

Análisis de la actividad aglutinante de extractos de semillas del género *Amaranthus* cultivados en la Región Semiárida Pampeana frente a eritrocitos seleccionados

Leonardo N. R. Dandeu

Universidad de Concepción del Uruguay
Facultad de Ciencias Médicas Dr. Bartolomé Vassallo
Gualeguaychú

2018

**Análisis de la actividad aglutinante de extractos de semillas del género
Amaranthus cultivados en la Región Semiárida Pampeana frente a eritrocitos
seleccionados**

Leonardo N. R. Dandeu

Tesina de grado presentada como requisito para optar al título de:

Licenciado en Hemoterapia e Inmunohematología

Tutora:

Dra. María Rosana Ramírez

Esta tesina se elaboró en el marco del Proyecto:

Amaranto: investigación y actividades destinadas a su promoción e inserción en la sociedad.

Universidad Nacional de La Pampa - INTA - CONICET - Comunidad Económica Europea.

<< Las leyes de nuestro pensamiento concuerdan con las regularidades que presenta el flujo de las impresiones que recibimos del mundo exterior, el hecho de que al ser humano le resulta posible, por tanto, obtener por medio del puro pensamiento información acerca de tales regularidades. Que el mundo exterior constituya algo independiente de nosotros, algo absoluto frente a lo que nos encontramos, tiene de cara a ello una importancia fundamental; y la búsqueda de las leyes que rigen ese absoluto me parecía la más bella tarea de una vida dedicada a la ciencia >>

Max Planck

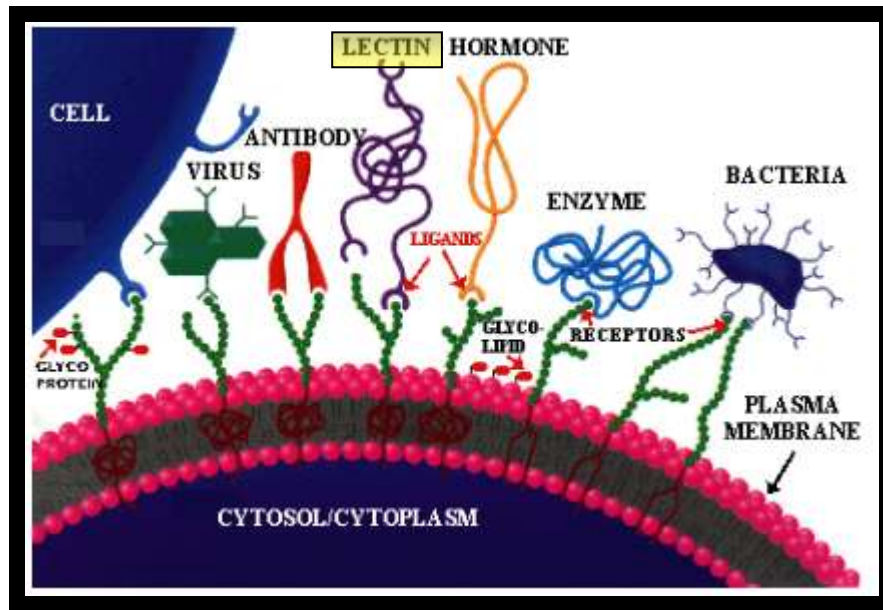


Figura [1]. Lectina unida a su correspondiente ligando de membrana celular. [Ray y Chatlergee, 1995, citado en Carpio, 2016]

Agradecimientos

A mis padres, por darme la vida.

A Rosana, por ser paciente, por sus aportes y por su buen humor.

A Lucía, por guiarme a lo largo de todo el trabajo.

A los investigadores de la Universidad Nacional de La Pampa, que aportaron recursos necesarios para la ejecución de esta tesina.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por haberme brindado muy gentilmente su espacio para la ejecución de las etapas finales de esta investigación.

Al Hemocentro Regional Rosario, por su valioso aporte.

A mis colegas Nacho y Vane, amigos y hermanos por el apoyo brindado.

A los bioquímicos dispuestos a brindar ayuda.

A los docentes que han aportado a mi formación desde tiempos inmemoriales.

A la **Ciencia**.

Índice de contenidos

1.Resumen	10
2.Introducción	12
3.Objetivos	14
3.1.Objetivo general.....	14
3.2.Objetivos específicos	14
4.Planteamiento del problema.....	15
4.1.Pregunta de investigación	15
4.2.Hipótesis de trabajo	15
5.Marco de referencia.....	16
5.1.Factores antinutricionales de semillas	16
5.1.2.Semilla.....	16
5.1.3.Composición química de las semillas	17
6.Lectinas	18
6.1.Reseña histórica	18
6.2.Naturaleza y mecanismo de acción de las lectinas	19
7.Lectinas vegetales	20
7.1.Generalidades.....	20
7.2.Estructura molecular de lectinas vegetales	21
7.3.Especificidad lectinas vegetales - monosacáridos	24
7.4.Especificidad lectinas vegetales – oligosacáridos	24
7.5.Sitio de reconocimiento en lectina vegetales	25
7.6.Función fisiológica de las lectinas vegetales	25
7.7.Aplicaciones tecnológicas.....	26

8.Amaranto	28
8.1.Género <i>Amaranthus</i>	28
8.2.Composición Química del género <i>Amaranthus</i>	29
8.3.Capacidad antioxidante de semillas de <i>Amaranthus</i>	31
8.4.Características botánicas generales del género <i>Amaranthus</i>	32
8.5. <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	32
8.6. <i>Amaranthus cruentus</i>	33
8.7. <i>Amaranthus caudatus</i>	34
8.8. <i>Amaranthus pumilus</i>	35
8.9. <i>Glycine max.</i> (Soja).....	36
8.9.1.Efecto aglutinante de lectina de soja	36
9.Conceptos generales de inmunología de grupos sanguíneos	36
9.1.Antígenos y anticuerpos.....	36
10.Antígenos de membrana eritrocitarios	37
10.1.Concepto de grupo sanguíneo.....	37
10.2.Grupos sanguíneos ABO, H, Lewis y antígenos relacionados	38
10.3.Sistema ABO	38
10.4.Sistema Lewis	39
10.6.Sistema Rh	40
10.7.Sistema MNS	40
10.8.Sistema Kell.....	40
10.9.Sistema Duffy	41
10.10.Sistema Kidd.....	41
11.Antecedentes de estudios realizados	42
12.Diseño metodológico.....	44
12.1.Variable a medir:	44
12.2.Recolección de la información empírica	44
13.Materiales y métodos	45
13.1.Materiales de origen biológico	45
13.1.1.Muestras de semillas de <i>Amaranthus</i>	45

13.1.2.Muestras de eritrocitos	46
13.1.3.Reactivos y solventes	47
13.2.Métodos	48
13.2.1.Obtención de los extractos	48
13.2.2.Determinación de las características químicas y evaluación de la estabilidad y bioactividad selectiva de los extractos	49
13.2.3.Determinación de la presencia de proteínas.....	50
13.2.4.Determinación del perfil proteico general de los extractos. Geles de proteínas de poliacrilamida.....	50
13.2.5.Evaluación del poder antioxidante	51
13.2.6.Ensayos de aglutinación de eritrocitos.....	52
13.2.7.Determinación de la capacidad de aglutinación frente a eritrocitos de antígenos de membrana desconocidos.....	52
13.2.8.Determinación de la capacidad de aglutinación de eritrocitos ABO RhD positivos	53
13.2.9.Paneles reactivos para la identificación de anticuerpos irregulares	53
13.2.10.Aislamiento de lectina por precipitación.....	54
14.Resultados y discusiones.....	56
14.1.Muestras.....	56
14.2.Determinación de las proteínas totales en los extractos	56
14.3.Determinación del perfil proteico general de las semillas seleccionadas para el estudio.....	57
14.4.Evaluación del poder antioxidante.....	58
14.5.Ensayos de aglutinación de eritrocitos.....	58
14.6.Ensayos de aglutinación de eritrocitos. Panel selector de anticuerpos.	60
14.7.Determinación de la capacidad de aglutinación de eritrocitos ABO RhD positivos, eritrocitos caninos y eritrocitos de roedor.....	61
14.9.Discusiones sobre este trabajo	64
15.Conclusión.....	67
16.Bibliografía de consulta	68

17.Referencias bibliográficas 69

1. Resumen

Las lectinas son proteínas de origen no inmunológico, que pueden interactuar con carbohidratos libres, o bien unidos a las membranas celulares. Estas proteínas presentan la propiedad de aglutinar células, en particular eritrocitos, manifestando de esta manera la posible especificidad de reconocimiento antigénico. En adición, las lectinas son una herramienta importante para la investigación estructural y funcional de carbohidratos complejos, en el reconocimiento de antígenos de grupos sanguíneos, para estudiar los cambios que ocurren en la superficie celular durante ciertos procesos fisiológicos y patológicos, así como para la identificación de células tumorales.

En el presente trabajo, se abordará el rol fitohemaglutinante de lectinas vegetales, y la posible selectividad con la que ejercen esta acción aglutinante, en lo que refiere a su relación con antígenos de membrana relacionados a grupos sanguíneos, expresados en la superficie celular de eritrocitos, utilizando extractos obtenidos a partir de semillas de genotipos seleccionados del género *Amaranthus*, de la Región Semiárida Pampeana.

En el desarrollo del informe se incluirán generalidades sobre las características de las lectinas como moléculas hemaglutinantes, su estructura química, propiedades biológicas, aplicaciones y métodos de estudio. Se recabará información de las bases de datos disponibles en internet, provenientes del ámbito académico principalmente. Se expondrán antecedentes de investigación vinculados a las funciones y potencialidades que poseen las lectinas como fitohemaglutininas.

Palabras clave: *Amaranthus*, fitohemaglutinina, lectinas, carbohidratos, eritrocitos, aglutinación.

Abstract

Lectins are proteins of non-immunological origin that can interact with free carbohydrates or linked to cell membranes. These proteins have the property of agglutinating cells, in particular erythrocytes, thus manifesting the possible specificity of antigenic recognition. In addition, lectins are an important tool for the structural and functional investigation of complex carbohydrates, for the recognition of blood group antigens. Furthermore, lectins are relevant to study the changes that occur at the cell surface during certain physiological and pathological processes, as well as for the identification of tumor cells.

In the present work, the phytohemagglutinating role of plant lectins in interaction with membrane antigens expressed on the cell surface of erythrocytes, related to blood groups, using extracts obtained from seeds of selected genotypes of the *Amaranthus* genus of the Semi-arid Pampean Region will be addressed.

In this final work there will be included generalities about the characteristics of lectins like hemagglutinating molecules, their chemical structure, biological properties, applications and study methods. Information will be collected from the databases available on the internet, mainly from the academic field. Research history related to the functions and potentials of lectins such as phytohemagglutinins will be presented.

Keywords: *Amaranthus*, phytohemagglutinin, lectins, carbohydrates, erythrocytes, agglutination.

2.Introducción

Uno de los grandes desafíos en el ámbito de la medicina transfusional es la tipificación certera de grupos sanguíneos, previa a la transfusión del paciente. Es bien conocida la existencia de ciertas sustancias en la superficie de los eritrocitos que tienen capacidad antigénica y se unen con alta afinidad a anticuerpos específicos. Esta reacción antígeno-anticuerpo, puede manifestarse *in vitro* como aglutinación, hemólisis o precipitación, e *in vivo* a través de diversas respuestas inmunológicas, comprometiendo la morbimortalidad del receptor. En el contexto del laboratorio, la mayoría de las pruebas serológicas de inmunohematología asociadas a grupo sanguíneo, dependen de reacciones entre antígenos de los eritrocitos y anticuerpos del suero, y la aglutinación es, en la mayoría de los casos, la manifestación final de la reacción. En otros casos, los anticuerpos sólo se fijan a los eritrocitos, pero no los aglutinan, sino que provocan la destrucción del mismo, con la posterior pérdida de la hemoglobina intracelular. Este tipo de reacción se denomina hemólisis.

Los reactivos de tipificación que se usan de rutina en el banco de sangre se basan en estos principios, la aglutinación y la hemólisis. En cualquier caso, es extensivo el empleo de anticuerpos monoclonales como reactivos de tipificación sanguínea, siendo también corriente, según sea requerido, el uso de lectinas como reactivos de función homóloga, especialmente para la resolución de discrepancias.

Existen numerosos estudios que revelan las posibilidades reactivas de las lectinas, especialmente las de origen vegetal, dada su capacidad de reconocimiento selectivo hacia carbohidratos específicos. [Gallego del Sol y otros, 2006]. Este principio es el que ha motivado la presente investigación.

