salvia bogotensis* para aislar proteínas citoplasmáticas ricas en antígeno Tn derivadas de las líneas celulares HeLa y MCF-7. Para ello se fijo la lectina a un soporte de Sepharosa 4B mediante aminación reductiva obteniendo porcentajes de acoplamiento muy variable entre el 20 y 60 % aproximadamente (Tabla 8).

GEL (ml)	Proteína Acoplada (mg)	Porcentaje de acoplamiento
7	1,05	62,9
6	0,80	21,6
1,5*	982	92,2

Tabla 8. % de acoplamiento de LSB0-Sepharosa 4B mediante aminación reductiva.
*Soporte descrito en tabla 9

Luego del acoplamiento se realizó cromatografía de afinidad de extractos citoplasmáticos derivados de HeLa y de MCF-7 sobre este soporte que fue equilibrado con PBS pH 7,2. Luego de la elución en condiciones de equilibrio y posterior elución en gradiente de pH (2,5 -11,4) mediante la utilización de diferentes buffer (Gly pH 2.5, Tris pH 8.8 y Tris OH pH 11.4) se obtuvieron tres o cuatro picos mayoritarios (Figura 19). El primero corresponde a la fracción no retenida representada por proteínas carentes del antígeno Tn y los restantes corresponden a fracciones con proteínas que han sido retenidas por acción de la lectina; es decir, están representadas por proteínas citoplasmáticas con antígeno Tn.

En la Figura 19 se observan los perfiles de las cromatografías de afinidad obtenidos con las fracciones citoplasmáticas de las dos líneas celulares. La elución de las fracciones retenidas se hizo con un gradiente discontinuo de pH; la gran mayoría de la proteína retenida se eluyó a pH 2,5 y 8,8; estas últimas fracciones fueron neutralizadas con Tris OH pH 11,4..

La LSBo presentó afinidades diferenciales sobre el soporte probablemente por la densidad del antígeno Tn y su disposición en grupos sobre la Mucina. Las lectinas aumentan su afinidad con la organización de los antígenos en grupos como se observó con varias mucinas submaxilares aisladas de mamíferos (Wu et al, 2004). Con cada una de las fracciones obtenidas para las dos líneas celulares se observó por electroforesis (Figura 20) una banda mayoritaria de aproximadamente 70 kDa; en las fracciones eluidas a pH 11.4 se observaron algunas bandas de menor peso molecular (24,16,10 kDa) que probablemente corresponden a fragmentos de las proteínas de alto peso molecular susceptibles a degradación a pHs básicos y/o a otras proteínas que no necesariamente son de tipo mucina pero que expresan el antígeno Tn.

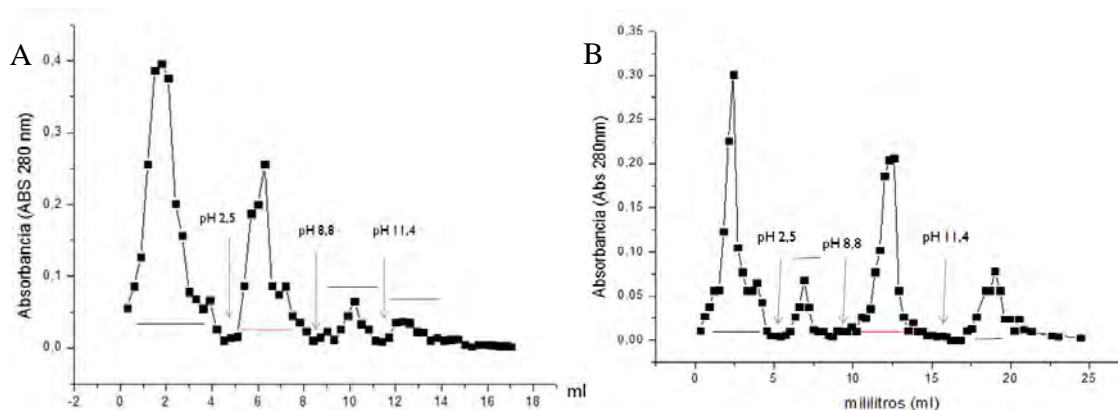


Figura 19. Cromatografía afinidad sobre LSBo sepharosa 4B de la fracción citoplasmática . A) Línea Celular HeLa. B) Línea Celular MCF-7.

Con el objeto de obtener extractos y proteínas purificadas por afinidad para realizar ensayos posteriores, el procedimiento fue realizado una vez más (Fracción Citoplasmática III) a partir de 5×10^6 células MCF-7 y 2×10^6 células HeLa y para cada lisado se determinó la concentración de proteína (Tabla 7); las fracciones citoplasmáticas fueron concentradas por ultrafiltración con Amicon PM-10 y los concentrados se sometieron a cromatografía de afinidad sobre 1,2 ml de soporte LSBo - Sepharosa 4B preparado según lo descrito por Iwaky (Vega, conversación personal); la lectina fue inmovilizada empleando Sepharosa 4B activada con NHS en un buffer 0.2 M NaHCO_3 , 0.5 M NaCl, pH 8.3, durante 24

horas. La cantidades de lectina empleada, acopladas y el % de acople se muestran en la Tabla 9.

Vol Inicial (ml)	Concentración Inicial (ug/ml)**	Ug de proteína Iniciales	Vol Final filtrado (ml)*	Conc Final (ug/ml)	Ug Totales no acoplados	ug Acoplados	mg LSBo /ml Gel	% Acople
1,5	710	1065	1,2	78	93,6	982	1,4	92.2

Tabla 9. Cantidad de proteína acoplada en tercer soporte.

** La LSBo aglutino eritrocitos Tn (35 µg, +4)

*Luego de las 24 horas de interacción el sobrenadante fue recuperado y dializado para cuantificación

El porcentaje de acoplamiento obtenido muestra que probablemente este último soporte tiene buena capacidad de retención de las glicoproteínas que son reconocidas por la LSBo y por lo tanto se pueden utilizar cantidades importantes de las fracciones citoplasmáticas para aislarlas. En la Tabla 10 se presentan las concentraciones y cantidad de proteína retenida y eluida a diferentes pH, es evidente la buena capacidad de retención cuando observamos la cantidad de proteína de la fracción eluida a pH 2,5.

Linea Celular	Proteína (mg/ml)	Volumen Fracción (µl)
MCF-7		
1. Fracción no retenida	3.0	400
2. Fracción eluida pH 2,5	0,098	100
3. Fracción eluida pH 8,8	1,57	100
4. Fracción eluida pH 11,4	0,1	100
HeLa		
1. Fracción no retenida	2,31	200
2. Fracción eluida pH 2,5	1,7	100
3. Fracción eluida pH 8,8	0,117	100
4. Fracción eluida a pH 11,4	0,086	100

Tabla 10. Separación de Glicoproteínas citoplasmáticas sobre LSBo-Sepharosa 4B

Los perfiles cromatográficos obtenidos fueron muy similares a los del experimento anterior y corroboran la presencia de proteínas que interactúan con el soporte, presentan el mismo peso molecular pero diferentes afinidades hacia él, lo que

indica además de la existencia de proteínas ricas de antígeno Tn en fracciones citoplasmáticas, un posible polimorfismo de ellas. Al evaluar las fracciones eluidas por electroforesis se encontró una banda predominante de aproximadamente 70 kDa en las diferentes fracciones eluidas, como se ve en la Figura 20 tanto de HeLa como de MCF-7. Dado que las mucinas se han descrito como glicoproteínas de alto peso molecular oscilando desde 100 hasta 2000 kDa, es posible que la banda de 70 kDa sea una mucina poco glicosilada concordando con lo expuesto por otros autores (Croce et al, 2003; Freire et al, 2005).

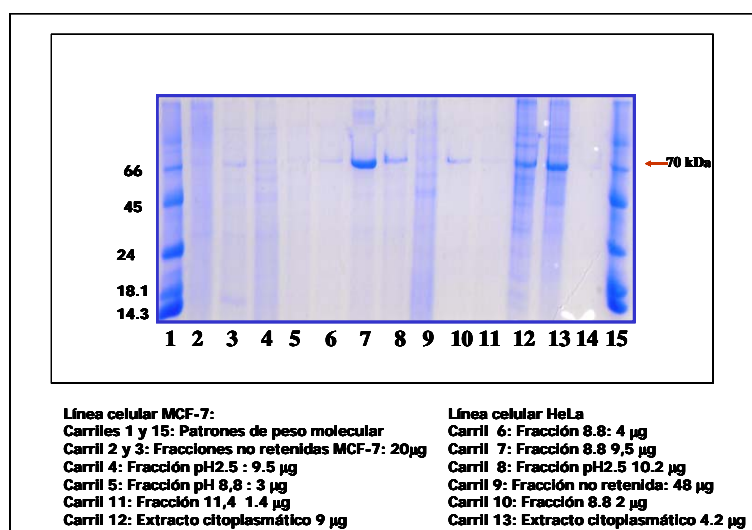


Figura 20. Electroforesis de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad con LSBo-Sepharosa 4B de fracciones citoplasmáticas.

Para evaluar la presencia de glicoproteínas con antígeno Tn se procedió a evaluar las fracciones obtenidas en la etapa anterior con Isolectina B4 de *Vicia villosa*, lectina de *Salvia bogotensis* y otras lectinas biotiniladas para lo cual se siguió la metodología descrita por Wu et al (1995 a) teniendo en cuenta que la lectina biotinilada muestra señal hasta dilución de 1:65536 (Vega, 2004), mostrando que es una herramienta de una alta sensibilidad para los ensayos de reconocimiento del antígeno Tn . Se realizó la técnica de dotblot en membranas de nitrocelulosa. Luego de revelar se encontró un reconocimiento de la lectina de *Vicia villosa* lect hacia las diferentes fracciones citoplasmáticas (Figura 21).

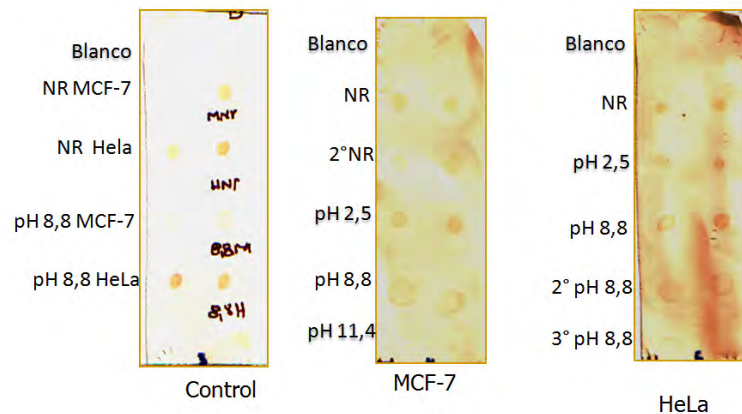


Figura 21. DOT BLOT realizado con fracciones citoplasmáticas de líneas celulares HeLa y MCF-7 resultantes de cromatografía de afinidad sobre soporte de LSBo-Sepharosa 4B identificadas con Lectina de *Vicia villosa* Isolectina B4 biotinilada.

