



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Caracterización bioquímica de lectinas de semillas de
Lupinus mutabilis sweet (tarwi) y evaluación de su
potencial inmunomodulador sobre leucocitos
polimorfonucleares humanos de sangre periférica**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Luis Antonio RODRIGUEZ CARNERO

ASESOR

Libertad ALZAMORA GONZALES

Lima, Perú

2017

RESUMEN

El tarwi es una leguminosa andina domesticada que forma parte del género *Lupinus*, cuyas lectinas no han sido adecuadamente purificadas y caracterizadas. Posee un alto contenido proteico y moléculas de potencial aplicación biomédica. Los neutrófilos son leucocitos polimorfonucleares importantes del sistema inmune innato cuyas respuestas exacerbadas suelen causar daño tisular y enfermedades inflamatorias. El objetivo del presente estudio fue purificar y caracterizar lectinas hemaglutinantes de tarwi y evaluar su efecto sobre leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica humana. Se obtuvo un extracto salino de harina elaborada con semillas de tarwi. Las proteínas se precipitaron con sulfato de amonio y se purificaron las lectinas por cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico. Se estimó la actividad hemaglutinante del extracto y las fracciones, se determinó el azúcar ligando mediante inhibición de la hemaglutinación. Las lectinas en extractos y fracciones se identificaron por SDS-PAGE, y se estimó el peso molecular aproximado en condiciones nativas. Se enfrentó el extracto y las fracciones con tampones a distintos pH, se evaluó las condiciones fisicoquímicas óptimas, dependencia de cationes y efecto de un agente reductor en relación a la actividad hemaglutinante. El extracto y las lectinas purificadas fueron aplicados sobre leucocitos totales y polimorfonucleares y se valoró la actividad leucoaglutinante, la viabilidad celular y liberación de óxido nítrico. En los leucocitos polimorfonucleares se evaluó el efecto de la estimulación con lectinas de tarwi en la producción de especies reactivas de oxígeno intracelulares. Las lectinas hemaglutinantes purificadas no fueron retenidas por las columnas de exclusión molecular e intercambio iónico, tuvieron afinidad por galactosa y melibiosa, actividad hemaglutinante sobre eritrocitos de conejo, protómeros de 46 kDa de peso molecular y un punto isoelectrico mayor o igual a 7.2. Los pH 5 y 6 favorecieron la estabilidad de las lectinas y la hemaglutinación se optimizó a pH menores a 7, fue independiente de cationes y no resultó afectada por el β -mercaptoetanol. Las lectinas de tarwi no fueron leucoaglutinantes, no afectaron la viabilidad de leucocitos ni la producción de óxido nítrico en leucocitos totales y polimorfonucleares. Redujeron la producción de especies reactivas de oxígeno intracelulares en células polimorfonucleares. Las lectinas purificadas presentaron una notable capacidad hemaglutinante y su afinidad por galactosa las provee de potenciales aplicaciones biomédicas como la inmunomodulación.

Palabras clave: *Lupinus mutabilis*, lectinas hemaglutinantes, caracterización de lectinas, leucocitos polimorfonucleares, inmunomodulación con lectinas

ABSTRACT

Tarwi is an Andean domesticated legume and member of the *Lupinus* genre, which lectins have not been appropriately purified and characterized. It has a high protein content and molecules with a great biomedical potential. Neutrophils are important polymorphonuclear leukocytes for innate immune system and its aggravate responses usually carry tissular damage and inflammatory diseases. The aim of this study was to purify and characterize hemagglutinating lectins from tarwi and to evaluate its effect over polymorphonuclear leukocytes from human peripheral blood. A saline extract from tarwi's seeds flour was elaborated. Proteins were precipitated with ammonium sulfate and lectins were purified by molecular exclusion and ionic exchange chromatography. Hemagglutinating activity of extract and fractions was assessed and sugar affinity was determined by inhibition of hemagglutination. Lectins in extracts and fractions were identified by SDS-PAGE. Approximate native molecular weight was also evaluated. Suitable pH conditions for conservation were evaluated for the extract and fractions. Optimum physical-chemical conditions, cations dependence and reductive agents in relation with hemagglutination were evaluated. Extract and purified lectins were applied over total and polymorphonuclear leukocytes and leucoagglutinating activity, cell viability and nitric oxide production were assessed. There was also evaluated intracellular oxygen reactive species production in polymorphonuclear leukocytes stimulated with lectins. Lectins were not retained by molecular exclusion and ionic exchange columns. They had affinity for galactose and melibiose, hemagglutinating activity over rabbit erythrocytes, 46 kDa protomers and an isoelectric point over 7.2. Stability was improved at pH 5 and 6. Hemagglutination is optimized under pH 7, is cation independent and seems to be unaffected by β -mercaptoethanol. Tarwi lectins were not leucoagglutinating and did not affected cell viability or nitric oxide production of leukocytes. Reactive oxygen species were reduced in polymorphonuclear leukocytes stimulated with lectins. Purified lectins have a remarkable hemagglutination capacity and its galactose affinity give them potential biomedical applications as immunomodulation.

Key words: *Lupinus mutabilis*, hemagglutinating lectins, lectin characterization, polymorphonuclear leukocytes, immunomodulation with lectins.