La exploración de nuevas moléculas que faciliten la tipificación de grupo sanguíneo y el empleo de las mismas a través de métodos sencillos y económicos, son el aporte de este

trabajo al ámbito de la especialidad de la hemoterapia. En el presente estudio, se optó por explorar el potencial poder hemaglutinante de los extractos de diversos genotipos del género *Amaranthus*, cultivados en la Región Semiárida Pampeana, debido a que la bibliografía existente presenta un vacío en lo que refiere al estudio de lectinas de estas plantas en relación con un ambiente de cultivo diferente al nativo. Por otro lado, la existencia de un Programa de inclusión del Amaranto, promovido especialmente por la Universidad Nacional de La Pampa, cuyo objetivo principal ha sido promover el uso de las semillas de Amaranto en diversas actividades humanas, facilitó el acceso al recurso natural necesario para los estudios efectuados.

3.Objetivos

3.1.Objetivo general

Analizar la potencial actividad aglutinante y selectiva de los extractos de semillas provenientes de siete genotipos del género *Amaranthus*, cultivados en la Región Semiárida Pampeana, frente a eritrocitos seleccionados.

3.2.Objetivos específicos

- 1) Aplicar sistemáticamente en *Amaranthus* el método para extracción de lectinas sugerido para uso en el banco de sangre, caracterizado por su accesibilidad técnica y económica.
- 2) Evaluar la potencial actividad biológica del extracto total frente a eritrocitos seleccionados.
- 3) Explorar la potencial selectividad de las lectinas frente a eritrocitos de otras especies de mamíferos: caninos y roedores.
- 4) Comparar las reacciones de aglutinación de los distintos eritrocitos entre sí.
- 5) Comparar dos métodos de extracción de lectinas.

4. Planteamiento del problema

4.1. Pregunta de investigación

¿Cuál es la potencial actividad aglutinante y selectiva, que presentan los extractos de semillas de siete genotipos del género *Amaranthus* cultivados en la Región Semiárida Pampeana sobre eritrocitos seleccionados?

4.2. Hipótesis de trabajo

Los extractos de semillas de los siete genotipos del género *Amaranthus* analizados, cultivados en la Región Semiárida Pampeana, presentan actividad aglutinante y potencialmente selectiva frente a eritrocitos:

-De origen humano, de antígenos de grupo sanguíneo desconocidos, seleccionados a los fines de los ensayos.

-De origen humano, de antígenos de grupo ABO y antígenos asociados al ABO conocidos.

-No humanos, de expresión antigénica de membrana desconocida, seleccionados a los fines de los ensayos.

5. Marco de referencia

5.1. Factores antinutricionales de semillas

5.1.2. Semilla

La semilla es una estructura vegetal que proviene del óvulo fecundado y que, al madurar, contiene al embrión vegetal y a las sustancias y compuestos de reserva. Este conjunto está envuelto por el tegumento seminal o episperma. El embrión vegetal se halla, en este caso, en estado de latencia y la disposición y origen de las estructuras tisulares que acumulan estas reservas, son variables. Las semillas varían en tamaño, forma, peso y color, lo que tiene un alto valor taxonómico. [Valla, 1979]

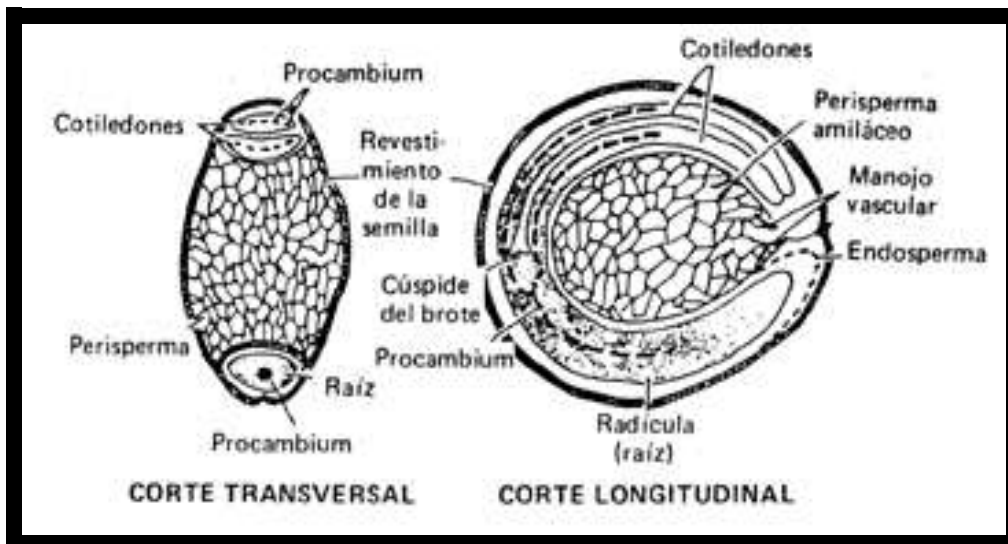


Figura [2]. Representación esquemática de una semilla dicotiledónea. Recuperado de:
<http://granoandino.blogspot.com.ar/2013/09/amaranto-descripcion-botanica.html>

5.1.3. Composición química de las semillas

Como se mencionó al describir la semilla, las sustancias y compuestos que almacenan como estructuras de reserva, pueden resultar muy completos desde el punto de vista nutricional, principalmente en aquellas semillas de legumbres y cereales. Pueden incluir: proteínas, carbohidratos, lípidos y los llamados micronutrientes, tales como vitaminas y minerales. Sin embargo, las semillas pueden contener muchos de los denominados factores antinutricionales, que se definen como productos del metabolismo secundario de las plantas, vinculados a funciones de defensa. Estos compuestos pueden perjudicar la asimilación de nutrientes de origen frecuentemente vegetal, en humanos y animales. De esta manera, producen la disminución del valor nutricional de muchos alimentos. [Elizalde y otros, 2009]. De acuerdo a los autores, la naturaleza química de estos factores es muy variada, como veremos a continuación, y desde el punto de vista fisiopatológico, es factible que muchos de ellos sean tóxicos o causen síntomas o signos como: afecciones pancreáticas y estomacales, flatulencias y manifestaciones como aglutinación de eritrocitos.

Según lo detallado en el artículo de Elizalde y otros [2009], los factores antinutricionales pueden ser clasificados como termo-estables y termo-lábiles.

-Factores termo-estables, son aquellos factores antigénicos, es decir, capaces de generar una respuesta inmunológica en el organismo que los ingiere; oligosacáridos, saponinas y fitatos, por nombrar los más importantes.

-Factores termo-lábiles: incluye estructuras como las lectinas y los inhibidores de proteasas (tripsina y quimotripsina), entre otros.

En este trabajo de investigación, centraremos el análisis en sólo uno de estos factores: las lectinas.

6.Lectinas

6.1.Reseña histórica

Alrededor del año 1888, fue descrito por el investigador Hermann Stillmark el efecto aglutinante de eritrocitos por la acción de los extractos obtenidos a partir de las semillas de *Ricinus communis* (*Euphorbiaceae*). Este descubrimiento es considerado como el origen de la Lectinología. Estos hallazgos fueron corroborados por otros investigadores como Hellin [1952], quien demostró por primera vez la presencia de factores aglutinantes de eritrocitos en la semilla de leguminosa *Abrus precatorius* (*Fabaceae*). [Van Driessche y otros, 2000].

Paul Ehrlich [1891] fue el primero en demostrar la relación de inmuno-especificidad entre estas toxinas y el antisuero, utilizando para las reacciones la ricina y la abrina. Estos ensayos sellaron el vínculo entre la Inmunología y la Lectinología. En adición, los investigadores Landsteiner y Raubitschek, observaron, a principios del siglo XX, la existencia del poder aglutinante de los extractos vegetales, y que el mismo dependía del origen de los eritrocitos empleados. A partir de ese momento, las lectinas se tornaron tema de interés en la Hematología, en particular para la caracterización de grupos y sub-grupos sanguíneos.

Entre los años 1916-1919, aproximadamente, el investigador James B. Summer consiguió cristalizar una proteína, la cual fue identificada y aislada a partir de las semillas de la planta *Canavalia ensiformes* (*Fabaceae*), a la que posteriormente denominó Concavalina A (ConA), trabajo por el cual recibió el premio Nobel. Posteriormente Summer y Howell [1936] estudiaron esta proteína y demostraron que la ConA, presentaba la propiedad de aglutinar células como eritrocitos, levaduras y también precipitaba soluciones de glucógeno. Además comprobaron que la hemoaglutinación podía ser inhibida por la sacarosa (azúcar), demostrando por primera vez la especificidad de las proteínas por el azúcar. [Rincón Alonso, 2014]

Luego en el año 1945 los investigadores Boyd y Shapleigh, observaron que la hemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (*Fabaceae*), también conocida como PHA, presentaba la propiedad de aglutinar eritrocitos pertenecientes al grupo sanguíneo A. Estos resultados fueron corroborados por los investigadores Watkins y Morgan en el año 1952, los cuales demostraron que la hemaglutinación y la especificidad se debían a la interacción de las lectinas con los carbohidratos presentes en la membrana de los eritrocitos. [Salgado Telpalo, 2006]

El término lectina, fue propuesto por William Boyd en el año 1956, y proviene del latín “*legere*”, que significa seleccionar. Luego, debido a las incipientes evidencias de la presencia de proteínas en los extractos de plantas, y de la propiedad para aglutinar eritrocitos, fueron denominadas hemaglutininas o fitohemaglutininas. [Gallego del Sol y otros, 2006]

Nowell y otros [1960] demostraron que la lectina de frijol estimula la modificación de pequeños linfocitos en reposo, en células mayores, por división mitótica (lectinas mitogénicas). Propiedad que facilita la observación de cromosomas y permite detectar aberraciones cromosómicas, así como patologías relacionadas con las mismas. Por tanto podrían ser usadas como antígenos no específicos. Desde el punto de vista inmunológico, eso permite indagar sobre los mecanismos por medio de los cuales “un antígeno es adsorbido a la membrana celular, estimulando el crecimiento del linfocito, su división, y finalmente la producción de anticuerpos”. [Van Driessche y otros, 2000, p. 149]

6.2. Naturaleza y mecanismo de acción de las lectinas

Las lectinas se definen como una amplia variedad de proteínas distribuidas en plantas, microorganismos y en tejidos de vertebrados e invertebrados. La mayoría de las lectinas de las plantas se encuentran en las semillas de los cotiledones (en el citoplasma o en el cuerpo proteico) y suponen hasta un 10% del nitrógeno total, aunque también se pueden encontrar en hojas, tallos, cortezas y frutos. A nivel celular, las lectinas son sintetizadas, procesadas y transportadas como proteínas que se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso y posteriormente se acumulan en vacuolas.

Estas proteínas, se encargan de reconocer de manera específica carbohidratos, aglutinan células y precipitan glicoconjugados, no poseen actividad enzimática, con excepción de las lectinas ribotóxicas (RIPs), y no se generan como consecuencia de una respuesta inmune.

Las lectinas vegetales participan en las interacciones entre las bacterias que fijan nitrógeno con la raíz de las plantas del género leguminosa (la bacteria infecta la raíz de leguminosa originando un nódulo que fija nitrógeno en forma de amonio). Tienen actividad mitogénica y pueden tener efectos protectores frente a patógenos, entre otras funciones. La

especificidad de diferentes lectinas por diferentes carbohidratos permite explicar la capacidad hemaglutinante de las lectinas. Cuando se conoce la especificidad del carbohidrato que se une a las proteínas que aglutinan los glóbulos rojos, se pueden denominar lectinas. Si se desconoce el carbohidrato específico que aglutina los hematíes, estas proteínas pueden denominarse fitohemaglutininas. [Rincón Alonso, 2014]

Las interacciones entre lectinas y monosacáridos se caracterizan por ser típicamente débiles y de afinidad baja, con constantes de afinidad en el rango de los milimolares. En comparación con la especificidad que presentan las interacciones enzima-sustrato, las lectinas muestran una especificidad menor. [Carrero Berzal, 2010]

En adición, las lectinas muestran alta afinidad y especificidad por las glicoproteínas y glicolípidos expresados en la superficie celular, lo cual representa una condición fundamental para la función de reconocimiento celular típico de estas estructuras químicas. Las lectinas también, forman interacciones con oligosacáridos específicos, por medio de una asociación polivalente, la cual requiere de muchas interacciones poco intensas en lugar de una única interacción de gran intensidad. [Carrero Berzal, 2010].

7.Lectinas vegetales

7.1.Generalidades

Las lectinas vegetales pueden reconocer de manera específica carbohidratos a través de enlaces tipo puente de hidrógeno, iones, interacciones hidrofóbicas, entre otros. El dominio de reconocimiento a carbohidrato puede ser dividido en dos sub-sitios. El primero corresponde al lugar donde se produce la interacción con el monosacárido. El segundo, llamado sitio extendido, participa en la interacción con oligosacáridos más complejos. [Hernández Cruz y otros, 2005]

En la tabla [1] se muestran algunos ejemplos de especies vegetales que contienen lectinas y el correspondiente monosacárido con el que manifiestan afinidad.