Se encontró que efectivamente existe un reconocimiento por parte de VvB4 hacia las fracciones eluidas, especialmente las que lo hicieron a un pH de 8,8; es decir, se está reconociendo el antígeno Tn de algunas glicoproteínas, para estar seguro de dicho reconocimiento se evaluaron las fracciones eluidas también mediante ELISA con VvB4 y LSBo.

Los resultados obtenidos mediante ELISA utilizando la lectina *Vicia villosa* mostraron un reconocimiento por parte de la isolectina hacia las fracciones citoplasmáticas eluidas en gradiente de pH tanto para las fracciones que lo hicieron en HeLa y en MCF-7 (Figura 22). Como control positivo se realizaron los ensayos con asialo Mucina Submaxilar Bovina mostrando que efectivamente las observancias obtenidas después de revelado son sustancialmente altas en comparación con las presentadas por las fracciones eluidas indicando la diferencia del reconocimiento entre las fracciones eluidas en comparación con las obtenidas con asialo Mucina Submaxilar Bovina. Posiblemente esta diferencia se debe a que las proteínas derivadas de fracciones citoplasmáticas eluidas en el gradiente de pH no poseen la riqueza estructural de antígeno Tn que si presenta la aMSB. Los resultados obtenidos mediante la evaluación de las Absorbancias de las fracciones no retenidas muestran que también hay un reconocimiento de la isolectina hacia esta fracción indicando que no toda las glicoproteínas con antígeno Tn se están fijando al soporte. En este sentido es importante recromatografiar las fracciones no retenidas varias veces hasta encontrar la ausencia de reconocimiento por parte de la lectina hacia las fracciones no retenidas.

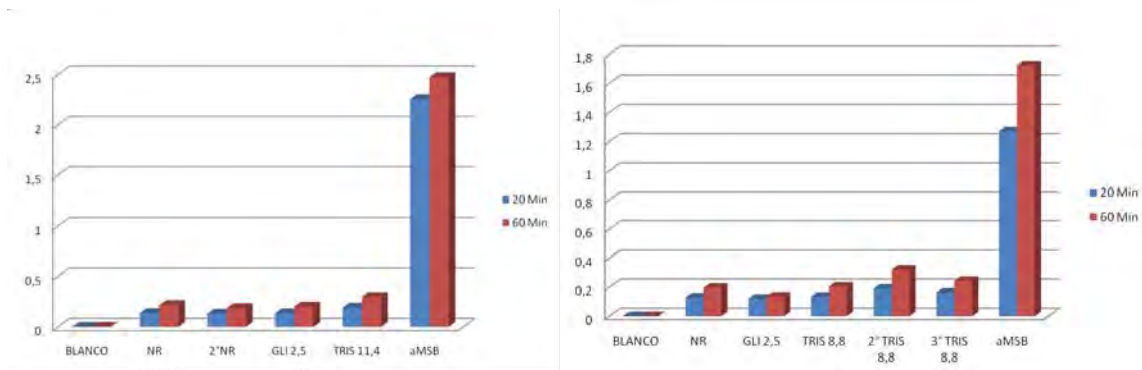


Figura 22. Interacción entre diferentes fracciones de Mucina citoplasmática de MCF-7 (Izquierda) y HeLa (derecha) con isolectina B4 de *Vicia villosa* biotinilada

Al comparar el perfil de reconocimiento de la lectina de *Salvia bogotensis* (Figura 23) con los resultados obtenidos con la isolectina de *Vicia villosa*, se encontró que efectivamente existe un reconocimiento de la lectina hacia las diferentes fracciones obtenidas y eluidas en el gradiente de pH. La utilización de las lectinas para evaluar características de glicoproteínas y de gliconjugados es una estrategia que cada vez adquiere mayor importancia. El grupo de Kuno ha utilizado lectinas que reconocen diferentes grupos de gliconjugados de tal manera que mediante el perfil de reconocimiento es posible evaluar las características de dicha proteína. La utilización de estas proteínas para el reconocimiento de gliconjugados (algunos de ellos antígenos tumorales) potencialmente será una herramienta útil para la evaluación diagnóstica o pronóstica del cáncer, aunque inicialmente en el desarrollo de este trabajo el principal objetivo para utilizarla ha sido el de aislar glicoproteínas con antígeno Tn de extractos citoplasmáticos derivados de las líneas celulares HeLa y MCF-7.

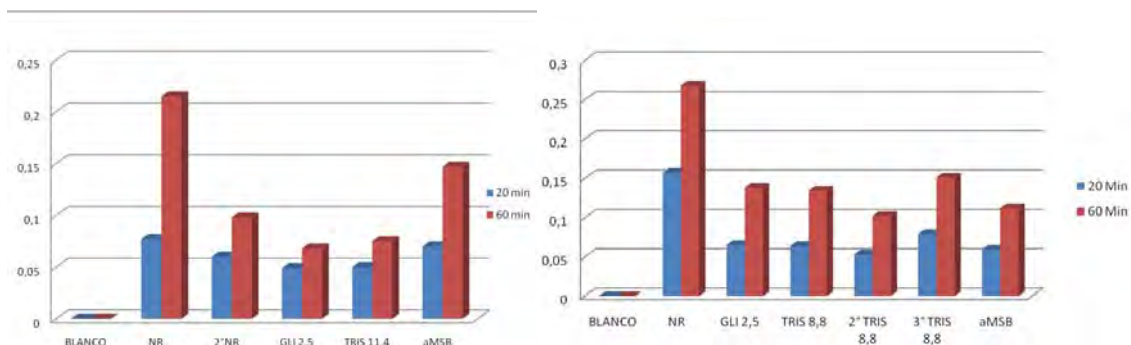


Figura 23. Interacción entre fracciones de mucina citoplasmática de MCF-7 (izquierda) y de HeLa (derecha) con lectina de *Salvia bogotensis* revelada con anticuerpos anti LSBo

5.3. Caracterización parcial de mucina citoplasmática.

Se realizó Western blot según Freire y colaboradores (2005) con el objetivo de comprobar que la glicoproteína eluida se trataba de una tipo mucina en fracción citoplasmática (Figura 24 y 25). Los resultados indican el reconocimiento por parte de un anticuerpo policlonal (anti MUC2) hacia diferentes fracciones retenidas y eluidas en gradiente de pH derivadas de HeLa y MCF-7. Los resultados obtenidos mediante los Dot blot utilizando el anticuerpo policlonal contra MUC1 (Figura 27) resultan negativos y por ello no se utilizó para Western.

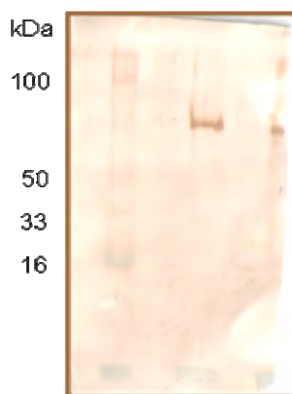


Figura 24. Western blot utilizando 7 ug de la muestra eluida a pH 2.5 del extracto citoplasmático de HeLa con 10 ug /ml de anti MUC-2

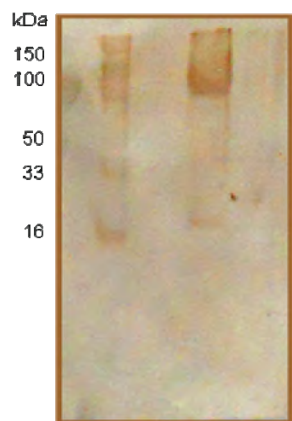


Figura 25. Western blot utilizando 11 ug de la muestra eluida a pH 8,8 del extracto citoplasmático de MCF-7 con 10 ug /ml de anti MUC-2

La limpieza y definición de la banda indican un adecuado y eficiente método de separación de la glicoproteína lo cual constituye una mejora significativa teniendo en cuenta que en trabajos anteriores, esta definición no había logrado. En el año 2002 (Faure et al, 2002) se describe una Mucina de alto peso molecular (< de 120 kDa) difícilmente definida por SDS-PAGE obtenida mediante la técnica de filtración por gel sobre homogenizados celulares de tejido epitelial del intestino de ratón. En el año 2003 el grupo de Croce (2003) describe una banda muy poco definida y de aproximadamente 30 kDa reconocida por anticuerpos monoclonales que reconocían la secuencia C terminal de Muc 1 (MAb CT2) luego de traspasar a membrana de nitrocelulosa fracciones citoplasmáticas y de membrana provenientes de MCF-7 derivadas de centrifugación diferencial. A diferencia de los trabajos anteriores Freire y colaboradores (2005) reportan una banda muy limpia de aproximadamente 45 kDa reconocida por anticuerpos policlonales AntiMUC 6 y 83D4 (anticuerpo que reconoce Tn) luego de ser tratadas las fracciones citoplasmáticas en cromatografía de afinidad, al igual que él, nosotros reportamos una banda limpia de aproximadamente 63 kDa según determinación por movilidad electroforética relativa (Figura 26 y Anexo 6) producto del tratamiento sobre las fracciones citoplasmáticas (I,II y III) de cromatografía de afinidad utilizando la lectina de *Salvia bogotensis*, los resultados muestran que la cromatografía de afinidad es la mejor estrategia hasta ahora reportada para obtener fracciones de tipo mucina electroforéticamente definidas.

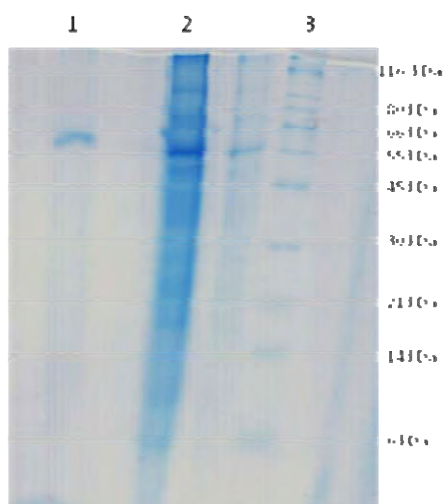


Figura 26. PAGE-SDS utilizado para determinar el peso molecular de la glicoproteína aislada de HeLa. 1) 15 ug de fracción retenida y eluida a pH 2,5. 2) 30 ug de Extracto citoplasmático de HeLa, 3) patrones de peso molecular.







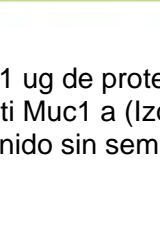
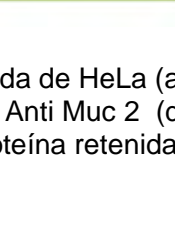
Muestra	Anti Muc 1	Anti Muc 2
Blanco		
HeLa pH 2,5		
MCF-7 pH 2,5		
Blanco		
HeLa pH 8,8		
MFC-7 pH 8,8		
Blanco		
HeLa pH 11,4		
MCF-7 pH 11,4		

Figura 27. Dot Blot obtenidos al sembrar 1 ug de proteína retenida de HeLa (abajo) y de MCF-7 (arriba) utilizando anticuerpos. Anti Muc1 a (Izquierda) y Anti Muc 2 (derecha). Como blancos se utilizo el resultado obtenido sin sembrar la proteína retenida.