Monosacárido	Especie vegetal	Abreviatura de las lectinas
α -D-manosa, α -D-glucosa	<i>Canavalia ensiformis</i>	ConA
	<i>Lens culinaris</i>	LCA
β -galactosa, N-acetil- α -D-galactosamina	<i>Ricinus communis</i>	RCA
	<i>Glycine max</i>	SBA
	<i>Arachis hypogaea</i>	PNA
	<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL
N-acetil- β -D-glucosamina	<i>Triticum vulgare</i>	WGA
α -D-fucosa	<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA
	<i>Ulex europeus</i>	UEA
α -N-acetilneuramínico	<i>Limulus polyphemus</i>	LPA

Tabla [1]. Algunas especies vegetales que contienen lectinas, utilizadas para el estudio de glicoproteínas y su clasificación según su especificidad hacia monosacáridos. [Hernández Cruz y otros, 2005]

7.2. Estructura molecular de lectinas vegetales

La clasificación actual de las lectinas se basa en su estructura molecular. De esta manera, se ordenan en seis familias [Hernández Cruz y otros, 2005]:

A – lectinas de leguminosas; están constituidas por dímeros, trímeros o tetrámeros de subunidades idénticas, con peso molecular de ~30 kDa. Cada subunidad tiene un sitio de unión a carbohidrato que poseen iones metálicos: Mg^{2+} , Ca^{2+} o Mn^{2+} y se organizan en doce hojas β antiparalelas enlazadas formando bucles.

B – Lectinas con dominio de tipo heveína o específicas de quitina; suelen presentar dos subunidades iguales y de manera contraria a las lectinas de leguminosas, son ricas en cisteínas. Una de las subunidades está provista de cuatro dominios tipo heveína. Cada uno de ellos tiene un sitio de reconocimiento de carbohidrato que no requiere de la presencia de iones metálicos.

C – Lectinas de monocotiledóneas específicas a manosa; son tetraméricas. Cada uno de los monómeros tiene una secuencia de 36 aminoácidos (repetidas tres veces) y 12 kDa de peso molecular. El lugar de reconocimiento a carbohidrato presenta cuatro hojas β que corren entre sí de manera antiparalela y se mantienen unidas por giros.

D – Lectinas en forma de prisma β o del tipo jacalina; son lectinas tetraméricas glicosiladas. Cada subunidad presenta una cadena pesada α y una cadena liviana β y está formada por tres hojas β antiparalelas que se disponen constituyendo la forma de un prisma triangular.

E – Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas; son muy tóxicas. Presentan dos cadenas: cadena A, la cual es responsable de las propiedades tóxicas de estas lectinas; y cadena B, que es la que manifiesta función de lectina. Ambas cadenas son distintas entre sí y unidas por puentes disulfuro.

F – lectinas tipo amaranto; estas moléculas tienen dos monómeros con dominios N y C, unidos entre sí a través de una hélice 3^{10} . Cada uno de estos dominios manifiesta forma de trébol β .

Previamente, se clasificaron de acuerdo a la “estructura de sus dominios por Van Damme en 1988”, [Gallego Rubio, 2014, p. 7]. Así, se consideraban merolectinas las que sólo poseen un sitio de unión a carbohidratos; quimerolectinas aquellas con dos o más dominios “dispuestos en tándem”, además de otro aislado; hololectinas a las lectinas constituidas por dos o más dominios de unión a carbohidratos y finalmente, superlectinas que integrarían un grupo de quimerolectinas formados por dos o más sitios de unión a carbohidratos, puestos en tándem, pero de estructura y función diferentes.

La figura [3] representa la estructura molecular de ConA generada por medios bioinformáticos.

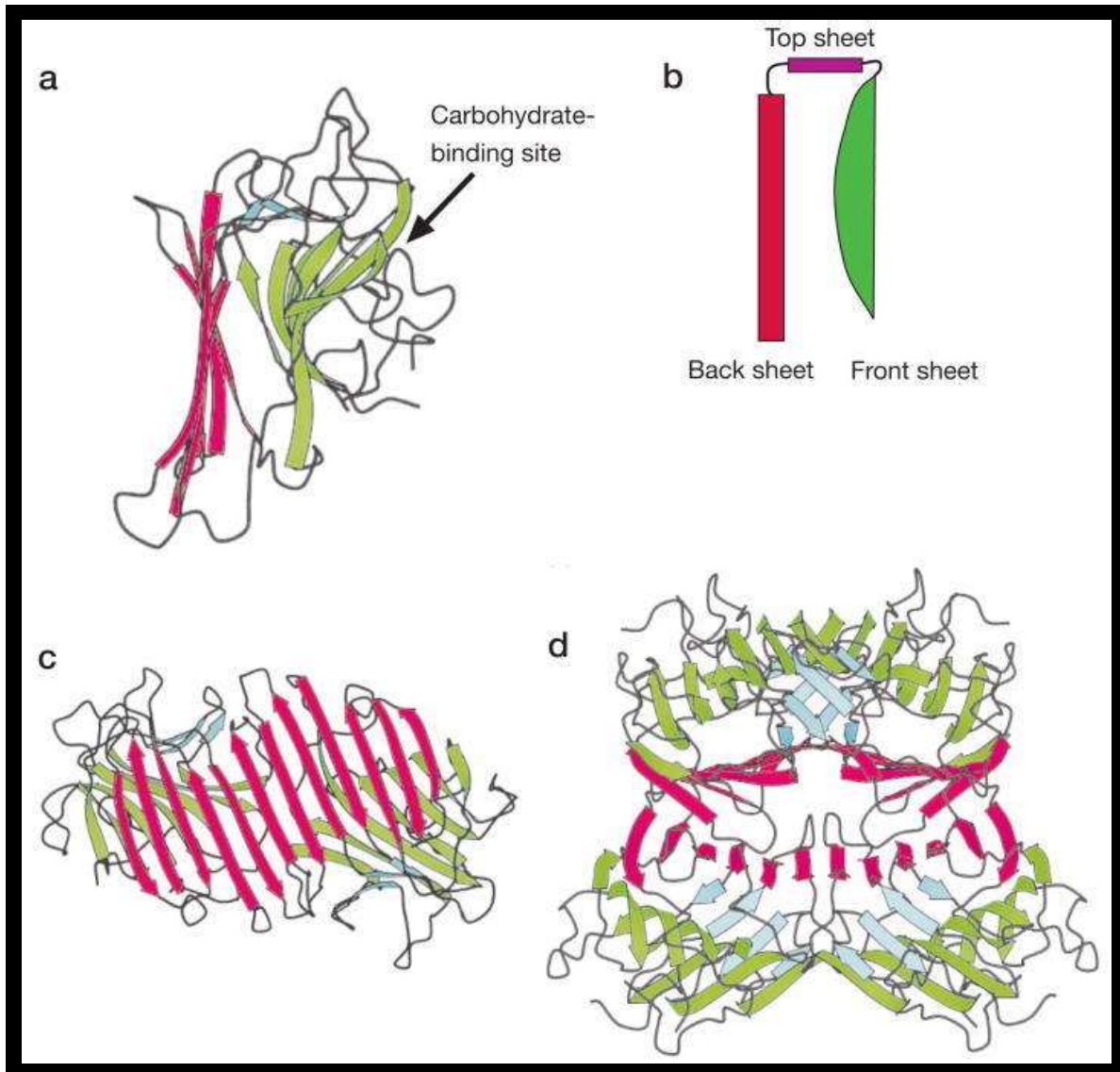


Figura [3]. Estructura tridimensional de ConA. [a] Estructura terciaria del monómero. [b] Lámina β trasera plana antiparalela de seis hebras (en rojo), una lámina β frontal de siete hebras (en verde) y una hoja superior de cinco hilos unidos por bucles de varias longitudes (en rosado). [c] Dímero de ConA. [d] Tetrámero de ConA.

[Varki y otros, 2009]

En la figura [4] se muestra un dibujo que representa los seis tipos de lectinas descritos anteriormente según su estructura. En recuadro, la representación de una lectina de *Amaranthus*, de interés particular en el presente trabajo.

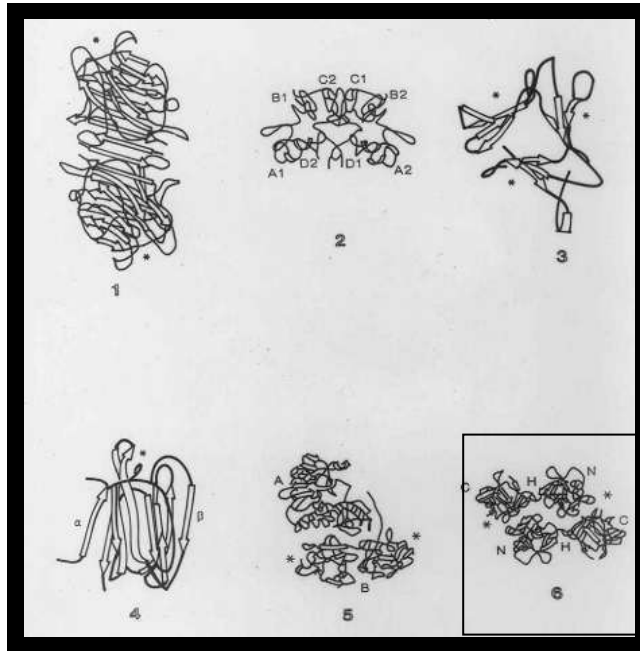


Figura [4]. Representación en el espacio de la estructura de lectinas descriptas. [1] Lectinas de leguminosas. [2] Lectinas con dominio tipo heveína. [3] Lectinas específicas de manosa. [4] Lectinas del tipo jacalina. [5] Lectinas inactivadoras de ribosomas. [6] Lectinas de amaranto. [Hernández – Cruz y otros, 2005]

7.3. Especificidad lectinas vegetales - monosacáridos

Se ha demostrado que las lectinas pueden reconocer carbohidratos de determinada secuencia, de manera que la especificidad hacia estos compuestos se mantiene entre proteínas de una misma especie. Por ejemplo, lectinas capaces de discriminar entre galactosa y N-acetil-D-galactosamina (GlcNAc). [Hernández Cruz y otros, 2005]

7.4. Especificidad lectinas vegetales – oligosacáridos

En lo que respecta a oligosacáridos, las lectinas también pueden manifestar afinidad, sea en posición terminal o en posición intermedia. Un ejemplo estaría representado por las lectinas de ConA y LCA, que presentan afinidad por moléculas oligosacáridas similares pero no

iguales. Esto es así, porque las dos lectinas reconocen estructuras oligosacáridas que se mantienen unidas por enlaces tipo N-glicosídico con una asparagina en una cadena proteica. [Hernández Cruz y otros, 2005]

7.5.Sitio de reconocimiento en lectina vegetales

Las lectinas que pertenecen a la misma familia, presentan ciertas homologías en sus estructuras, tales como su secuencia aminoacídica, su disposición tridimensional, etcétera. Pero además de esto, y de acuerdo a lo expresado por Hernández Cruz y otros [2005], una de las características más analizadas de las lectinas, desde el punto de vista estructural, es el punto de reconocimiento hacia carbohidratos. Este sitio - o dominio - de reconocimiento se puede dividir en un sitio que se corresponde con la región de interacción con el monosacárido, y otro, el denominado sitio extendido, que es el que da lugar a la interacción con oligosacáridos más complejos. Este dato es de gran importancia en cuanto a las variedades de efectos biológicos que manifiestan lectinas que presentan igual especificidad hacia un monosacárido.

7.6.Función fisiológica de las lectinas vegetales

Si bien han sido purificadas lectinas de tejidos de diferentes taxones de plantas, la mayoría de los conocimientos actuales acerca de las lectinas, proviene de estudios que se han llevado a cabo sobre leguminosas. Dentro de un organismo vegetal, las lectinas desarrollan diversas funciones, algunas de las cuales ya fueron numeradas en el presente trabajo de investigación. Desde el punto de vista operacional, las aplicaciones de las lectinas varían desde la localización de glicoconjugados, hasta su aislamiento y caracterización. A continuación, se detallan estas implicancias, de acuerdo a lo expresado por Van Driessche y otros [2000]:

7.7. Aplicaciones tecnológicas

Tipificación de grupos sanguíneos: como se ha mencionado anteriormente, algunas lectinas vegetales reconocen de manera muy específica ciertos determinantes de grupos sanguíneos. Hoy en día, se utilizan lectinas anti-A, anti-A₁, anti-B, anti-O (H) y otros. Ésta es la propiedad en la que se enfocará esta investigación.

En el diagnóstico clínico: las lectinas pueden ser usadas como herramientas en la detección de transformaciones malignas celulares. Poseen actividad antiretroviral por tanto podrían ser utilizadas para combatir el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). También podrían ser usadas como transportadoras de fármacos por vía oral. Como marcadores fluorescentes o con biotina en estudios histológicos, en la identificación de patógenos, como marcadores en técnicas histoquímicas y de microscopía, entre otras funciones.