Para evaluar algunas particularidades moleculares de la proteína se procedió a utilizar diferentes lectinas con el objetivo de describir según su reconocimiento, el perfil de glicosilación de la proteína tipo mucina encontrada en citoplasma.

Para la comprensión del significado del reconocimiento de las lectinas biotiniladas se presenta un cuadro con el género y la especie de las plantas de las que provienen; así como su sigla y el epítipo que reconocen (Tabla 11).

Lectina	Nombre	Especificidad
WGA	<i>Triticum aestivum</i>	Acido sialico
AHL	<i>Amarantus hypocondriacus</i>	Antígeno T
DLL-P2	<i>Dioclea lehmanni</i> II	H2 Tipo
MAL	<i>Maackia amurensis</i>	α 2-6 acido Sialico
VVB4	Isolectina B4 de <i>Vicia villosa</i>	Antígeno Tn
GAL	<i>Galactia lindenni</i>	α -L -Fuc (1-2)- β -D -Gal (1-4)- β -D -GlcNAc-O-R
LSBo	<i>Salvia bogotensis</i>	Antígeno Tn

Tabla 11. Lectinas con las que se obtuvo revelado positivo en ensayos Dot-Blot

A continuación se presentan los resultados obtenidos al evaluar mediante dotblot, el reconocimiento por diferentes lectinas de las proteínas retenidas y eluidas en gradiente de pH discontinuo. El patrón de siembra (Tabla 12) fue el mismo para todos y se utilizo el PBS como blanco y la Albumina Sérica Bovina (BSA) como control Negativo.

PBS	BSA
Fracción Citoplasmática	Fracción Citoplasmática
1ug Fracción Retenida	1ug Fracción Retenida

Tabla 12. Se presenta el patrón de sembrado de las fracciones citoplasmáticas, las retenidas, el control (BSA) y el blanco (PBS)

La diferencia de señal obtenida con las diferentes lectinas posiblemente se debe a diferencias de afinidades con respecto a las muestras, este principio permite realizar una evaluación cualitativa sobre la conformación y distribución de las proteínas que están siendo reconocidas, de tal manera que según los resultados se puede afirmar que existe gran cantidad de proteínas tipo mucina con glicosilación que involucra residuos de GlcNAc y Acido sialico (ver Figura 28 (WGA)) por presentar una señal muy notoria en la fracción retenida y eluida a pH 2,5 de HeLa. El antígeno T (ver Figura 28 (AHL)) está presente tanto en las fracciones retenidas y citoplasmáticas pero con mayor prevalencia en la fracción retenida evidenciando la eficiencia de reconocimiento por la lectina acoplada a la columna; así mismo, la presencia de antígeno tipo H2 ((1-2)- β -D -Gal (1-4)- β -D -GlcNAc-O-R) al parecer no es prevalente en la estructura de la proteína tipo mucina en general, pero si lo es con la eluida a pH 2,5 derivada de la fracción citoplasmática de HeLa (Figura 28, 29 y 30); es decir, la proteína eluida no es la misma en las diferentes fracciones.



Figura 28. Dot Blot donde se evalúa el reconocimiento por diferentes lectinas biotiniladas de fracciones citoplasmáticas y eluidas a pH 2,5 de HeLa. Soluciones 20 ug /ml de cada lectina. Las concentraciones de las muestras se muestran en Tabla 10.

El reconocimiento por parte de VVB4 (Figura 21) hacia fracciones no retenidas, indica la presencia del antígeno Tn en glicoproteínas no fijadas por el soporte y por ende la necesidad de realizar recromatografía sobre estas. También es evidente que los resultados obtenidos con las otras lectinas (Figura 29 y 30) (GAL, LAH, WGA, LSBo y MAL) indican la posible presencia de otras glicoproteínas además de la mucina en las fracciones citoplasmáticas según los resultados obtenidos por Yi y colaboradores en el año 2010 (Yi et al, 2010). Los autores utilizaron la lectina fungica proveniente de *Agrocybe aegerita* (AAL) mediante cromatografía de afinidad con el objetivo de aislar la proteína MRG15 proveniente de fracción citoplasmática de HeLa involucrada con procesos de apoptosis. Los resultados obtenidos en este trabajo y por Yi et al (2010) corroboran que posiblemente existe diversidad de glicoproteínas en citoplasma en algunas líneas celulares cancerosas.



Figura 29. Dot Blot donde se evalúa el reconocimiento por diferentes lectinas biotiniladas de fracciones citoplasmáticas y eluidas a pH 8,8 de HeLa. Soluciones 20 ug /ml de cada lectina y 5 ul por punto del extracto citoplasmático y 3 ul por punto de cada fracción retenida. Las concentraciones de las muestras se muestran en Tabla 10.



Figura 30. Dot Blot donde se evalúa el reconocimiento por diferentes lectinas biotiniladas de fracciones citoplasmáticas y eluidas a pH 8,8 de MCF-7. Soluciones 20 ug /ml de cada lectina y 5 ul por punto del extracto citoplasmático y 3 ul por punto de cada fracción retenida. Las concentraciones de las muestras se muestran en Tabla 10.

Griffiths et al (1987) detectaron por microscopía electrónica con anticuerpos monoclonales, mucina citoplasmática (Muc-1) y extracelular en varias líneas derivadas de cáncer de mama y por western-blot las mismas bandas en la línea celular T47-D en donde se encontraron componentes de bajo peso molecular, una glicoproteína de 68 kDa. La detección con LSBo en la fracción 8,8 de una glicoproteína mayoritaria de 63 kDa está de acuerdo con los trabajos previos (Springer et al, 1988; Croce et al, 2001; 2003) y sugiere que una de las proteínas reconocidas por la lectina podría ser una mucina citoplasmática esto se confirma por el reconocimiento por western blot por el anticuerpo anti Muc-2. Para Harding (1989) las mucinas son proteínas heterogéneas de alto PM, sus subunidades están unidas por puentes disulfuro a un "core" central de proteína; en condiciones reductoras se observan subunidades de alto peso molecular y un "core" de 70 kDa. Algunos autores proponen que las subunidades de bajo PM se pueden presentar por degradación proteolítica o mecánica durante el proceso de extracción. En el año 2003 el grupo de Croce (Croce et al, 2003) reporta el reconocimiento por parte del anticuerpo monoclonal mAb CT2 hacia una secuencia C terminal propia de MUC 1 en extractos citoplasmáticos de la línea celular MCF-7; el autor describe una banda de aproximadamente 30 kDa que aparece en extractos citoplasmáticos luego de centrifugación y ultracentrifugación fraccionada. En el año 2005 el grupo de Freire (Freire et al, 2005) reporta una banda de aproximadamente 45 kDa que es reconocida por anticuerpo policlonal anti-MUC 6.1 y anti-MUC 6.2 provenientes de extractos citoplasmáticos derivados de la línea celular MCF-7 y anticuerpo monoclonal mAb 83D4 que reconoce el antígeno. Es decir, hay evidencia que indica la presencia de mucinas citoplasmáticas en extractos citoplasmáticos dado por el reconocimiento de secuencias específicas propias de mucinas y además en el reconocimiento del antígeno Tn. En concordancia con los resultados obtenidos por Vega (2009) que reporta utilizando la técnica de lectin-microarray extractos citoplasmáticos derivados de las líneas celulares HeLa y MCF-7 con Glicoproteínas O-glicosiladas. En el presente trabajo además de aislar una proteína de 63 kDa (Figura 26), se

reportan algunas particularidades moleculares de la mucina. Con los resultados de Dot Blot se puede afirmar que la proteína en estudio, además de presentar en su estructura el antígeno Tn (Figura 28,29 y 30 ver VVB4 y LSBo), también posee estructuras sialiladas según resultados obtenidos con WGA, además es evidente la presencia de galactosa unida al antígeno Tn como se observa con los resultados obtenidos con AHL. Al parecer las células transformadas no pierden completamente la actividad de sus glicosil transferasas , sino que posiblemente ellas sufren alteraciones en el perfil de sus patrones de glicosilación. Tal vez estos cambios tengan un significado biológico para la supervivencia y desarrollo de la enfermedad, por lo cual los estudios enfocados en este campo son pertinentes y necesarios. Se demuestra la presencia de proteínas tipo mucina reconocidas por anti Muc2 proveniente de fracciones citoplasmáticas de HeLa y de MCF-7. La presencia de la mucina ha sido reportada principalmente en colon, intestino delgado, tumor de colon, de bronquios, de cérvix y de glándulas mamarias (Croce et al, 2001), pero hasta ahora se empiezan a reportar como presentes posiblemente en fracción citoplasmática (Freire et al, 2005 ; Croce et al, 2007). Es posible que con el estudio de este grupo de glicoproteínas se llegue a avances importantes con respecto a proteínas que sirvan como objeto de estudio de pruebas diagnosticas o pronosticas del cáncer; a si mismo, que se ahonde en esfuerzos que permitan el desarrollo de la lectinología y la lectinómica por encontrar en las lectinas una demostrada herramienta para el estudio de otras moléculas. Para evaluar el punto isoeléctrico de la proteína aislada en cromatografía de afinidad se procedió a realizar electroforesis con anfolitos según como lo describe Olmos y colaboradores (1997) con algunas modificaciones realizadas por Ardila. Figura 31.

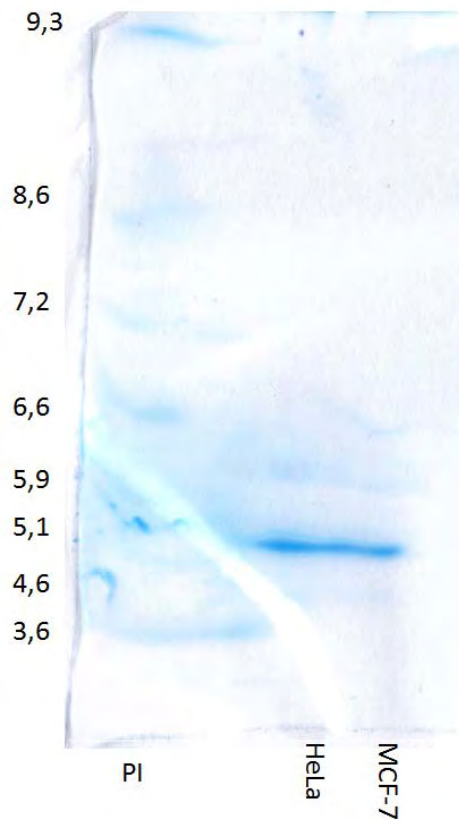


Figura 31. Electroforesis en gel T: 5% con anfólitos (pH 2-10). PI) marcadores de Punto Isoeléctrico, Hela) 5 ug de proteína eluida a pH 2,5 en cromatografía de afinidad. MCF-7) 5 ug de proteína eluida a pH 8,8 en cromatografía de afinidad.