Actividad antiviral: muchas de las lectinas conocidas como RIPs, que corresponden a aquellas que poseen actividad enzimática N-glicosidasa, ejercen su acción de forma irreversible en los ribosomas de ARN ribosomal, inhibiendo así la síntesis de proteínas, como así también sobre ácidos nucleicos, actuando como DNasas, antivirales, entre otros. la mayoría de las RIPs que manifiestan actividad antiviral, al menos hacia virus vegetales, son RIPs de tipo I, con una excepción conocida, que corresponde a la RIPs tipo II de *Eranthis hyemalis*. Estas moléculas ejercen su acción de manera directa sobre las partículas virales o ácidos nucleicos del virus a través de su actividad polinucleótido: adenosina glicosidasa. En una segunda instancia, las RIPs ingresarían a al citosol de las células infectadas de forma selectiva, provocando la destrucción de la maquinaria de síntesis proteica evitando así que el virus no puede desarrollar su ciclo. [Carpio, 2016]

Actividad antibacterial: las investigaciones respecto a este tema, sugieren que el rol que ejercen las lectinas vegetales en la defensa de la planta contra bacterias es indirecto, y se basa en interacciones entre éstas y los carbohidratos de la pared celular bacteriana o los glicanos expresados en su superficie celular, como por ejemplo, la lectina de papa, [Sequeira, 1977, citado de Carpio, 2016]; en bloqueos del movimiento bacteriano en la interfase aire-agua, como es el caso de la lectina de *Datura stramonium*. [Broekaert, 1986, citado de Carpio, 2016]

Actividad antifúngica: al igual de lo que ocurre con las bacterias, las lectinas vegetales ejercen un efecto indirecto sobre las células fúngicas, dado que no pueden penetrar a su citoplasma por la existencia de la pared celular. Este accionar indirecto estaría relacionado con la capacidad de unión de las lectinas a carbohidratos de superficie. No se conoce la actividad antifúngica de todas las lectinas purificadas. [Peumans, 1995, citado de Carpio, 2016]

Actividad insecticida: en este caso, la lectina se liga a algún receptor glicoproteínico de la superficie celular del epitelio intestinal del insecto, dando lugar a que el insecto sea repelido, que su crecimiento se vea retardado, o bien muera. Aun así, los mecanismos de acción de las lectinas vegetales en estos casos es poco conocida. [Zhu y otros, 1998, citado de Carpio, 2016]

Actividad antitumoral: existen varios estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, que revelan que las lectinas pueden ejercer actividad antitumoral, es decir, inhibición tanto en el crecimiento de la masa tumoral, como así también en la inducción del desarrollo de éste por carcinógenos. No todas las lectinas aisladas y purificadas han sido estudiadas desde este punto de vista. [Carpio, 2016]

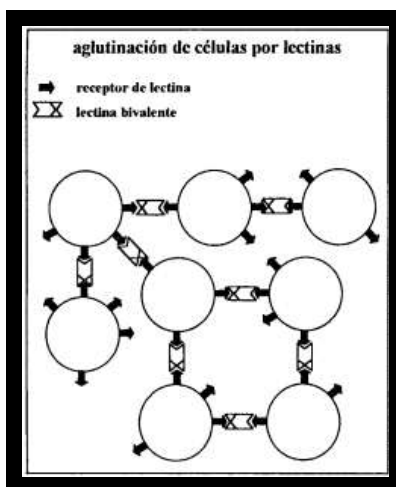


Figura [5]. Representación esquemática de aglutinación eritrocitaria mediada por lectinas con dos sitios de unión a carbohidratos. Recuperada de Van Driessche y otros [2000]

La mayor parte de las lectinas reaccionan con preferencia con las regiones terminales de los carbohidratos, pero también lo hacen con las regiones internas o ramificaciones de las

cadena de carbohidrato. Se conoce que, en el caso de lectinas de leguminosas, la acción hemaglutinante puede estar relacionada a la presencia de iones metálicos presentes en su estructura. A veces, ciertas lectinas necesitan la presencia de iones Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} como requisito para el mantenimiento activo de sus sitios de unión y conservar así la actividad hemaglutinante. De las leguminosas se conoce que sus lectinas tienen un sitio hidrofóbico que media la unión de compuestos no polares. Esto permite sugerir que la estabilidad de la molécula se alcanza mediante interacciones hidrofóbicas. Estos sitios hidrofóbicos constituyen cavidades en la estructura molecular, permitiendo desempeñar un rol biológico importante o potenciar las funciones de las lectina en el vegetal. [Calderó, 1990, citado de Salgado Telpalo, 2006]

8. Amaranto

8.1. Género *Amaranthus*

El amaranto, como comúnmente se lo conoce, es una planta que comenzó a cultivarse hace alrededor de 5000 años y constituyó la base alimenticia de civilizaciones precolombinas, como la azteca, inca y maya, al mismo nivel de importancia que el maíz y otros cereales. Geográficamente, el origen del amaranto se atribuye a áreas distribuidas a través de México, sudoeste del actual Estados Unidos y parte de Centroamérica (particularmente, *Amaranthus cruentus* y *Amaranthus hypochondriacus*). En América del Sur, las regiones de cultivo corresponden a áreas andinas, sobretodo: sur de Ecuador, Perú, Bolivia y norte de Argentina. Con la colonización de América, el amaranto fue conocido en otras regiones del mundo, tales como Europa, África y Asia. El género *Amaranthus*, nombre derivado del griego que significa inmarcesible, es decir, que no se marchita, por la textura escariosa de sus flores, comprende más de 50 especies herbáceas, en su mayoría anuales. Se conocen diez especies dióicas (*Agreggii*, *A. arenicoa*, *A. watsoni*, *A. palmierí*, *A. tamariscinus*, *A. floridanus*, *A. tubercuatus*, *A. australis*, *A. cannabínus* y *A. acanthochítón*) mientras que el resto son monoicas. Las especies dioicas son originarias de América del Norte, las especies monoicas, en cambio, se distribuyen desde el sur de los Estados Unidos de América hasta Argentina y Chile. [Sánchez y otros, 2013]

En general, las especies de este género tienen un metabolismo de tipo C4, que le otorga la propiedad de ser más eficientes en el uso del agua, y por tanto acrecentar su productividad. [Becker, 1989, Aphalo y otros, 2004, citados de Castel y otros, 2010]

8.2. Composición Química del género *Amaranthus*

En ocasiones, el grano de *Amaranthus* es considerado un pseudocereal. Químicamente, su compuesto principal es el almidón (aproximadamente, 50%), pero es valorado fundamentalmente por su contenido de lípidos y proteínas. Posee además niveles elevados de calcio, fósforo, magnesio, hierro, zinc, cobre, entre otros. [Becker, 1981, Breene, 1991, Tosi y otros, 2001, Marcílio y otros, 2003, citados en Castel, 2010]

Se estima el contenido proteico del *Amaranthus* en torno al 16%, algo superior al de los cereales más consumidos, como trigo, maíz y arroz. De ese contenido, alrededor del 2% corresponde a lectina. [Calderón de la Barca y otros, 1987]. En la tabla [2] se compara el contenido proteico en diversas especies vegetales.

La semilla de *Amaranthus* presenta fracciones proteicas que corresponden a: albúminas, globulinas y glutelinas, cada una de las cuales se diferencia en su solubilidad. Es importante destacar que en un aislado proteico de *Amaranthus*, la proporción de cada una de las fracciones, como así sus propiedades funcionales están en directa relación con el método de extracción utilizado.

Respecto a la lectina de *Amaranthus*, algunas investigaciones sugieren que se trata de una glicoproteína (3,69% de carbohidratos totales), formada por dos subunidades cuyo peso molecular es de 26,68 y 28,43 kDa, respectivamente. Mantiene su actividad biológica estable a pH entre 6,0 a 8,0 y a temperaturas que oscilan entre 25 a 60°C. Estos datos se grafican en la figura [6]. [Salgado Telpalo, 2006]

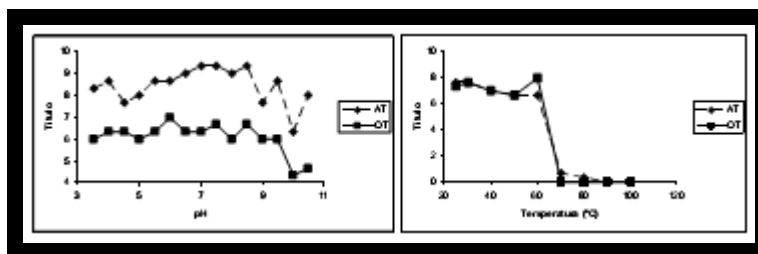


Figura [6]. Curvas de bioactividad de lectina de Amaranthus a diferente pH y temperatura.

Además contienen ácidos grasos polisaturados, que son importantes por su valor nutritivo y son de utilidad en la industria farmacéutica debido a que presentan propiedades emulsificantes y gelificantes, así como otros compuestos. Ver tabla [3]. [Greizerstein, 1995]

Especie	Proteína
Amaranto	13,6 – 19,0
Cebada	9,5 – 17,0
Maíz	9,4 – 14,2
Arroz	7,0 – 10,0
Trigo	11,0 – 14,0
Centeno	9,4 – 14,0

Tabla [2]. Contenido total de proteínas del Amaranto comparado con los principales cereales. [FAO, 1997]

En la tabla [3] se detalla la composición química de Amaranto:

Composición química	Peso (100 g materia seca)
Proteína	13,9- 19
Carbohidratos	71,8
Lípidos	6,1-8,1
Fibra	3,5 – 5,0

Cenizas	3- 3,3
Energía (Kcal)	391
Ca (mg)	130
P (mg)	164
K	800

Tabla [3]. Composición química de la semilla de Amarantho (por 100 gramos en base seca). [FAO, 1997]

Ha sido comprobado el incremento exponencial del componente proteico en semillas de Amarantho, en cultivares expuestos a fertilizantes en un ciclo de cultivo. [Piñuel y otros, 2014]

8.3.Capacidad antioxidante de semillas de *Amaranthus*

Ya se ha mencionado que los tejidos vegetales, y en particular la semilla, poseen diversos compuestos bioactivos, entre ellos, los antioxidantes. Se pueden definir como sustancias que favorecen la integridad celular al prevenir la oxidación al inactivar los radicales libres. [López Mejía y otros, 2014]. De esta manera, el mecanismo de acción de los antioxidantes consiste en evitar la oxidación de biomoléculas por los radicales libres. [Halliweell y Gutteridge, 1998; Fang y otros, 2002, citados de Castel, 2010]

De acuerdo a López Mejía y otros [2014], éstos han sido profundamente estudiados debido a sus posibles usos en áreas como la industria alimentaria y cosmética. Los principales antioxidantes son: las vitaminas C y E, los carotenoides, los flavonoides y los compuestos fenólicos.

A continuación, se detallan características biológicas de las variedades y especies de Amarantho seleccionadas para el desarrollo del presente trabajo. Allí también, se detalla una breve caracterización de la soja, de cuya semilla se prepararon extractos que fueron utilizados como control (negativo).

8.4. Características botánicas generales del género *Amaranthus*

En los próximos párrafos se caracterizarán brevemente y de manera individual las características botánicas de los genotipos del género *Amaranthus* analizados en este trabajo. Sin embargo, en términos generales, se puede indicar que las plantas se dispersan por medio del viento o la lluvia. Luego de la maduración y la caída de las semillas, la planta muere. Se reproducen, fundamentalmente, por autofecundación. [Greizerstein, 1995]. Dentro de este grupo, se encuentran especies cultivadas como hortalizas, productoras del grano, forrajeras, tintóreas, ornamentales. Figura [7].



Figura [7]. Ejemplar de *Amaranthus*. Gentileza de: INTA-Anguil y UNLPam.

8.5. *Amaranthus hypochondriacus*

Las plantas de la especie *Amaranthus hypochondriacus* son herbáceas y se definen como anuales, de tallo simple o con presencia de ramificaciones y que pueden alcanzar una altura de hasta tres metros. De hojas simples, de forma elíptica y alternas y de ápice agudo.

Presencia de inflorescencia muy densa y con espigas. Las semillas son características de color blanco, dorado, café y negro. [Grubben y otros, 1981, citado de Sánchez y otros, 2013]



Figura [8]. *Amaranthus hypochondriacus*. Recuperado de: <http://www.uky.edu/ccd/production/crop-resources/gffof/amaranth>

8.6. *Amaranthus cruentus*

Amaranthus cruentus se define como una planta herbácea, erecta y con alturas que puedan alcanzar los dos metros. El tallo se presenta generalmente simple y a veces ramificado. Las hojas son elípticas y de ápice agudo. Las inflorescencias bien desarrolladas presentan espigas. Las semillas pueden ser de color marrón, negras, blancas y amarillas. [Grubben y otros, 1981, citado de Sánchez y otros, 2013]



Figura [9]. *Amaranthus cruentus*. Recuperado de: <https://www.mullerseeds.com/amaranthus-cr-velvet-curtains.html>

8.7. *Amaranthus caudatus*

Amaranthus caudatus se define como una planta anual, herbácea, de tallo poco ramificado, con un desarrollo de altura de hasta dos metros. Forma de hojas variable, la inflorescencia presenta espigas largas y de forma colgante y de apariencia glomerular, aspecto muy característico en esta especie. Las semillas son blancas de reborde rojo o de color rosado y negro. [Grubben y otros, 1981, citado de Sánchez y otros, 2013]



Figura [10]. *Amaranthus caudatus*. Recuperado de: <https://www.po.flowerscanadagrowers.com/our-products/3739/amaranthus/caudatus>

8.8. *Amaranthus pumilus*

Los ejemplares de *Amaranthus pumilus* son anuales, bajos y de escaso crecimiento. Presentan hojas carnosas de color verde oscuro y apariencia redondeada, de aproximadamente 2 cm de longitud. Estas hojas se presentan agrupadas en las puntas de los tallos, los cuales suelen ser rojizos. Son plantas monoicas y sus semillas pueden presentar un tamaño de 2 a 2,5 cm. [Bucher y Weakley, 1990]



Figura [11]. *Amaranthus pumilus*. Recuperado de: <https://www.fws.gov/northeast/njfieldoffice/pdf/sbanjfact.pdf>

8.9. *Glycine max.* (Soja)

8.9.1. Efecto aglutinante de lectina de soja

La soja, cuyo nombre científico es *Glycine max*, es una especie perteneciente a la familia de las leguminosas (Fabaceae). Su cultivo se ha extendido, principalmente, por el contenido proteico y de aceite de su semilla. [SINAVIMO, 2014]

De acuerdo a los resultados obtenidos en un estudio efectuado por Rodríguez y otros, [2004], se concluyó que no existe evidencia macroscópica de hemaglutinación de lectinas de soja, aunque observaciones efectuadas con técnicas de microscopía permitieron demostrar la existencia de aglutinados.

En otros estudios se observó que la lectina de soja manifiesta selectividad hacia la N-acetilgalactosamina. Esta lectina se une también a la galactosa presente en el colágeno, produciendo la precipitación de estas proteínas en solución [Sharon, 1977, citado de Micucci y otros, 1987]

9. Conceptos generales de inmunología de grupos sanguíneos

9.1. Antígenos y anticuerpos

Los anticuerpos, o inmunoglobulinas, constituyen proteínas plasmáticas que se sintetizan en el organismo como respuesta a la exposición de éste a un antígeno. Presentan una diversidad y especificidad inmensas en lo que refiere a la posibilidad de reconocer estructuras extrañas, siendo los principales mediadores en la inmunidad humoral. [Abbas, 2012]. Esta especificidad se debe a que son capaces de reconocer determinantes antigénicos (epítomos). Las cinco clases de inmunoglobulinas son: IgM, IgG, IgA, IgE e IgD. Todas estas moléculas de anticuerpos presentan una estructura similar, pero las regiones que unen antígenos presentan gran variabilidad. [Kindt, 2007]

A modo de ejemplo, en la figura [12] se ilustra la estructura cristalina de Inmunoglobulina G (IgG).

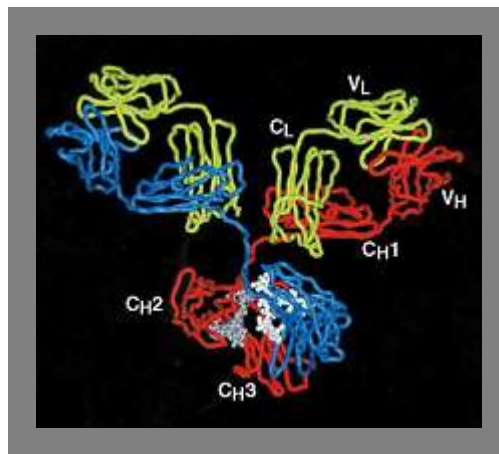


Figura [12]. Estructura cristalina de IgG. [Abbas, 2012]

Un antígeno es, entonces, una sustancia con capacidad de desencadenar una respuesta inmune en el organismo, generando la síntesis de anticuerpos específicos. En el caso de los grupos sanguíneos, los antígenos pueden ser tanto proteínas como glicoproteínas estructurales de la membrana de los eritrocitos. Los anticuerpos pueden interactuar fundamentalmente con la cadena polipeptídica o de carbohidratos y las cadenas de glicolípidos. La gran mayoría de las proteínas que se expresan sobre la superficie eritrocitaria se presentan glicosiladas. [García Arbeláez, 2009]

10. Antígenos de membrana eritrocitarios

10.1. Concepto de grupo sanguíneo

Un grupo sanguíneo es una característica heredada que se expresa sobre la superficie de los eritrocitos y puede ser reconocida por el anticuerpo específico correspondiente. Un

sistema de grupo sanguíneo está constituido por “antígenos heredados como grupo”. [García Arbeláez, 2009, p. 49]

A continuación, se caracterizan brevemente los antígenos de membrana eritrocitarios, según la *American Association of Blood Banks* [2015] que se utilizarán en los ensayos del presente trabajo. Las descripciones se enfocan hacia la composición glucídica de las moléculas antigénicas.

10.2. Grupos sanguíneos ABO, H, Lewis y antígenos relacionados

Los antígenos de los sistemas de grupos sanguíneos ABO, H, I, Lewis y P están definidos por epítopes de carbohidratos en las glicoproteínas y glicolípidos. La síntesis de estos antígenos depende de la acción de enzimas que en conjunto reciben el nombre de glicosiltransferasas. Las mismas residen en el aparato de Golgi y su función radica en la adición de azúcares específicos, de acuerdo a una secuencia específica y a través de enlaces estéricos o anoméricos (enlace- α ; enlace- β), a las cadenas de oligosacáridos en crecimiento en los glicolípidos y glicoproteínas.

10.3. Sistema ABO

El sistema ABO es el más importante en el ámbito de la medicina transfusional y trasplante de órganos. En el tejido sanguíneo, los antígenos del sistema ABO se pueden expresar en los eritrocitos, las plaquetas e inclusive en diversas proteínas circulantes en plasma. También se presentan en otros tejidos, como el endotelio, intestino, páncreas, corazón, entre otros. El sistema ABO consta de cuatro fenotipos mayores; A, B, O y AB. Cada uno de estos se determina por la presencia o ausencia de dos antígenos, sea A o B en los eritrocitos. El sistema ABO también se define por la presencia o ausencia de anticuerpos naturales, que van dirigidos hacia los antígenos A y/ o B ausentes.

Los antígenos A y B están definidos por tres epítopes, cada uno de los cuales presenta un azúcar terminal ligado a glicolípidos y glicoproteínas. El antígeno H se define por una $\alpha 1 \rightarrow 2$ fucosa terminal, donde dos enzimas distintas de fucosiltransferasa (FUT) se encargan de sintetizar este antígeno: la FUT1 (gen H) y FUT2 (gen secretor). Resulta ser el precursor biosintético de los antígenos A y B. En el caso del antígeno A, se adiciona una N-acetil-galactosamina a la subterminal galactosa del antígeno H, en enlace $\alpha 1 \rightarrow 3$. Así, queda determinado el antígeno A. En el caso del antígeno B, se adiciona una galactosa $\alpha 1 \rightarrow 3$ a la subterminal galactosa. De esta manera queda determinado el antígeno B.

En individuos cuyas células expresan el AB, tanto la N-acetil-galactosamina como la galactosa son sintetizadas. En individuos de grupo O no se sintetiza ninguna de las dos estructuras. De manera que estos individuos solo expresan el antígeno H. En el fenotipo Bombay, tanto el antígeno A como el B están ausentes producto de la ausencia del precursor del antígeno H.

El antígeno H está bien expresado en eritrocitos de grupo O, dado que los individuos de grupo O no poseen el gen funcional ABO. En aquellos con grupo A o B, la proporción de antígeno H es menor, debido a que el H se transforma en antígeno A y B.

En la práctica puede utilizarse la lectina de anti - H de *Ulex europaeus*, con el fin de determinar la cantidad de antígeno H, basada en la aglutinación. Se representa de la siguiente manera: $O > A_2 > B > A_2B > A_1 > A_1B$. El H está relacionado con las funciones de adhesión celular, diferenciación hematopoyética, neoplasias, entre otras.

10.4.Sistema Lewis

El sistema de grupo sanguíneo Lewis manifiesta dos antígenos principales, Le^a y Le^b , y se expresa en tres fenotipos comunes: $Le(a+b-)$, $Le(a-b+)$ y $Le(a-b-)$. Se pueden expresar en otras células. No son sintetizados en los eritrocitos, sino que son “adsorbidos pasivamente en las membranas eritrocitarias a partir de una mezcla plasmática de glicolípidos solubles, con la estructura del antígeno Lewis”.

10.6.Sistema Rh

El sistema de grupo sanguíneo Rh es, luego del ABO, el más importante. Existen dos genes que codifican los antígenos CDE. En la actualidad, la terminología del sistema Rh incluye antígenos, genes y proteínas. Los antígenos se indican como: D, C, c, E y e. Los genes se designan con letras mayúsculas: RHD y RHCE. Las proteínas son: RhD, o Rhce, RhCe, RhcE y RhCE, según los antígenos específicos que posean.

En la mayoría de los casos, los fenotipos D negativos se deben a la supresión del gen RHD. Si un individuo D negativo se expone al RhD, se induce la síntesis de anticuerpos anti-D, los cuales, al reaccionar con los antígenos correspondientes, pueden ocasionar Enfermedad Hemolítica Feto-neonatal.

10.7.Sistema MNS

Este sistema de grupo sanguíneo comprende 46 antígenos. De la misma forma que ocurre con el Rh, parte de la complejidad de este sistema es debido a la recombinación entre genes homólogos.

10.8.Sistema Kell

La denominación correcta de este sistema es K o KEL1. Éste es el primer antígeno identificado luego del descubrimiento de la prueba AGH en el año 1946.

El antígeno antitético de este sistema es el k o KEL2.

El sistema Kell incluye 32 antígenos.

10.9.Sistema Duffy

El sistema Duffy incluye 5 antígenos que se encuentran en la glicoproteína codificada por el gen Duffy. El polimorfismo de este sistema incluye la presencia de los antígenos Fy^a y Fy^b, que dan lugar a cuatro fenotipos: Fy(a+b-), Fy(a+b+), Fy(a-b+) y Fy(a-b-).

10.10.Sistema Kidd

Los antígenos del sistema Kidd son tres, y se ubican sobre una glicoproteína que presenta 10 dominios de membrana, con las terminales N y C del lado intracelular, y el sitio N-terminal para la glicosilación extracelular.

11. Antecedentes de estudios realizados

En el año 2004, un equipo llevó a cabo un estudio denominado “*Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las Fabáceas sobre los eritrocitos humanos mediante el análisis de imágenes*”. En el mismo, los autores evaluaron las características y dimensiones de los aglutinados formados por la interacción de lectinas extraídas de plantas de la familia de las Fabáceas y los carbohidratos expresados en la membrana eritrocitaria. Para ello se valieron del uso de imágenes digitales y analizaron los resultados obtenidos calculando el ASP, esto es, *Agglutination Shape Parameter*. Como conclusión del estudio efectuado, los autores establecieron que es posible emplear dicho cálculo como un parámetro adicional de calidad cuando se utilizan preparados de lectinas en el laboratorio inmunohematológico. [Rodríguez y otros, 2004]

En el año 2012, se efectuó un estudio titulado “*Aplicación de lectinas vegetales como reactivos inmunohematológicos*”. En el mismo, utilizaron numerosos extractos de lectinas vegetales que usaron como reactivos hemoclasificadores. Prestaron atención a ciertos parámetros de calidad del reactivo y de acuerdo a los resultados obtenidos, concluyeron que deben ampliarse los estudios vinculados a la unión lectina-carbohidrato, ya que el uso de estos extractos sería de utilidad en el laboratorio inmunohematológico. [Lebensohn y otros, 2012]

Un estudio publicado en 2012, expone de qué manera una lectina de origen vegetal presenta afinidad por el antígeno T de la membrana eritrocitaria, el cual no se encuentra normalmente expuesto en la superficie celular y su expresión debe inducirse previamente a la exposición de éste con la lectina por la acción de neuraminidasas de origen microbiano. Este estudio demostró que este tipo de proteínas vegetales presenta afinidad hacia carbohidratos de membrana. [Balaguera Gualteros y otros, 2012]

En 1978, se publica un estudio en el que se expone una investigación en la que se describe el aislamiento y caracterización de la lectina de raíz de diversos vegetales, donde se demuestra que la cantidad de proteína varía según: especie de planta considerada, edad de la planta y órgano examinado. Además, incluyen una técnica para la extracción de la lectina de raíz de Haba. [Navarro y otros, 1978]

Un trabajo publicado en 2016, revela información muy interesante vinculada a lectinas de *Amaranthus hypochondriacus*. En este estudio, se buscó determinar la actividad antiproliferativa de las lectinas, por lo que fueron purificadas y testeadas teniendo en cuenta diversas características fisicoquímicas, como así también la propiedad hemaglutinante, que resultó positiva. Este trabajo aportó datos de gran valor y puso de manifiesto la posibilidad reactiva de al menos una especie de este género. [Mengoni y otros, 2016]

12. Diseño metodológico

El presente trabajo de investigación es de tipo cuantitativo y de alcance descriptivo, correlacional, explicativo y de diseño experimental.