El punto isoeléctrico evaluado para las dos proteínas fue de 5, algunas mucinas se han reportado como ácidas, lo cual es el resultado posiblemente de la asociación de la proteína con grupos sialicos propios de ella (figura 29) y radicales sulfato descritos anteriormente para mucinas ácidas (Lynch et al., 1972) . El reporte concuerda con los realizados por Salassa y Lespi en el año 2007, quienes por la técnica de Alcian Blue describen el reconocimiento de mucinas ácidas, luego por pruebas inmunohistoquímicas sobre muestras de metaplasia gástrica de la vesícula biliar determinan que algunas de ellas son MUC 2.

Para evaluar la diversidad de proteínas encontradas en el homogenizado de MCF-7 , así como la pertinencia del método de precipitación de proteína con fenol cloroformo y la eficiencia del protocolo de isoelectroenfoque, se procedió a realizar electroforesis bidimensional obteniendo como resultado el gel de la figura 32

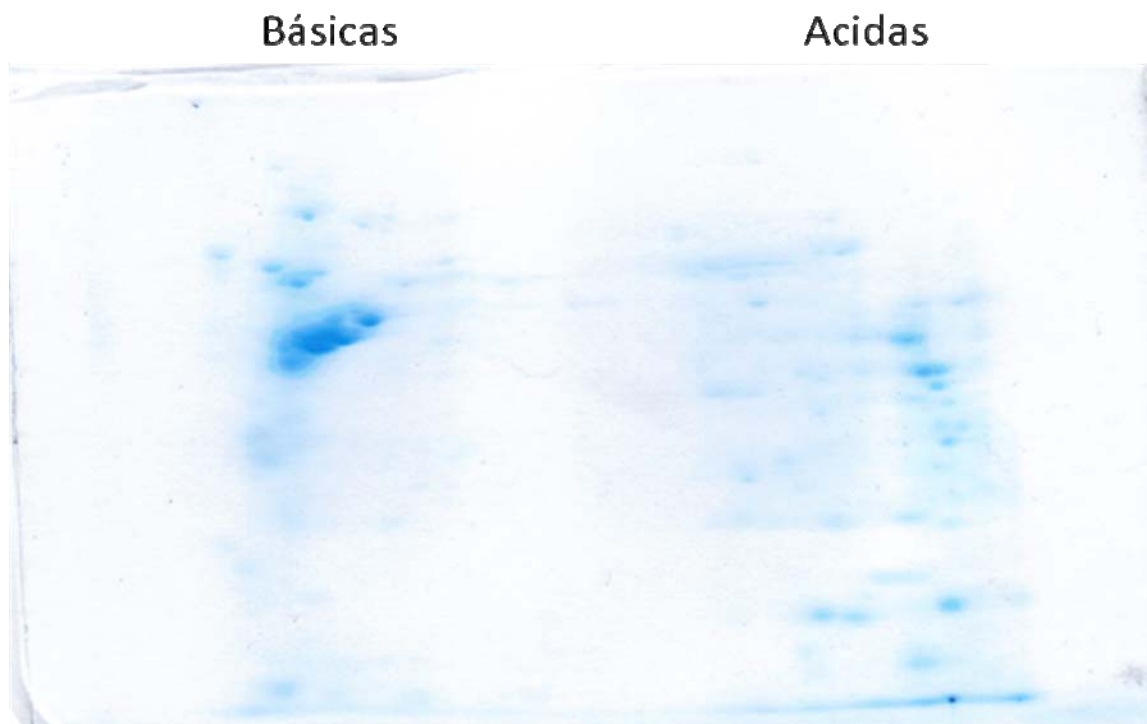


Figura 32. Electroforesis bidimensional de fracción homogenizada de MCF-7 utilizando 50 ug de proteína.

Se evidencia gran diversidad de proteínas con múltiples pesos moleculares, así mismo como de puntos isoeléctricos, principalmente se presentan proteínas cercanas a 70 kDa mayoritariamente con puntos isoeléctricos cercanos a 8, mientras que las proteínas acidas aparentemente son de menor peso molecular. La definición de los puntos posibilita diferenciar unas proteínas de otras aunque se distorsionan en el plano horizontal posiblemente por la presencia de sales lo cual indica la necesidad de realizar un par de lavados más con agua y metanol en el proceso de precipitación con el método de fenol cloroformo. Para evaluar el perfil de reconocimiento se realizó electroforesis bidimensional sobre las fracciones retenidas y eluidas a pH de 2,5 para HeLa y de 8,8 para MCF-7.

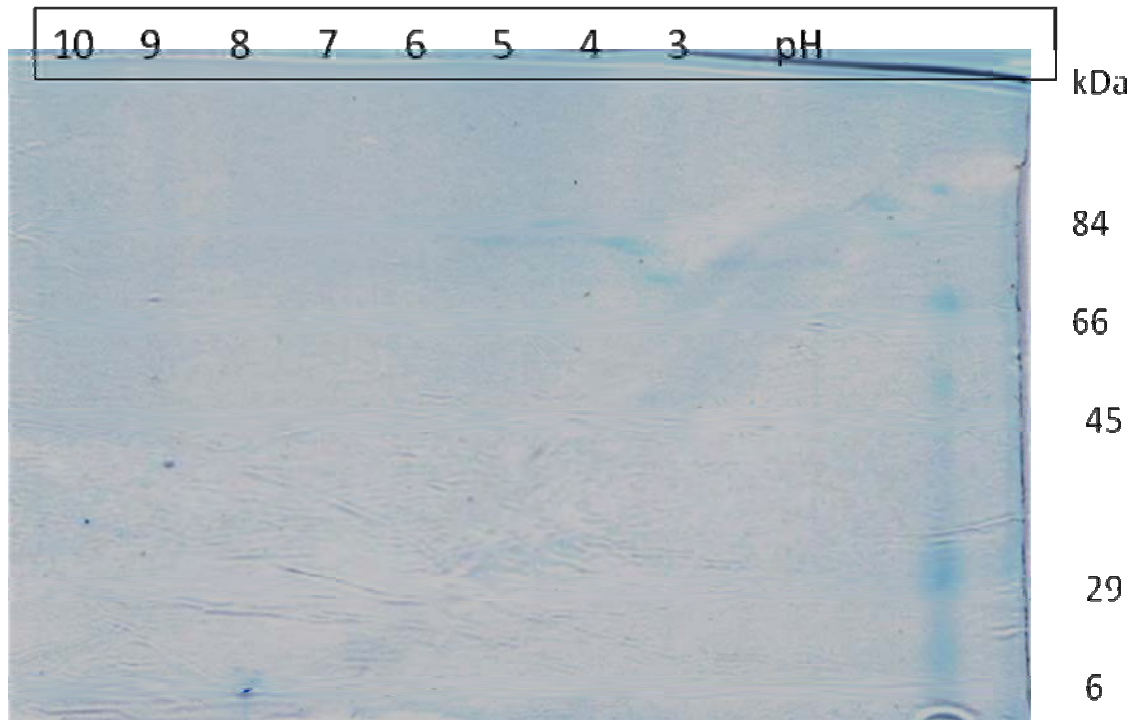


Figura 33. Electroforesis Bidimensional con 5 ug de proteína aislada en cromatografía de afinidad sobre soporte con LSBo de fracción citoplasmática de HeLa.

Se evidencia la presencia de proteínas aproximadamente de 70 kDa con tendencia acida pero distribuida en varios puntos que no cambian mucho en función de su peso molecular uno con respecto al otro, pero si lo hacen en función del punto isoeléctrico lo cual posiblemente se debe a la presencia diferencial de grupos fosfato en la proteína y a la presencia de algunos grupos que pueden afectar la homogeneidad del punto isoeléctrico y del peso molecular, tal como por ejemplo la presencia diferencial de ácido sialico propio de las glicoproteínas. Lo expuesto concuerda con los resultados obtenidos por Lillehoj y colaboradores quienes en el año 2003 asociaron que la presencia *Pseudomonas aeruginosa* estimulaba la fosforilación de algunas mucinas posibilitando la acción de las MAP quinasa; es decir, hay evidencia que permite pensar que proteínas mucinicas del mismo peso molecular pueden tener puntos isoeléctricos diferentes, por diferentes grados de fosforilación. Para corroborar el perfil de reconocimiento se procedió a realizar el mismo procedimiento con la fracción retenida y aluida a pH de 8,8 del extracto citoplasmático de MCF-7. (Figura 34).

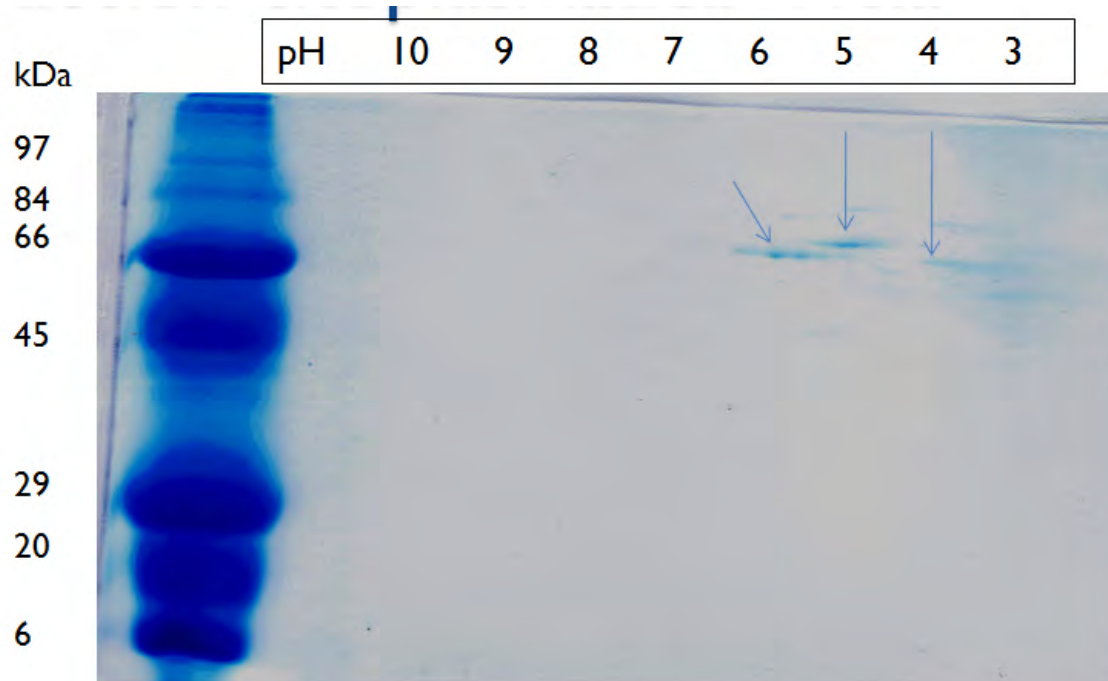


Figura 34. Electroforesis Bidimensional con 5 ug de proteína aislada en cromatografía de afinidad sobre soporte con LSB0 de fracción citoplasmática de MCF-7.