12.1. Variables a medir:

Características químicas de los extractos de semillas:

- Presencia de proteína.
- Perfil proteico general de los extractos.
- Poder antioxidante.

Bioactividad y selectividad de los extractos de semillas frente a eritrocitos seleccionados:

- Presencia o ausencia de aglutinación.
- Intensidad de aglutinación.
- Tiempo de aglutinación.

12.2. Recolección de la información empírica

La unidad de análisis corresponde a cada uno de los siete extractos de semillas de las variedades y especies seleccionadas del género *Amaranthus* que se cultiven en la Región Semiárida Pampeana.

La muestra corresponde a las semillas seleccionadas de cultivares de la Región Semiárida Pampeana que fueron utilizadas para la producción de los extractos.

La población o universo corresponde al conjunto de semillas de los genotipos del género *Amaranthus* cultivados en la Región Semiárida Pampeana.

13. Materiales y métodos

13.1. Materiales de origen biológico

13.1.1. Muestras de semillas de *Amaranthus*

En este estudio fueron analizadas semillas provenientes de plantas del género *Amaranthus*, derivadas del INTA-Anguil de la provincia de La Pampa. Estas muestras se produjeron en el marco del Programa: Amarantho: investigación y actividades destinadas a su promoción e inserción en la sociedad. Universidad Nacional de La Pampa-INTA-CONICET-Comunidad Económica Europea.

Si bien algunos de los ejemplares estudiados provienen de diversos puntos geográficos, correspondientes a genotipos producidos en esos respectivos lugares, como se expone en la tabla [4], en todos los casos, el cultivo y posterior cosecha, se llevó a cabo en el área agropecuaria de la Facultad de Agronomía, de la Universidad Nacional de La Pampa, Argentina; (S: 36° 32, 726', W: 64°, 18, 721', 220 msnm). El suelo del campo en cuestión se clasifica como Aplustol éntico y el cultivo se efectuó en temporada estival. [Reinaudi y otros, 2011]

En la tabla que se muestra a continuación, se detallan los nombres de las variedades y especies seleccionadas para la preparación de los extractos a ensayar, como así también su procedencia geográfica original. El número secuencial que se utilizó para rotular cada uno de los extractos, se mantuvo a lo largo de todo el trabajo.

Número de extracto	Variedad/especie y origen
<i>Ex1</i>	<i>Amaranthus cruentus</i> var. Morelos (México)
<i>Ex2</i>	<i>Amaranthus cruentus</i> cv. Candil (Río Cuarto, Argentina)
<i>Ex3</i>	<i>Amaranthus cruentus</i> var. Tarasca morfotipo mexicano (México)
<i>Ex4</i>	<i>Amaranthus cruentus</i> var. Amont (USA)
<i>Ex5</i>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i> 280 FK-FH1 (Hungría)
<i>Ex6</i>	<i>Amaranthus caudatus</i> L. CAC 48A (Perú)
<i>Ex7</i>	<i>Amaranthus pumilus</i> RAFIN K 340 (República Checa)

Tabla [4]. Genotipos y origen de *Amaranthus* evaluadas. Se incluye, además, el número que se le asignó a cada extracto a lo largo de todo el trabajo, según el ejemplar considerado.

Una vez cosechadas las semillas y realizados los análisis agropecuarios pertinentes, parte de la cosecha fue destinada a la realización de este trabajo.

13.1.2. Muestras de eritrocitos

Para la preparación de las suspensiones de eritrocitos al 4% v/v, se utilizó sangre entera, recolectada con anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), proveniente de:

- pacientes ambulantes adultos, sin patologías diagnosticadas,
- caninos adultos sin patologías diagnosticadas, provenientes de laboratorio bioquímico veterinario,

- se utilizaron ejemplares de ratas machos de la cepa Wistar, con un peso aproximado de 250 gramos y mantenidas en bioterio. Éstas fueron alojadas en grupos de cinco individuos, durante siete días antes del inicio de los ensayos. Las ratas tuvieron permanentemente acceso libre a agua y alimento, excepto cuando las condiciones experimentales imponían otros requisitos. Los animales permanecen en jaulas aisladas, con un ciclo luz/ oscuridad 12:12 (luz

de 8:00 a 20:00 horas) y a temperatura ambiente controlada 22°C (+/- 1°C). La extracción de sangre de las ratas fue efectuada entre las 9:00 y las 11:00 horas. Los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de una solución de ketamina (50 mg/Kg).

13.1.3.Reactivos y solventes

Para la preparación de los extractos de semillas y lavado de eritrocitos, se utilizó solución salina, solución estéril de cloruro de sodio NaCl al 0.9% (p/v) en agua (Laboratorios Delva, República Argentina).

Para la tipificación de eritrocitos ABO RhD, se emplearon reactivos de anticuerpos monoclonales: anti – A; anti – B y Anti - D (Rho).

Se emplearon suspensiones de eritrocitos reactivos al 2-4% como paneles para la detección de anticuerpos irregulares (*Reagent Red Blood Cells for detection of unexpected antibodies*, Panoscreen[®]), a los fines de contar con eritrocitos de fenotipo conocido para los siguientes antígenos de membrana: D, C, E, c, e, M, N, S, s, P₁, Le^a, Le^b, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b.

Proteínas totales AA para método colorimétrico de detección de proteínas (Wiener lab, República Argentina).

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132, para la determinación del poder antioxidante. (Sigma lab).

Para la preparación de los extractos por solventes, se utilizó hexano al 100% (Cicarelli, República Argentina) y etanol al 100% (Cicarelli, República Argentina).

13.2.Métodos

13.2.1.Obtención de los extractos

La preparación de los extractos se efectuó, con algunas modificaciones, de acuerdo al método 2-16, propuesto en el Manual Técnico de la *American Asociation of Blood Banks* [AABB], para la preparación y utilización de lectinas.

Para la preparación de la harina de las semillas para los extractos, las mismas fueron trituradas en un molinillo apropiado, luego conservadas en papel madera y protegidas de la luz.

Para cumplir con los objetivos de este estudio, partimos del material seco y molido correspondiente a las semillas de las variedades y especies seleccionadas. Se determinó el peso seco de cada una de las muestras molidas, obteniéndose los siguientes valores, detallados en la tabla [5]:

Número de extracto	Peso (en gramos)
1	1,006 g
2	1,003 g
3	1,002 g
4	1,001 g
5	1,000 g
6	1,000 g
7	1,006 g

Tabla [5]. Peso seco (en gramos), de cada una de las muestras de harina obtenidas de las variedades y especies de *Amaranthus* seleccionadas.

1 - Se colocó 1,000 gramo de la harina obtenida de cada una de las variedades y especies de semillas molidas, en siete tubos cónicos, cada uno de los cuales fue rotulado como se indica en la tabla [4].

- 2 - En cada tubo se adicionaron 15,00 mL de solución salina (solución estéril de cloruro de sodio NaCl al 0.9% (p/v) en agua) y cada tubo se agitó en vórtex durante 3-5 minutos.
- 3 - Se incubó a temperatura ambiente durante 12 horas y luego a 8°C.
- 4 - Luego de ese tiempo, cada tubo se agitó nuevamente en vórtex durante 3-5 minutos.
- 5 - Cada uno de los sobrenadantes fue filtrado y trasvasado a otros tubos.
- 6 - Cada sobrenadante fue centrifugado durante 5 minutos a 3500 rpm.
- 7 - Los extractos quedaron listos para su uso.

13.2.2.Determinación de las características químicas y evaluación de la estabilidad y bioactividad selectiva de los extractos

Para determinar las características químicas y evaluar la estabilidad y bioactividad de los extractos, se desarrollaron diversos métodos para estudios fitoquímicos.

En primera instancia, fue analizada la presencia de proteínas, además de un perfil proteico preliminar, para verificar si el método de extracción era apropiado a las finalidades del estudio.

En segundo término, se determinó, de manera semicuantitativa, el poder antioxidante, con el fin de explorar si el método de extracción salina facilitaba la obtención de este tipo de compuestos.

En una tercera instancia, se procedió a realizar un ensayo de estabilidad durante 10 días, para evaluar si las propiedades biológicas del extracto se mantenían intactas durante ese período de tiempo. Para cumplir con este objetivo, el extracto total fue dividido en fracciones, una parte de ellas fueron conservadas en la heladera, a 8°C y las otras fracciones congeladas a -20°C. Durante ese período de tiempo, algunas fracciones fueron retiradas un día después, 3 días, 6 días y 9 días después, tanto del freezer como de la heladera para determinar de forma semicuantitativa la presencia de proteínas y la bioactividad frente al DPPH. Además, a lo largo de todos los ensayos efectuados, se evaluó la estabilidad de los extractos bajo determinados

periodos de tiempo luego de su preparación, hasta un máximo de un mes, tanto en aquellos conservados a 8°C como en aquellos reservados en -20°C.

En adición, con el objetivo de evaluar su potencial actividad hemaglutinante, fue realizado un ensayo piloto de aglutinación con estos extractos, los cuales fueron comparados con extractos preparados 12 horas antes del experimento, conforme a la metodología abajo descripta.

Finalmente, se continuó con los ensayos de hemaglutinación enfrentando los extractos con los eritrocitos seleccionados para tal fin. En esta instancia también se utilizaron los extractos obtenidos a partir de una purificación parcial, utilizando el método de extracción por solventes. El extracto obtenido por este método sólo fue probado con eritrocitos de roedor.

13.2.3.Determinación de la presencia de proteínas

Para la determinación de la presencia de proteínas en los extractos en estudio, se utilizó el kit de proteínas totales AA. La reacción colorimétrica se efectuó para cada uno de los extractos en estudio, en tubos cónicos y se utilizó un control blanco.

13.2.4.Determinación del perfil proteico general de los extractos. Geles de proteínas de poliacrilamida

La electroforesis se define como un método analítico-semipreparativo, por medio del cual se separan biomoléculas, de acuerdo a su carga y otros factores por la acción de un campo eléctrico. Desde el punto de vista analítico, la electroforesis presenta alta sensibilidad, poder de resolución, entre otros y hace posible la separación de proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas, a partir de mezclas.

Para la electroforesis en gel, es usado usualmente como soporte la poliacrilamida, debido a sus propiedades. [García Pérez, 2000]

Con la finalidad de caracterizar las proteínas presentes en los extractos de las distintas variedades y especies de *Amaranthus* seleccionadas, fue aplicada la técnica de electroforesis en

gel de proteína. Para realizar los geles se partió de 1.000 gramo de semillas trituradas, las cuales fueron dejadas en 1,000 mL de solución salina por 24 horas; luego fueron centrifugadas y del sobrenadante se tomaron 100,0 μ L, que fueron mezclados con 20,00 μ L de Buffer Laemmli 6x, después se realizó la migración en gel al 10 % por 4 hs a 100 V. Luego para la visualización de las proteínas se procedió a teñir el gel con Azul de Coomassie (colorante derivado del trifenilmetano).

13.2.5. Evaluación del poder antioxidante

De acuerdo a lo expresado por Kuskoski y otros [2005], la capacidad antioxidante de un extracto o de una mezcla no está dada sólo por la suma de la capacidad antioxidante de cada uno de sus componentes, sino que también está relacionado con el microambiente en el que se interactúan dichos compuestos. Las interacciones entre sí pueden generar efectos sinérgicos o inhibitorios.

En la práctica, existen diversos métodos para analizar la actividad antioxidante de extractos vegetales. Para el trabajo *in vitro*, suele utilizarse un método consistente en determinar el poder antioxidante del extracto en cuestión sobre sustancias “cromógenas de naturaleza radical”, produciéndose la pérdida de color de manera proporcional con la concentración. De todas maneras, la evaluación de la capacidad antioxidante que se realiza *in vitro* sólo nos brinda una idea aproximada de lo que ocurre *in vivo*, donde los eventos suelen ser más complejos. [Kuskoski y otros, p. 727, 2005]

En esta investigación se optó por emplear el método DPPH. Éste es un radical libre que se puede obtener si previa preparación.

En una etapa siguiente, se realizó la determinación del poder antioxidante con la única finalidad de explorar si el método de extracción con solución salina no alteraba esta propiedad biológica del mismo. Se procedió según el método de DPPH en placas de CCD, descripto por Blois, [1953].

13.2.6. Ensayos de aglutinación de eritrocitos

En una primera etapa de ensayos, se optó por enfrentar una suspensión de eritrocitos humanos de expresión antigénica desconocida a los fines del presente trabajo, es decir, se desconocían los fenotipos de antígenos de membrana relacionados a grupo sanguíneo expresados por dichas células. El objeto de esta primera instancia fue la detección de fitohemaglutininas en los extractos en estudio, pero no la selectividad de éstas en caso de manifestarse aglutinación.