Las condiciones para la electroforesis bidimensional son drásticas por lo que bandas que no se veían anteriormente (figura 20 y 31) pueden haber aparecido, además puede que existan trazas de proteínas que resulten de interacciones inespecíficas de la lectina hacia la mucina, por lo cual se procedió a generar una superposición de los dos geles para así evaluar la congruencia del reconocimiento.

El perfil de reconocimiento es muy similar teniendo como criterio los resultados obtenidos con electroforesis bidimensional tanto de la fracción retenida de Hela como la obtenida con MCF-7 indicando así que muy posiblemente se esté reconociendo a la misma proteína en las dos líneas celulares por parte de la lectina de *Salvia bogotensis* y así mismo, la posibilidad de haber encontrado una herramienta útil para la evaluación pronóstica o diagnóstica de células cancerígenas. Existe también la posibilidad de que se trate de diferentes grupos de proteínas con estructura similar y por ende reconocidas por el soporte, para confirmar cualquiera de las dos hipótesis es necesario entonces realizar secuenciación sobre la proteína resultante en cada uno de los puntos aislados y compararlos, así se puede determinar que el soporte de lectina acoplada reconoce proteínas tipo mucina o no; en ese sentido, el trabajo hasta aquí realizado es preliminar pero abre una nueva puerta para el estudio de glicoproteínas citoplasmáticas.

6. CONCLUSIONES

- Se logró aislar la lectina de *Salvia bogotensis* mediante los protocolos estandarizados por Vega (2004) y se confirmó que el mucilago presente en las semillas de *Salvia bogotensis* parece interferir en la determinación de la actividad de la lectina ya que ésta se hace evidente si se degradan las pectinas. Se determinó que la lectina reconoce el antígeno Tn, pero también se evidenció el reconocimiento de residuos de Manosa por parte de ella o en su defecto por parte de otra lectina presente en la semilla. De corroborarse esta evidencia se estaría reportando el primer caso de lectinas de labiadas que reconocen más de una estructura glicosilada.
- Existe reconocimiento de la lectina de *Salvia bogotensis* hacia proteínas citoplasmáticas de líneas celulares HeLa y MCF-7.
- Los resultados muestran la existencia tanto en HeLa como en MCF-7 de una proteína citoplasmática con antígeno Tn de aproximadamente el mismo peso molecular (63-70 kDa) con diferentes afinidades hacia (LSBo).
- Los procedimientos de extracción de las mucinas citoplasmáticas derivadas de líneas celulares HeLa y MCF-7 son eficientes según los resultados de electroforesis.
- Se estandarizó un protocolo para el asilamiento de proteínas tipo mucina citoplasmática utilizando la lectina de *Salvia bogotensis* encontrando una proteína de aproximadamente 63 kDa con diversidad de estructuras glicosídicas en su estructura lo que la convierte en un excelente objeto de estudio para las técnicas donde se utilizan lectinas.
- La lectina de *Salvia bogotensis*, junto con un panel de lectinas biotiniladas, permitió en células derivadas de las líneas celulares HeLa y MCF-7, detectar diferencias importantes en las estructuras glicosiladas que hacen parte de la Mucina reconocida y se corroboran los resultados obtenidos por Vega (2009) al detectar estructuras que poseen el antígeno Tn, Galactosa y Fucosa.
- Se encontró una proteína reconocida por Anti Muc 2 de aproximadamente (63-70 kDa) que es reconocida por las lectinas LSBo, WGA, DLL-P2, VVB4,AHL y GAL lo que indica una diversidad estructural glicosídica en la proteína.

7. PERSPECTIVAS

- La alta afinidad y especificidad de las lectinas de las labiadas para el antígeno Tn encontrado comúnmente en células del tumor, hace de esta proteína una herramienta útil para los estudios inmunohistoquímicos y celulares pertinentes al cáncer.
- El hallazgo de posibles mucinas citoplasmáticas abre un nuevo camino hacia el estudio de células cancerígenas. En este sentido, es pertinente el estudio de las particularidades moleculares de la proteína encontrada.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia por darme la oportunidad de compartir no solo desde la academia, sino desde las múltiples facetas del ser humano, el ámbito científico y solidario que enriquece la labor de la investigación. Así pues no realicé mis estudios únicamente con compañeros y profesores, sino con amigos que quedarán para siempre.

A la Secretaría de Educación Distrital que manifestada en el IED Rodrigo Lara Bonilla, en cabeza del señor Rector Jorge Lagos y del coordinador Gonzalo Rivera, siempre estuvo en disposición de colaborar y aportar -en la medida de lo posible- a la culminación de este trabajo.

A los amigos que siempre soñaron junto a mí y no permitieron nunca la posibilidad de fracaso o de renuncia ante la adversidad. Gracias Mauricio, Óscar, Luis, Edwin, Nodier, Jhon, Andrea, Camilo, Nury, Henry, Ricardo y Diego a Armando.

A mi familia que ha sido mi motivación desde siempre para soñar con el futuro, con su construcción y transformación en aras de un mejor estar para toda Colombia. Gracias José, Sebastián, Stella, Juan Manuel, Andrés y Marcela ... Inspiraciones de este trabajo.

Agradezco a los profesores Edgar Reyes, Sonia Luz Albarracín y Harold Ardila que estuvieron en función permanente de colaborar y enseñar desde la base del respeto, no solo postulados científicos, sino los valores inherentes al reconocimiento del estudiante.

A la profesora Elizabeth López, Myriam Sánchez y al profesor Luis Osses, por el permanente acompañamiento, disposición para enseñar y sobre todo, por el calor humano que todos me ofrecieron. En ellos no solo encuentro grandes docentes, también grandes Maestros.

A las profesoras Sixta Tulia Martínez y Blanca Higuera, por su permanente acompañamiento, contribución y evaluación de este trabajo.

Especialmente a la profesora Nohora Angélica Vega que ni por un instante se alejó de mi trabajo de Tesis a pesar de las adversidades, a ella debo no solo mi experiencia en laboratorio sino la realización de este trabajo.

Finalmente agradezco al Maestro Gerardo Pérez a quien le debo mi formación como investigador y en gran parte como persona. Su rigurosidad académica apenas puede compararse con su honestidad.

A todos ustedes muchas gracias.

8. BIBLIOGRAFIA

- Almanza M. 1999. Purificación y Caracterización parcial de la lectina presente en la semilla de *Galactia lindenii* . Tesis Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.
- Amaya S, Sasaki M, Watanabe Y. 2001. Expression of MUC1 and MUC2 and carbohydrate antigen Tn change during malignant transformation of biliary papillomatosis. *Histopathology*. 38:550-60.
- Andrews P (1965) The gel-filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* 96:595-606
- Bird G., Wingham J. 1974. Hemagglutinins from *Salvia*. *Vox-Sang.* 26: 163-66.
- Bird G., Wingham J. 1976. More *Salvia* agglutinins. *Vox-Sang.* 30: 217-19.
- Bird G., Wingham J , 1977. Yet more *Salvia* agglutinins. *Vox-Sang.* 32: 121-22.
- Bird G., Wingham J, 1982. More Tn-specific lectins from seeds of Labiatae genus: *Hyptis* sp. *Chan*, *Salvia lyrata* and *Marrubium velutinum*. *Clin. Lab. Haematol.* 4: 403-04.
- Bollag D. and Edelstein S. 1994. *Protein Methods*. 4 ED Wiley-liss. INC. New York. pp: 162-171.
- Bouman F., Meeuse J. 1992. Dispersal in Labiatae. In: R.M. Harley (ed.) *Advances in Labiatae science*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 193-202.
- Bouman F., Meeuse J. 1992. Dispersal in Labiatae. In: R.M. Harley (ed.) *Advances in Labiatae science*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 193-202.
- Boyd W, Shapleig E, 1954. Antigenic relations of blood group antigen as suggested by test with lectins. *Immunology*;73:226-231
- Brako L, Zarucchi J. 1993. *Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru*. Syst. Bot. Monogr. 45. Missouri Botanical Garden. Peru. 1286-87
- Brockhausen I.1999. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 1473:67-95.
- Broquet P, Baubichon-Cortay H, George P, Louisot P.1991. Glycoprotein sialyltransferases in eucaryotic cells. *Int J Biochem.*23:385-89.
- Byrd J, Bresalier R.2004. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 23:77-99.
- Characiejus D, Pasukoniene V, Jonusauskaite R. 2008. Peripheral blood CD8highCD57+ lymphocyte levels may predict outcome in melanoma patients treated with adjuvant interferon-alpha. *Anticancer Res.* 28:1139-42.
- Christine L, Gendler J. 2008. Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins. *Annu. Rev. Physiol.* 70:431-57
- Couldrey C, Green J.2000. Metastases: the glycan connection. *Breast Cancer Res.* 2:321-23.
- Croce M, Rabassa M, Price M. Segal-Eiras A. 2001. MUC1 mucin and carbohydrate associated antigens as tumor markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol.Oncol. Res.*7: 284-291.
- Croce M, Isla Larrain M. Rua C, Rabassa M., Gendler S. y Segal-Eiras A.2003. Patterns of MUC-1 tissue expression defined by an anti-MUC-1 cytoplasmatic tail monoclonal antibody in breast câncer. *Journal Histochem. Cytochem.* 51: 781-788.

- Croce M, Isla-Larrain M, Rabassa M. 2007. Lewis X is highly expressed in normal tissues: a comparative immunohistochemical study and literature revision. *Pathol. Oncol Res.* 13:130-38.
 - Croce M, Isla-Larrain M, Rua CE, Rabassa M, Gendler S, Segal-Eiras A. 2003. Patterns of MUC1 tissue Expression Defined by an Anti-MUC1 Cytoplasmic Tail Monoclonal Antibody in Breast Cancer. *Histochem. Cytochem.* 56:781-88
 - Dall'Olio F, Chiricolo M. 2001. Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj J.*18:841-50.
 - Dam T, Gerken T, Cavadas B, Nascimento K, Moura T, Brewer C. 2007. Binding Studies of α -GalNAc-specific Lectins to the α -GalNAc (Tn-antigen) Form of Porcine Submaxillary Mucin and Its Smaller Fragments. *J Biol. Chem* 282:28256-63
 - Ding Y, Sumitran S, Holgersson J.1999. Direct binding of purified HLA class I antigens by soluble NKG2/CD94 C-type lectins from natural killer cells. *Scand J Immunol.* 49:459-65.
 - Duk M, Mitra D, Lisowska E. Kabat E, Sharon N, Lis H. 1992. Immunochemical studies on the combining site of the A+N blood type specific *Moluccella laevis* lectin. *Carbohydr. Res* 236:245-58.
 - Fan X, Krahlting S, Smith D,Williamson P, Schlege R. 2004a. Macrophage Surface Expression of Annexins I and II in the Phagocytosis of Apoptotic Lymphocytes. *J Molecular Biol Cell.* 15:2863-72.
 - Fan X, She Y, Bagshaw R, Callahan J, Schachter H, Mahuran D.2004b. A method for proteomic identification of membrane bound proteins containing Asn-linked oligosaccharides. *Anal Biochem*; 332: 178-86.
 - Faure M., Moënnoz D., Montigon F., Fay L., Breuillé D., Finot P., Ballèvre y Boza J. 2002. Development of a rapid and convenient method to purify mucins and determine in vivo synthesis rate in rats. *Anal Biochem.* 307(2):244-51
 - Fernández-A. J. 2003. Estudios en Labiatae de Colombia IV. Novedades en *Salvia* y sinopsis de las secciones *Angulatae* y *Purpureae*. *Caldasia.*25: 235-281
 - Fernandez-Alonso J, Rivera-D. .2006. Libro Rojo de Plantas de Colombia - Libros Rojos de especies amenazadas de Colombia. Instituto Alexander von Humboldt " Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia " Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Bogotá. 3:385-582.
 - Fernandez-Alonso J, Vega N, Filgueira J, Perez G. 2003. Lectin prospecting in Colombian Labiatae. A systematic-ecological approach. *Biochemical Systematics and ecology* 31: 617-33
 - Fernández-Rodríguez J, Dwir O, Alon R, Hansson G.2001. Tumor cell MUC1 and CD43 are glycosylated differently with sialyl-Lewis a and x epitopes and show variable interactions with E-selectin under physiological flow conditions. *Glycoconj J.* 18:925-30.
 - Freire T, Bay S, Mensdorff-Pouilly S, Osinaga E. 2005. Molecular Basis of Incomplete O-Glycan Synthesis in MCF-7 Breast Cancer Cells: Putative Role of MUC6 in Tn Antigen Expression. *Adv Cancer Res.* 65:7880-87.
 - Fukuda M.1996. Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res.* 56:2237-44.
 - Gabius H, 2001. Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: case studies for the mistletoe lectin and galectin- 1. *Biochimie* ; 83 : 659-66.
-

- Gabius H, Gabius S., 1997 Glycosciences: status and perspectives. Chapman and Hall. London.
 - Galli-Stampino L, Meinjohanns E, Frische K.1997. T-cell recognition of tumor-associated carbohydrates: the nature of the glycan moiety plays a decisive role in determining glycopeptide immunogenicity. *Cancer Res.* 57:3214-22.
 - Gendler S, Hattrup C, 2007. Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins. *ARI.* 22: 7 - 17.
 - Gendler S, Lancaster C, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, et al. 1990. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem.* 265:15286–93
 - Gendler S. 2001. MUC1, the renaissance molecule. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 6:339–53
 - Goldstein I., Hughes R., Monsigny M., Osawa T. and Sharon N. 1980. What should be called a lectin?. *Nature* ;285:66-8.
 - Griffiths A, Burchell J., Gendler S., Lewis A., Blight K., Tilly R., Taylor-Papadimitriou J. 1987. Immunological analysis of mucin molecules expressed by normal and malignant mammary epithelial cells.*Int.J.Cancer.*40: 319-327.
 - Hakomori S. 1989. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res.* 52:257-331
 - Hakomori S. 2001. Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv Exp Med Biol.* 491: 369-402.
 - Hanisch F, Ninkovic T. 2006. Immunology of O-glycosylated proteins: approaches to the design of a MUC1 glycopeptide-based tumor vaccine. *Curr Protein Pept. Sci.* 7:307-15.
 - Hanisch F, Stadie T, Deutzmann F, Peter-Katalinic J.1996. MUC1 glycoforms in breast cancer-cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation. *Eur J. Biochem.*236:318-27.
 - Harding S. 1989. The macrostructure of mucus glycoproteins in solution. *Adv. Carbohydr.Chem. Biochem.* 47: 345-381.
 - Hedlund M, Ng E, Varki A, Varki N.2008. 2-6-Linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation in vivo. *Cancer Res.* 68:388-94.
 - Hermanson G., Mallia A., Smith P. 1992. Immobilized affinity ligand techniques. Academic Press, INC., San Diego. 53-54,74-75;88,253-254
 - Hernández D, Martín G, Rodríguez P, Ganem B. 1999.Aplicaciones de las lectinas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter;* 15: 91-95.
 - Higai K, Ichikawa A, Matsumoto K. 2006. Binding of sialyl Lewis X antigen to lectin-like receptors on NK cells induces cytotoxicity and tyrosine phosphorylation of a 17-kDa protein. *Biochim Biophys Acta.* 1760: 1355-63.
 - Hirohashi S, Clausen T, Yamada Y. Shimosato H.1985. Blood group A cross-reacting epitope defined by monoclonal antibodies NCC-LU-35 and -8 1 expressed in cancer of blood group O or B individuals: Its identification as Tn antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7039-7043.
 - Ho S, Kim Y. 1991. Carbohydrate antigens on cancer-associated mucin-like molecules. *Semin Cancer Biol.* 2:389-400.
 - Hollingsworth M, Swanson B. 2004. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer.* 4:45-60.
-

- Hovenberg H, Davies J, Carlstedt I. 1996. Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells. *Biochem. J.* 318(Pt. 1):319–24
- Itzkowitz S, Thor A, Schlom J, Kim Y, Hanauer S. 1989. Tumor-associated glycoprotein (TAG-72) expression in ulcerative colitis. *Int. J. Cancer*, 43: 810-815.
- Jensen T, Galli-Stampino L, Mouritsen S, 1996. T cell recognition of Tn glycosylated peptide antigens. *Eur J Immunol.* 26:1342-49.
- Jimenez S. 2000. Obtención y caracterización parcial de subunidades de la lectina Tn específica de *Salvia bogotensis*. Tesis Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia
- Jorgensen P, León-Yañez S. 1999. Catálogo de las plantas vasculares del Ecuador. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 75: 1181
- Kamitani Y, Kajil E, Suda T, Ikemoto S. 1992. Expression of Tn antigen on erothoid cells from a patient wiih Tn síndrome. *Japan J. Genet* 37:271-83.
- Kim, Y, Varki A. 1997. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J.* 14:569-76
- Kinlough L., McMahan R., Poland P, Bruns J. Harkleroad K., Stremple R., Kashlan O., Weixel K., Weisz O, Hughey R. 2006. Recycling of MUC1 is dependent on its palmitoylation. *J. Biol. Chem.* 281:12112–22
- Ko J, Miyoshi E, Noda K. 1999. Regulation of the GnT-V promoter by transcription factor Ets-1 in various cancer cell lines. *J Biol Chem.* 274:22941-48.
- Kuemmel A, Single K, Bittinger F. 2009. TA-MUC1 epitope in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 63:98-105.
- Kuno A., Uchiyama N., Kosesi-Kuno Sh., Ebe Y., Takashima S., Yamada M., Hirabayashi J. 2005. Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. *Nature Methods.* 2: 851-856
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–85.
- Laidler P, Lityńska A. 1997. Tumor cell N-glycans in metastasis. *Acta Biochim Pol.* 44:343-357.
- Lan M, Batra S, Qi W, Metzgar R, Hollingsworth M. 1990. Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J. Biol. Chem.* 265:15294–99
- Lee L, Frank S, and Howe C. 1981. Inmunochemical studies on Tn erythrocytes glycoprotein. *Blood* 58:1228-31
- Levitin F., Stern O., Weiss M., Gil-Henn C., Ziv R., Prokocimer Z., Smorodinsky N., Rubinstein D., Wreschner D.. 2005. The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *J. Biol. Chem.* 280:33374–86
- Lis H, and Sharon N. 1994. Moluccella laevis lectin- An unusual protein with a unique specificity. *Trends Glycosci. Glycotechnol* 6:65-74
- Lillehoj E., Ellen H., Chun Y., Chul K. *Pseudomonas aeruginosa* stimulates phosphorylation of the airway epithelial membrane glycoprotein Muc1 and activates MAP kinase. *J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L809–L815, 2004.
- Lloyd K, Burchell J, Kudryashov V, Yin B, Taylor- Papadimitriou J. 1996. Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells. *J Biol Chem.* 271:33325-34.

- Löffling J, Holgersson J.2009. Core saccharide dependence of sialyl Lewis X biosynthesis. *Glycoconj J.* ;26:33- 40.
 - Lynch, M., Raphael S.,Mellor, L, Spare, P., Inwood, J. 1972. Capítulo 38: Tinción de los cortes. En: *Métodos de Laboratorio.* 2ª Ed. Nueva Editorial Interamericana, México. P:1470.
 - Maaïke W. Schaart, Adrianus C. Bruijn M,1 Henk S,1 Dick T,2 Ingrid B. Renes,Johannes R. Van Goudoever B. .2010. Small intestinal MUC2 synthesis in human preterm infants. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296: G1085–G1090
 -
 - Malisan F, Testi R. 2002. GD3 ganglioside and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1585:179-187.
 - Manzi A, Sjöberg E, Diaz S, Varki A.1990. Biosynthesis and turnover of O-acetyl and N-acetyl groups in the gangliosides of human melanoma cells. *J Biol Chem.* 265:13091-13103.
 - Martínez-Antón A., Debolos C., Garrido M., Roca-Ferrer J., Barranco C., Alobid I., Xaubet A., Picado C., Mullol J . 2006. Mucin genes have different expression patterns in healthy and diseased upper airway mucosa. *Clin. Exp. Allergy.* 36:448–57
 - Matsushita Y, Cleary K, Ota D, Hoff S, Irimura T. 1990. Sialyl-dimeric Lewis-X antigen expressed on mucin-like glycoproteins in colorectal cancer metastases. *Lab Invest.* 63:780-91.
 - McDermott K, Crocker P, Harris A. 2001. Overexpression of MUC1 reconfigures the binding properties of tumor cells. *Int J Cancer.* 2001;94:783-91.
 - Medeiros A, Bianchi S, Calvalet J, Balter H, Bay S, Robles A, Cantacuzene D, Nimtz M, Alzari P, and Osinaga E.2000. Biochemical and functional characterization of the anti-Tn lectin from *Salvia Sclarea*. *Eur. J. Biochem,* 267 5 :1434-40.
 - Miyoshi E, Noda K, Yamaguchi Y. 1999. The alpha1-6-fucosyltransferase gene and its biological significance. *Biochim Biophys Acta.* 1473:9-20.
 - Mouritsen S, Meldal M, Christiansen-Brams I, Elsner H, Werdelin O. 1994. Attachment of oligosaccharides to peptide antigen profoundly affects binding to major histocompatibility complex class II molecules and peptide immunogenicity. *Eur J Immunol.* 24:1066-72.
 - Nakakubo Y, Miyamoto M, Cho Y. 2003. Clinical significance of immune cell infiltration within gallbladder cancer. *Br J Cancer.* 89:1736-1742.
 - Nicoll G, Avril T, Lock K, Furukawa K, Bovin N, Crocker P.2003. Ganglioside GD3 expression on target cells can modulate NK cell cytotoxicity via siglec-7-dependent and -independent mechanisms. *Eur J Immunol.* 33:1642-48.
 - O'Brien T, Beard J, Underwood L, Dennis R, Santin A, York L. 2001. The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumour Biol.* 22:348–66
 - Ohyama C, Kanto S, Kato K. 2002. Natural killer cells attack tumor cells expressing high levels of sialyl Lewis X oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 13789-94.
 - Ohyama C, Tsuboi S, Fukuda M.1999. Dual roles of sialyl Lewis X oligosaccharides in tumor metastasis and rejection by natural killer cells. *EMBO J.* 18:1516- 25.
-