Se realizó la colecta de sangre entera con anticoagulante EDTA y se dispuso a la preparación de suspensiones de eritrocitos al 3%, de acuerdo al método 1-6, propuesto en el Manual Técnico de la *American Association of Blood Banks* (AABB). Se suspendieron en NaCl al 0.9% (p/v), aproximadamente 10 volúmenes. Estos eritrocitos en suspensión se centrifugaron en las condiciones previamente descritas. El sobrenadante fue descartado y se repitió el lavado dos veces y los eritrocitos se suspendieron en NaCl, dil 4% v/v.

13.2.7. Determinación de la capacidad de aglutinación frente a eritrocitos de antígenos de membrana desconocidos

La evaluación fue realizada en placas de Petri para facilitar la lectura macroscópica en caso de existir aglutinación débil.

Se pipetearon ~50,00 µL de la suspensión de eritrocitos, a las cuales se agregaron ~50.00 µL del extracto vegetal, la solución resultante fue mezclada con varilla de vidrio y dejada en reposo a temperatura ambiente por un corto periodo de tiempo (60-120 segundos). Luego de transcurrido los dos minutos, se observó el grado de aglutinación macroscópicamente y se efectuó la interpretación de los resultados, los cuales se registraron de acuerdo al siguiente índice por cruces: (-): Aglutinación inexistente; (1+): aglutinación débil; (2+): aglutinación mediana; (3+): aglutinación fuerte; (4+): aglutinación completa.

13.2.8.Determinación de la capacidad de aglutinación de eritrocitos ABO RhD positivos

Para la determinación de la capacidad de aglutinación de eritrocitos ABO RhD positivos, se seleccionaron muestras de sangre entera, extraídas con anticoagulante EDTA y conservadas en tubos de Kahn a 8°C dentro de las 48 horas en que fueron tipificadas.

Cada una de las muestras fue previamente tipificada de acuerdo a la presencia o ausencia del antígeno de membrana ABO RhD correspondiente, con los reactivos de anticuerpos monoclonales correspondientes.

Los anticuerpos monoclonales son aquellos que se originan a partir de una única clona de célula B, es decir, específicos para un epítipo determinado.

Brevemente, el procedimiento para la producción de anticuerpos monoclonales consiste en la fusión de una célula B que sintetiza anticuerpo de manera normal, con una célula derivada de mieloma. El producto de esta fusión es una célula híbrida, o hibridoma, la cual mantiene la característica de crecimiento inmortal de la célula de mieloma y secreta el mismo anticuerpo producido por la célula B. Este tipo de anticuerpos es muy útil para uso reactivo. [Kindt, 2007]

13.2.9.Paneles reactivos para la identificación de anticuerpos irregulares

Con el fin de enriquecer la investigación y orientar los estudios hacia una posible aplicación en la clínica, se optó por efectuar ensayos consistentes en enfrentar los extractos vegetales en estudio, con viales comerciales para la detección de anticuerpos irregulares, entendiéndose el empleo análogo que se pretende dar, en este caso, a los anticuerpos y a las fitohemaglutininas en estudio. De esta manera, nos aproximamos a la exploración de la potencial especificidad que podrían representar estas moléculas frente a antígenos de membrana eritrocitaria. En la tabla [6] se indican los antígenos presentes (+) y ausentes (0) en cada uno de los viales utilizados. Cada uno de los siete extractos fue enfrentado con ambos viales.

V	Rh – Hr					MN				P	Lewis		Kell		Duffy		Kidd		
	Donor	D	C	c	E	e	M	n	S	s	P ₁	Le ^a	Le ^b	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b
I	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+
II	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0

Tabla [6]. Antígenos del panel.

13.2.10. Aislamiento de lectina por precipitación

Los extractos obtenidos son sometidos a tratamientos que separan las proteínas en diferentes fracciones, basados en algunas propiedades de la molécula, como tamaño, carga, entre otros. Este proceso se llama fraccionamiento.

Las primeras fases en este proceso suelen utilizar diferencias en la solubilidad de las proteínas.

Según Tejeda y otros [2011], existen múltiples factores que afectan esta solubilidad; como la temperatura, el pH, la fuerza iónica, la constante dieléctrica del medio, entre otros. Cada uno de estos factores puede ser usado para purificar los productos de precipitación, como pueden ser proteínas. La naturaleza anfotérica de las proteínas, es decir, que presentan regiones hidrofílicas e hidrofóbicas, provoca la generación complejas interacciones en un medio acuoso.

Las proteínas se precipitan a través de una técnica que permite el aumento de la fuerza iónica del medio, con la consecuente disminución de la solubilidad. Cantidades necesarias de una sal agregada a la solución de proteínas, causan la disminución de la interacción proteína-agua porque elimina la capa de solvatación, predominando la interacción proteína-proteína y generando la precipitación de las mismas. La concentración salina a la que se produce la precipitación no es igual para todas las proteínas, lo que permite usar esta propiedad para la separación y purificación de ciertas proteínas a partir de mezclas complejas. Comúnmente se utiliza sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para este fin, debido a su gran solubilidad y porque el ion sulfato divalente permite alcanzar altas fuerzas iónicas. La adición gradual de esta sal permite el

fraccionamiento de una mezcla de proteínas, las cuales son precipitadas pero no desnaturalizadas.

A los fines del presente trabajo, se efectuó una centrifugación diferencial y la siguiente precipitación salina con distintas concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de la fracción soluble.

A continuación se describen las diferentes etapas del método:

- 1 – Se colocó 1.000 gramo de semillas trituradas en un tubo cónico con etanol, por 24 horas y posteriormente refrigerado a 5°C.
- 2 – Luego se incorporó hexano con el fin de obtener dos fases y separar las sustancias indeseadas del extracto.
- 3 – Con posterioridad, el etanol fue separado en rotaevaporador.
- 4 – Se adicionó solución salina NaCl 0.9% (p/v).
- 5 – El homogeneizado se filtró y centrifugó a 10000 rpm, durante 20 minutos varias veces, hasta alcanzar un aspecto transparente.
- 6 – Se extravesó el sobrenadante resultante para proseguir con el proceso de precipitado.
- 7 – El precipitado se logró mezclando el sobrenadante con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y centrifugando la mezcla durante 10 minutos a 10000 rpm.
- 8 – El producto resultante se disolvió en tres volúmenes de solución salina NaCL 0.9% (p/v) y centrifugó durante 15 minutos a 3500 rpm. Este procedimiento se repitió con la finalidad de eliminar los restos de sulfato de amonio.
- 9 – El producto final se conservó en freezer a -20°C.

14.Resultados y discusiones

14.1.Muestras

En la figura [12], se pueden observar las semillas enteras y trituradas de uno de los genotipos de *Amaranthus*. El material triturado fue conservado en un tubo cónico, protegido de la humedad y de la luz durante el tiempo que duraron los ensayos.



Figura [12]. Semillas de *Amaranthus* y harina obtenida luego de la molienda.

14.2.Determinación de las proteínas totales en los extractos

Luego de la obtención de los extractos, cada una de las muestras fue evaluada en cuanto a la presencia de proteínas, conforme la metodología antes descripta. En la figura [13] se pueden observar las diferentes muestras y la presencia de coloración (azul). Esto indica la existencia de proteínas en los extractos, en relación al blanco usado como referencia.



A



B

Figura [13]. Determinación de proteínas de los diferentes extractos de *Amaranthus*.

14.3. Determinación del perfil proteico general de las semillas seleccionadas para el estudio

Las especies de amaranto estudiadas mostraron unos perfiles semejantes con presencia de un patrón de bandas comunes, aunque también se aprecian diferencias cualitativas y cuantitativas que podrían ser usadas para realizar el análisis taxonómico de estas plantas.

Como se observa en la figura [14], la banda de mayor peso hallada se estima en proteínas de un peso de ~20 kDa, el cual podría coincidir con el peso molecular correspondiente a lectina.

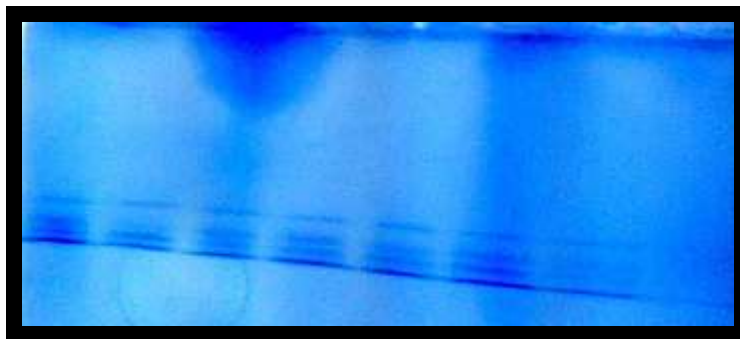


Figura [14]. Perfil proteico de las semillas provenientes de los diferentes genotipos de Amaranto.

14.4. Evaluación del poder antioxidante

En la figura [15], se observa el poder antioxidante de los diferentes extractos frente al radical DPPH, el resultado positivo se observa a simple vista debido a que se producen manchas claras sobre un fondo azulado. Para esto fueron aplicadas dos concentraciones distintas de los extractos y así se pudo corroborar de manera semicuantitativa el poder antioxidante de los mismos.



Figura [15]. Ensayo semicuantitativo de DPPH, en placa cromatográfica, de los diferentes extractos de Amaranto.

14.5. Ensayos de aglutinación de eritrocitos

Los resultados preliminares que se obtuvieron fueron satisfactorios, dado que la actividad aglutinante de los extractos obtenidos frente a eritrocitos de origen humano, de grupo sanguíneo desconocido, fue positiva, demostrando así la presencia de lectinas en los mismos. Por otro lado, los ensayos permitieron comprobar sistemáticamente, que las fitohemaglutininas presentan estabilidad de reacción, tanto a temperatura ambiente, como luego de ser conservadas a 8°C y -20°C, dentro de las 48 horas y hasta más de treinta días luego de la preparación de los extractos correspondientes. Figura [16].

Es importante destacar, que el control de extracto de semilla de soja preparado para tal fin, no mostró actividad hemaglutinante macroscópica frente a estos eritrocitos. Tomando como referencia los antecedentes de estudios efectuados en relación a estos extractos y su

comportamiento frente a eritrocitos ABO y antígenos relacionados, se decidió no continuar con el uso de los mismos en las etapas de ensayos siguientes.

La determinación de aglutinación y la consideración de su intensidad fueron determinadas luego de pasados 120 segundos de iniciada la reacción de hemaglutinación. En la tabla [7] se muestran los resultados de reacción del extracto de soja con una suspensión de eritrocitos de grupo sanguíneo desconocido. Estos resultados se ilustran también en la figura [16-8].

ERITROCITOS ANTÍGENOS DE MEMBRANA DESCONOCIDOS			
Extracto control	Aglutina	Tiempo	Intensidad
Glycine max (soja)	NO	120''	-

Tabla [7]. Resultados de reacción del extracto de soja con eritrocitos antígenos de membrana desconocidos.

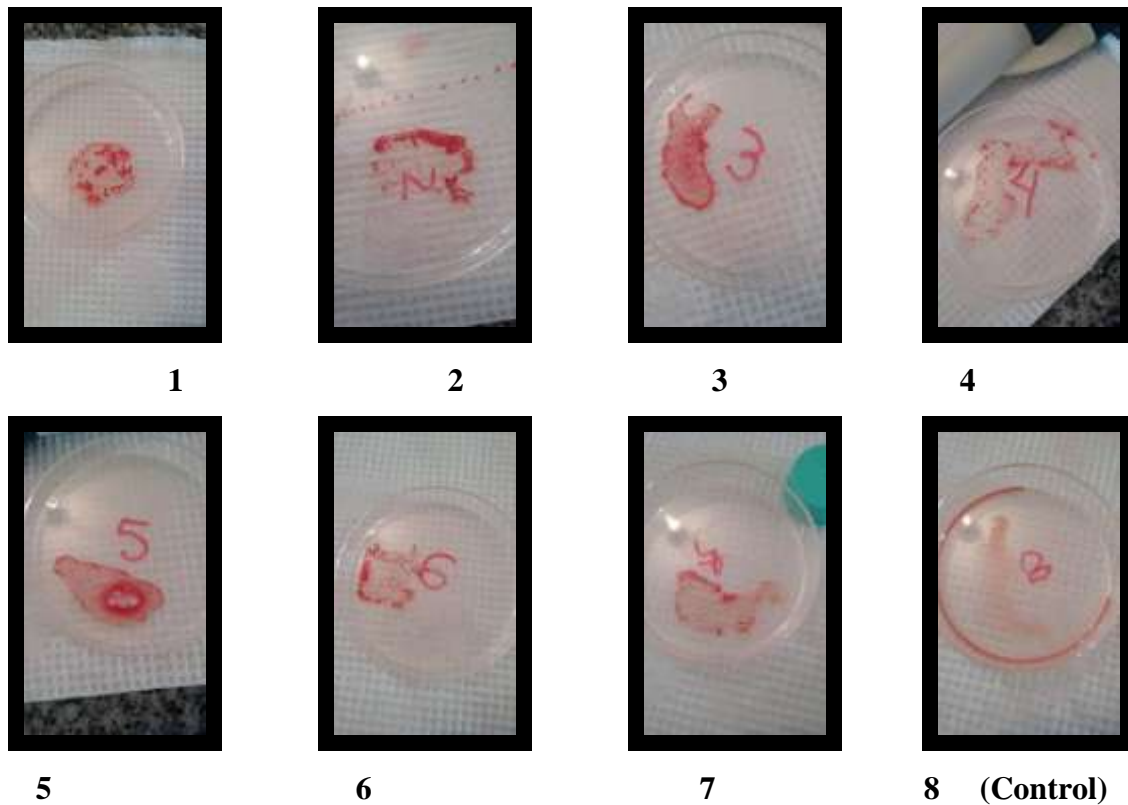


Figura [16]. Ensayos de aglutinación correspondiente a los 7 extractos de los genotipos de *Amaranthus*, respecto al control de Soja (N°8), que resultó negativo.