- Okada T, Iai T, Kawachi Y. 1995. Origin of CD57+ T cells which increase at tumour sites in patients with colorectal cancer. *Clin Exp Immunol* 1995;102:159-66.
 - Olmos E, Piqueras A, Martioez-Solano J, Hellin E. 1997 The subcellular localization of peroxidase and the implication of Oxidative stress in hyperhydrated leaves of regenerated carnation plants. *Plant Sci.* 130: 97-105
 - Osinaga E. 2002. Antígenos mucínicos de O glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos. *Actas de Fisiología*, 8: 89-10.
 - Parry S, Silverman H, McDermott K, Willis A, Hollingsworth M, Harris A. 2001. Identification of MUC1 proteolytic cleavage sites in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283:715–20.
 - Pemberton L, Rugghetti A, Taylor-Papadimitriou J, Gendler S. 1996. The epithelial mucin MUC1 contains at least two discrete signals specifying membrane localization in cells. *J. Biol. Chem.* 271:2332–40
 - Peracaula R, Barrabés S, Sarrats A, Rudd P, de Llorens R. 2008. Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. *J. Disease Markers* 25:207-18.
 - Perez G., Vega N., Fernandez-Alonso J. 2006. Lectin Prospecting in Colombian Labiatae. A Systematic-Ecological Approach– II. *Caldasia* 28:179- 195.
 - Pérez, G, Vega N, Fernandez-Alonso J. 1998. Studies on Colombian Labiatae lectins. *Lamiales Newsletter* 6: 6-7
 - Pérez, G., 1984. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Erythrina edulis*. *Phytochemistry* 23, 1229–1232.
 - Peumans, W, Van Damme E. 1995. Lectin as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109: 347-52
 - Phillips J, Chang C, Mattson J, Gumperz J, Parham P, Lanier L. 1996. CD94 and a novel associated protein (94AP) form a NK cell receptor involved in the recognition of HLA-A, HLA-B, and HLA-C allotypes. *Immunity.* 5:163-72.
 - Piller V, Piller F, Cartron J. 1986. Isolation and Characterization of a n N-Acetylgalactosamine Specific Lectin from *Salvia sclarea* Seeds. *J. Biol. Chem.* 30:14069-75.
 - Piller V, Piller F, Fukuda M. 1990a. Biosynthesis on truncated O-glycans in the T cell line Jurkat. Localization of O-Glycan initiation. *J. Biol. Chem.* 265: 9264-71.
 - Piller V, Piller F, Cartron J. 1990b. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of seven N-acetyl-Dgalactosamine-recognizing lectins. *Eur. J. Biochem.* 191: 461-66
 - Pusztai A. 1991. *Plant lectins*. Cambridge University Press, Cambridge
 - Quinlin I, Burnside J, Dombrowski K, Phillips C, Dolby N, Wright S. 2007. Context of MUC1 epitope: immunogenicity. *Oncol Rep.* 17:453-56
 - Ramamoorthy T, Elliot M. 1998. Lamiaceae de México: diversidad, distribución, endemismo y evolución. 501-526. En: Ramamoorthy T. P. et al. (eds.). *Diversidad Biológica de México, orígenes y distribución*. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.
 - Ramamoorthy T, Elliott M. 1993. Mexican Labiatae: diversity, distribution, evolution and endemism. In: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.) *Biological diversity in Mexico: origins and distributions*. Oxford University Press, New York, 513-539.
-

- Reis C, David L, Seixas M, Burchell J, Sobrinho-Simões M.1998. Expression of fully and under-glycosylated forms of MUC1 mucin in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1998;79:402-410.
 - Rose M, Voynow J. 2006. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol. Rev.* 86:245–78
 - Robertson, Dannelly P. Malloy J, Reeves H. 1987. Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.*167:290–294.
 - Sanchez M.2003. Estandarización de las condiciones de separación de las subunidades que constituyen las lectinas presentes en las semillas de *Salvia bogotensis* .Tesis Departamento de Química. Universidad nacional de Colombia.
 - Salassa C., Lespi P,1 Detección de mucinas ácidas en metaplasia gástrica de la vesícula biliar *Acta Gastroenterol Latinoam* 2007;37:11-14.
 - Schauer R, Kelm S, Reuter G, Roggentin P, Shaw L.1995. Biochemistry and role of sialic acid. In: Rosemberg A, editor. *Biology of sialic acid*. New York: Plenum. 1995. 7-67.
 - Sharon N, Lis H.1972 Lectins cell agglutinating and sugar-specific proteins. *Science.* 177:949-58
 - Sharon N, Lis H.2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology.* 14: 53-62
 - Sheu B, Chang W, Cheng C, Lin H, Chang D, Huang S.2008. Cytokine regulation networks in the cancer microenvironment. *Front Biosci.* 13:6255-68.
 - Singhal A, Hakomori S. 1990. Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *Bioessays.* 12:223-230.
 - Smith P., Krohn R., Hermanson G., Mallia A., Gartner F., Provenzano M., Fujimoto E., Goeke N., Olson B., Klenk D. 1985. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem.* 150: 76-85.
 - Springer G.1984. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science.* 224:1198-1206.
 - Springer G, Chandrasekaran , Desai P, Tegtmeyer H. 1988. Blood group Tn-active macromolecules from human carcinomas and erythrocytes: Characterization and specific reactivity with mono- and poly-clonal anti-Tn antibodies induced by various immunogens. *Carbohydr. Res.* 178: 271-292.
 - Stepensky D, Tzehoval E, Vadai E, Eisenbach L. 2006. Oglycosylated versus non-glycosylated MUC1-derived peptides as potential targets for cytotoxic immunotherapy of carcinoma . *Clin Exp Immunol.* 143:139-49.
 - Storrie B, Madden E. 1990. "Isolation of subcellular organelles" en *Guide to Protein purification* Deutscher M (ed) *Meth.Enzymol.* 182: 203-07.
 - Suzuki T, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y. 1995. N-glycosylation/ deglycosylation as a mechanism for the post-translational modification/remodification of proteins. *Glycoconj J.* 12:183-93.
 - Tandle P., Williams L. 1973. Labiatae. *Flora of Guatemala.* Fieldiana Botany . 24 :237-317.
 - Tateno H., Mori A., Uchiyama N., Yabe R., Iwaki J., Shikanai T., Angata T., Narimatsu H., Hirabayashi J. 2008. Glycoconjugate microarray based on an evanescent-field fluorescence-assisted detection principle for investigation of glycan-binding proteins. *Glycobiology.* 18: 789-798
-

- Thornton D, Rousseau K, McGuckin M. 2008. Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus Annu. Rev. Physiol. 70:459–86.
 - Tsuboi S, Fukuda M. 2001. Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. Bioessays. 23:46-53.
 - Uchiyama N., Kuno A., Tateno H., Kubo Y., Mizuno M., Noguchi M., Hirabayashi J. 2008. Optimization of evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray for high-sensitivity detection of monovalent oligosaccharides and glycoproteins. Proteomics. 8: 3042-3050.
 - Ugorski M, Laskowska A. 2002. Sialyl Lewisa: a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells. Acta Biochem Pol. 49:303-11
 - Van den Steen, P., Rudd, P., Dwek, R., Opdenakker, G. 1998. Concepts and principles of Olinked glycosylation. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 33:151-208.
 - Van Driessche, E., Beeckmans, S., Dejaegere, R., Kanarek, L., 1983. Thiourea: The antioxidant of choice for the purification of proteins from phenol-rich plant tissues. Anal. Biochem. 141, 184–88.
 - Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. 1999. Essentials of glycobiology. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 653.
 - Varki A. 1992. Diversity in the sialic acid. Glycobiology. 2:25-40.
 - Varki N, Varki A. 2007. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. Lab Invest. 87:851-857.
 - Vega N, Pérez G. 2001. Detection and interaction of Labiatae Lectins with MCF-7 cells. Poster 15, INTERLEC 19. Fortaleza, Brasil.
 - Vega N. 1997. Detección, purificación y caracterización parcial de la lectina presente en las semillas del genero *Salvia*” Tesis Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia.
 - Vega N. 2004. Caracterización Bioquímica, Funcional y Biológica de la Lectina de *Salvia bogotensis* y Evaluación de su Aplicación para la detección del antígeno Tn Tesis Doctoral Química, Universidad Nacional de Colombia.
 - Vega N., Pérez G, 2006. Isolation and characterisation of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. Phytochemistry. 67, 347-55
 - Wagstaff S, Olmstead R. 1997. Phylogeny of Labiatae and Verbenaceae inferred from rbcL sequences. Syst. Bot. 22: 165-79
 - Wang W, Peumans W, Rouge P, Rossi C, Proost P, Chen J, Van Damme E. 2003a. Leaves of the lamiaceae species *Glechoma hederacea* (ground ivy) contain a lectin that is structurally and evolutionary related to the legume lectins. Plant J 33:293-304.
 - Wang W, Hause B, Peumans W, Smagge G, Makie A, Fraser R, Van Damme E. 2003b. The Tn antigen-specific lectin from ground ivy is an insecticidal protein with an unusual physiology. Plant Physiol 132:1322-34.
 - Wickstrom C, Davies J, Eriksen G, Veerman E, Carlstedt I. 1998. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. Biochem. J. 334(Pt.3):685–93.
 - Wu A, Duk M, Lin M, Broadberry R. and Lisowska E. 1995. Identification of variant glycoporphins of human red cells by lectin blotting: application to the Mi. III variant that is relatively frequent in the Taiwanese population. Transfusion 35: 571-76.
-

- Xu Y, Sette A, Sidney J, Gendler S, Franco A. 2005. Tumor associated carbohydrate antigens: a possible avenue for cancer prevention. *Immunol Cell Biol.* 83: 440-48.
 - Yamashita Y, Chung Y, Horie R, Kannagi R, Sowa M. 1995. Alterations in gastric mucin with malignants transformation: novel pathway for mucin synthesis. *J Natl Cancer Inst.* 87:441-46.
 - Yao H, Guo L, Jiang B, Luo J, Shi X. 2008. Oxidative stress and chromium(VI) carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 27:77-88.
 - Yeh J, Hiraoka N, Petryniak B. 2001. Novel sulfated lymphocyte homing receptors and their control by a Core1 extension beta 1,3-N acetylglucosaminyltransferase. *Cell.* 105:957-69.
 - Yi L., Jia C., Kun W., Yi J., Hong L., Rong L., Shuai J., Tao C., Yong Z., Da C., Lin G., Hui S. 2010. A nuclear ligand MRG15 involved in the proapoptotic activity of medical fungal galectin AAL (*Agrocybe aegerita* lectin). *Biochimica et Biophysica Acta* 1800: 474-80.
-
-

ANEXO 1

Ensayo de ELISA para lectinas de labiadas

1. **sensibilización de la placa:** Agregar 100 ul de aMSO (0.13 ug/ml) en buffer carbonatos 0.1 M pH 9.6. incubar 3 horas a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
2. **Bloqueo:** Incubar una hora a 37°C co 200 ul por pozo de PBS-BSA (0.13 %). No se debe bloquear con leche descremada ya que la interacción de las lectinas es enmascarada.
3. **Extractos crudos:** sembrar 200 ul por pozo de los extractos crudos o 100 ul de diluciones de la lectinas pura en PBS-BSA (1.3%).
4. **Vicia villosa isolectina B₄ biotinilada :** sembrar 100 ul por pozo de la lectinas diluida 1/1000 en PBS-BSA (1.3%).
5. **Streptavidina proxidasa:** sembrar ul 100 /pozo de una dilución 1/1000 en PBS-BSA (1.3%), incubar 1 h a 37°C
6. **Revelado:** Sembrar 100 ul /pozo de una solución de ABTS 0.3 mg/ml en buffer citrato –fosfato pH5.0. En el momento de sembrar se agrega 5ul de H₂O₂ al 30% por cada 10 ml de solución. La reacción se debe mantener en la oscuridad. Leer a los 30 min a 405 nm.

Nota: Entre cada paso se hacen tres lavados agregando 100 ul/pozo de PBS-TWEEN (0.1%), menos en el ultimo dond ese lava cinco veces. Entre el segundo y el tercer paso no se realiza lavado. La reacción se pude detener con H₂SO₄ 1M o SDS al 4%

- Se utiliza la misma concentración de MSO para ensayos de ELISA
- Para realizar ensayos directos se omite paso 3, y se siembran diluciones de las lectinas biotiniladas en PBS-BSA (1.3%), teniendo un volumen final de 100 ul por pozo. Incubar a 37°C y 12 horas 4 °C

ANEXO 2

DOT-BLOT para anticuerpos

1. Sobre membranas de nitrocelulosa adicionar 5 ul de lectinas pura (0.2 mg/ml) en PBS a cada punto, dejar 1 h a temperatura ambiente
2. Bloqueo : agregar 20 ml de PBS-BSA (1.3%) y dejar en agitación 1 h a T ambiente.
3. Incubar las membranas con diluciones de los antisueros en humedo , 1 h a temperatura ambiente y toda la noche a 4°C
4. Segundo anticuerpo : incubar con una dilución 1/1000 de IgG anti-conejo-proxidasa en PBS-BSA(1.3%) y dejar en agitación a 1h a T amb.
5. Revelado : agregar una solución de 50 mg de diaminonbenzamidina (DAB) en 100 ml de PBS y 10 ul de H₂O₂ al 30%, Detener la reacción con agua desionizada.

Entre cada paso se hacen tres lavados agregando 20 ml de PBS-TWEEN (0.1%), menos en el ultimo donde se lava cinco veces entre el segundo y el tercer paso no se realiza lavado.

ANEXO 3

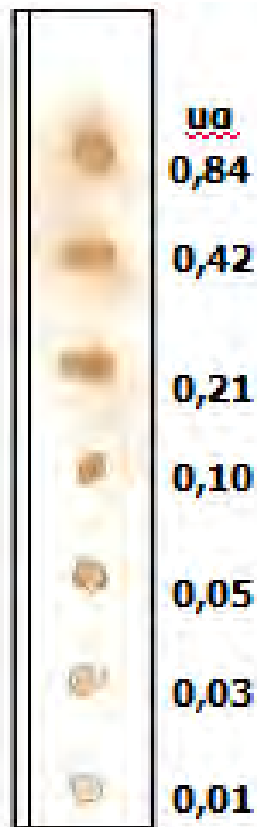
Extracción de fracciones subcelulares

Línea celular MCF-7

- Lavado: se descongelaron 200'000.000 de células, las cuales se centrifugaron (1500 rpm) durante 10 minutos para retirar el medio de congelación. El pellet de células se lavo dos veces con tres volúmenes de TBS (tris 50 mM , NaCl 150 mM , KCl 140 mM, EDTA 2mM) pH 7.3, preenfriado a 0 en húmedo , 1 h a temperatura ambiente y toda la noche a 4°C y se centrifugo a 1200 rpm, 5min.
- Homogenización : El pellet de células se resuspendió en 3 volúmenes de buffer de homogenización TBS (tris 10 mM, sacarosa 0.25 M, NaCl 10 mM) con la mezcla de inhibidores frescos (EDTA 5 mM, EGTA a 5 mM , PMSF 2 mM, Benzamida 2 mM, leupeptina 1 ug/ml, aprotinina 1.2 ug/ml y pepstina 10 (ug/ml) y se dejo en reposo 10 minutos a 0 °C ; posteriormente se homogenizo realizando 15-20 strokes y se centrifugó (2300 rpm) durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y el pellet se reextrajo en las mismas condiciones. El núcleo y las células que no se rompieron se descartaron y las sobrenadantes se reunieron para continuar con el fraccionamiento.
- El pool de sobrenadantes se centrifugo a 11.210 rpm, durante 30 minutos a 0 °C ; el pellet (mitocondrias, lisosomas, cloroplastos , peroxisomas) se descartó. El sobrenadante que contiene la fracción microsoma (membrana plasmatica, retículo endoplasmatico y Golgi) se ultracentrifugó a 45.000 rpm (110.000Xg) durante 1 hora a 4 °C. El sobrenadante que contiene la fracción citoplasmática se recuperó y se almacenó a -20 °C. y con el pellet que contiene proteínas de membrana se realizaron los siguientes ensayos:

ANEXO 4

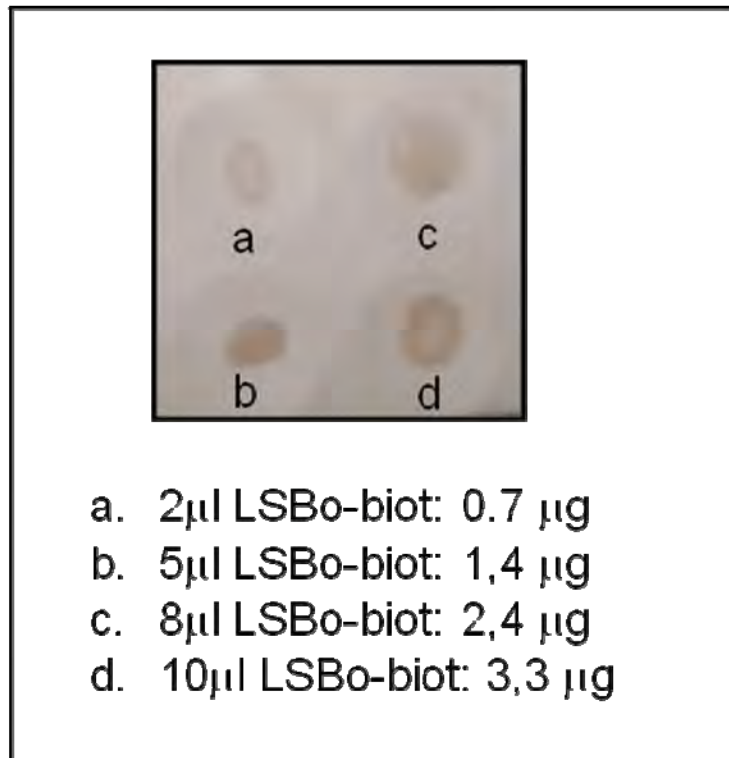
Dot Blot Control de Biotinilación con diferentes cantidades de WGA sobre membrana de nitrocelulosa.



Dot blot WGA-Biotina

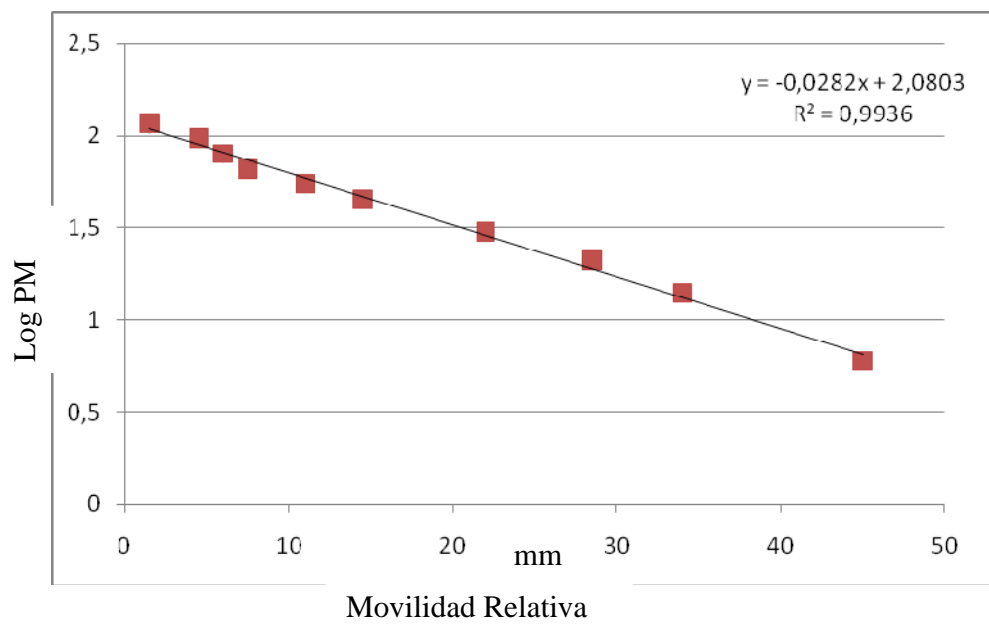
ANEXO 5

Dot Blot Control de Biotinilación con diferentes cantidades de LSBo sobre membrana de nitrocelulosa.



ANEXO 6

Curva de calibración utilizada para determinar el peso molecular de la mucina aislada. (X para la Glicoproteína es 10)



ANEXO 7

Curva de calibración utilizada para determinar el punto isoelectrico de la mucina aislada.
(X: 47 mm) Punto Isoeléctrico: 5