14.6. Ensayos de aglutinación de eritrocitos. Panel selector de anticuerpos

Luego de enfrentar cada uno de los extractos con los viales I y II del panel, se obtuvieron los siguientes resultados, detallados en la tabla [8]:

VIAL I			
Extracto	Aglutina	Tiempo	Intensidad a 120''
<i>Ex1</i>	SÍ	120''	3+
<i>Ex2</i>	SÍ	120''	2+
<i>Ex3</i>	SÍ	120''	3+
<i>Ex4</i>	SÍ	120''	3+
<i>Ex5</i>	SÍ	120''	2+
<i>Ex6</i>	SÍ	120''	2+
<i>Ex7</i>	SÍ	120''	2+
VIAL II			
Extracto	Aglutina	Tiempo	Intensidad
<i>Ex1</i>	SÍ	120''	2+
<i>Ex2</i>	SÍ	120''	2+
<i>Ex3</i>	SÍ	120''	2+
<i>Ex4</i>	SÍ	120''	2+
<i>Ex5</i>	SÍ	120''	2+
<i>Ex6</i>	SÍ	120''	2+
<i>Ex7</i>	SÍ	120''	1+

Tabla [8]. Resultados de reacción de los extractos de *Amaranthus* con los viales.

14.7. Determinación de la capacidad de aglutinación de eritrocitos ABO RhD positivos, eritrocitos caninos y eritrocitos de roedor

Después de enfrentar cada uno de los extractos con las muestras de eritrocitos A, B, O, D; eritrocitos caninos y eritrocitos de roedor, se obtuvieron los siguientes resultados, detallados en la tabla [9], donde se detalla: la presencia o ausencia de aglutinación; en caso afirmativo, el tiempo de corte de la misma y su intensidad en ese tiempo, medida en cruces.

ERITROCITOS A			
Extracto	Agglutina	Tiempo	Intensidad
Ex1	SÍ	120''	3+
Ex2	SÍ	120''	3+
Ex3	SÍ	120''	2+
Ex4	SÍ	120''	3+
Ex5	SÍ	120''	4+
Ex6	SÍ	120''	4+
Ex7	SÍ	120''	2+
ERITROCITOS B			
Extracto	Agglutina	Tiempo	Intensidad
Ex1	SÍ	120'	4+
Ex2	SÍ	120'	4+
Ex3	SÍ	120'	3+
Ex4	SÍ	120'	3+
Ex5	SÍ	120'	4+
Ex6	SÍ	120'	4+
Ex7	SÍ	120'	2+
Extracto	Agglutina	Tiempo	Intensidad

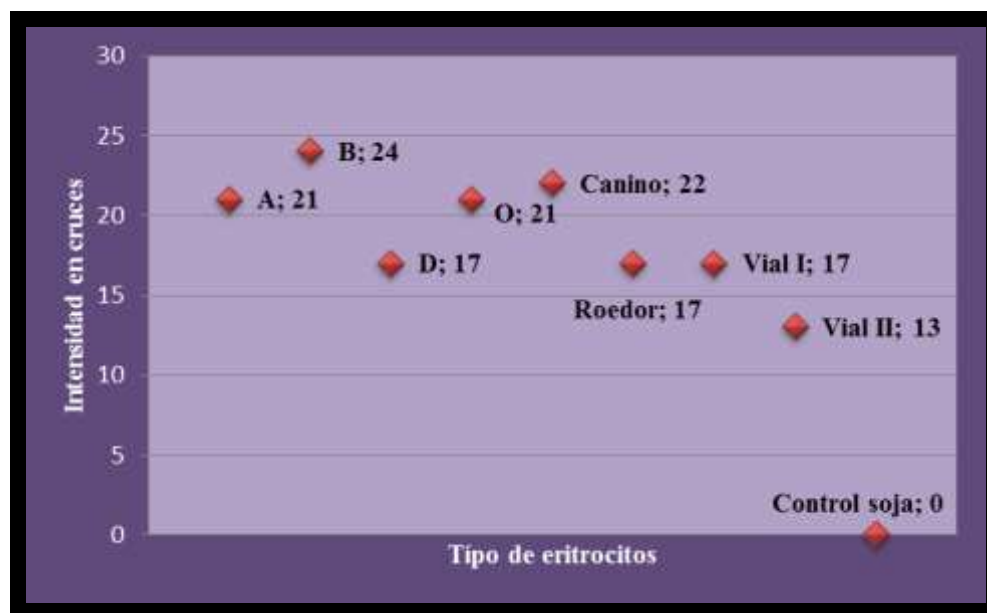
ERITROCITOS O			
Extracto	Aglutina	Tiempo	Intensidad
Ex1	SÍ	120''	4+
Ex2	SÍ	120''	3+
Ex3	SÍ	120''	3+
Ex4	SÍ	120''	3+
Ex5	SÍ	120''	2+
Ex6	SÍ	120''	4+
Ex7	SÍ	120''	2+
D			
Extracto	Aglutina	Tiempo	Intensidad
Ex1	SÍ	120''	3+
Ex2	SÍ	120''	2+
Ex3	SÍ	120''	3+
Ex4	SÍ	120''	2+
Ex5	SÍ	120''	2+
Ex6	SÍ	120''	3+
Ex7	SÍ	120''	2+
CANINO			
Extracto	Aglutina	Tiempo	Intensidad
Ex1	SÍ	120''	4+
Ex2	SÍ	120''	3+
Ex3	SÍ	120''	3+
Ex4	SÍ	120''	4+
Ex5	SÍ	120''	2+
Ex6	SÍ	120''	3+
Ex7	SÍ	120''	3+

ROEDOR			
Extracto	Aglutina	Tiempo	Intensidad
Ex1	SÍ	120''	3+
Ex2	SÍ	120''	3+
Ex3	SÍ	120''	2+
Ex4	SÍ	120''	3+
Ex5	SÍ	120''	2+
Ex6	SÍ	120''	2+
Ex7	SÍ	120''	2+

Tabla [9]. Resultados de reacción de los extractos de *Amaranthus* con eritrocitos de tipo A, B, O, D y de canino y roedor.

Además de ser enfrentados a cada uno de los extractos obtenidos por el método de extracción de lectinas con solución salina, los eritrocitos de roedor se enfrentaron al producto obtenido por precipitación, manifestándose también en ese caso reacción de hemaglutinación.

La siguiente gráfica de dispersión representa los datos detallados en las tablas [7], [8] y [9]. La misma resulta de la sumatoria de cruces efectuada para cada tipo de eritrocito empleado en los ensayos.



Grafica [1]. Intensidad de aglutinación según tipo de extracto.

14.9. Discusiones sobre este trabajo

El objetivo general de esta investigación, fue detectar la presencia de fitohemaglutininas en extractos de semillas de siete genotipos del género *Amaranthus* que provengan de cultivares de la Región Semiárida Pampeana y evaluar la posible selectividad que éstos muestren específicamente hacia sustancias con capacidad antigénica presentes en la superficie de los eritrocitos; es decir, encontrar fitohemaglutininas con función de lectina.

En una instancia primaria, en cada uno de los extractos en estudio fue analizada la presencia de proteínas, con el único fin de verificar si el método de extracción salina resultaba adecuado a los fines de este estudio. Además, se realizó un perfil proteico preliminar, para detectar la existencia de fitohemaglutininas en los extractos.

La evaluación del poder antioxidante tuvo como objetivo principal enriquecer los datos relativos a la química de los extractos, visualizándolos como potenciales reactivos de tipificación sanguínea. En general, los extractos se presentaron estables a lo largo de un periodo de al menos treinta días desde su producción, conservados tanto a 8°C como a -20°C y

efectuando las reacciones a temperatura ambiente. Sería interesante profundizar en este tipo de estudios fitoquímicos y de estabilidad.

Finalmente, para la exploración de la existencia y actividad de lectinas en los extractos, se optó por hacer uso de la técnica de hemaglutinación que, como se mencionó en el presente trabajo, es la reacción que deja manifiesta las interacciones entre las lectinas existentes en los extractos y los glicanos expresados en las superficies celulares.

Investigaciones preliminares basadas en la búsqueda de lectinas de origen vegetal en diversos extractos, ya han reportado la existencia de lectinas en algunas especies de Amarantho, que se observaron manifiestas en reacciones de hemaglutinación, como es el caso del *Amaranthus hypochondriacus*, especie de la cual se preparan reactivos de tipificación, como se mencionó en los antecedentes; aunque no se reportaron pesquisas en lo que concierne a la exploración de estas moléculas en semillas de cultivares controlados en esta región del centro argentino, ni en lo que refiere, particularmente, a una de las especies analizadas en esta investigación: *Amaranthus pumilus*. Resulta interesante identificar la zona geográfica donde se cultivaron los diferentes genotipos, porque, como se indicó, las condiciones de cultivo pueden condicionar la composición de factores antinutricionales en las semillas; además de la posibilidad de producir ejemplares en el territorio de la Pampa Húmeda.

Muchos de los estudios que anteceden al presente, han tenido como objetivo principal la detección y posterior análisis estructural de lectinas, fundamentalmente orientados a estudios de estructura proteica o de interacciones lectina-carbohidrato. Si bien los datos recabados en esos análisis son necesarios para profundizar, por consiguiente, en las propiedades funcionales y alcances biomédicos futuros de estas moléculas, a los fines prácticos, el presente trabajo buscó dar una aproximación a la posibilidad de hacer extensivo el uso de estos extractos ricos en lectinas en el banco de sangre, empleando métodos de extracción sencillos y económicos.

Es interesante mencionar que, aunque las intensidades de aglutinación fueron, en términos generales, intensas (3+ a 4+), hubo marcadas diferencias entre los tres tipos de eritrocitos seleccionados, siendo particularmente débiles las aglutinaciones correspondientes a los viales. Tanto los extractos obtenidos a partir del método por extracción salina, como aquellos obtenidos por precipitación con solventes, demostraron ser positivos a los ensayos, lo que sugiere que el primero resulta un buen método para extracción de lectinas. Los resultados a los

que se arribó hasta aquí permiten predecir comportamientos selectivos con consecuente especificidad de grupo por parte de lectina de los géneros de *Amaranthus* seleccionados.

Sería de gran importancia proseguir con los ensayos de hemaglutinación, usando la mayor cantidad posible de muestras y cruzando los resultados obtenidos en cuanto a las presencia o ausencia de aglutinación e intensidad de ésta, debido a que el uso de suspensiones de eritrocitos en los ensayos realizados fue limitado. También sería menester proseguir con ensayos más complejos, como por ejemplo, provocar la inhibición de la aglutinación con glúcidos seleccionados o estudios de estructura proteica de lectinas. En el primero de los casos, la resultante es que se puede determinar hacia qué glúcido presenta afinidad la lectina, lo cual es fundamental si los análisis están orientados en la búsqueda de especificidad hacia grupos sanguíneos.

15. Conclusión

Los ensayos efectuados, demostraron que al enfrentar los extractos en estudio con los eritrocitos seleccionados, se produce la aglutinación de éstos, quedando así manifiesta la capacidad aglutinante de los extractos y por lo tanto, la presencia de lectinas en ellos. Así mismo, no se demostró la ausencia de aglutinación en ningún caso, pero dado que la reacción no presentó uniformidad en cuanto a: especie del extracto, tipo de eritrocito seleccionado, a la intensidad y al tiempo de reacción, se sugiere la existencia de selectividad, y por tanto especificidad de lectina, hacia ligandos que podrían estar relacionados a antígenos de membrana de grupo sanguíneo.

16. Bibliografía de consulta

- Clerici, C. (2016). *Lectura y escritura de textos académicos y científicos: pautas de escritura para principiantes*. Gualeguaychú: Editorial UCU.
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., Baptista Lucio, P. (2010). *Metodología de la investigación*. México: Editorial Mc Graw Hill.
- Nagado, C. (2007). *Estudios estructurales de lectinas de algas marinas y de vegetales superiores*. Universitat de Valencia, Instituto de biomedicina de Valencia, Valencia.
- Troiani, R., Sánchez, T., Reinaudi, N. y Ferramola, L. (2004). Optimal sowing dates of three species of grain – bearing amaranth in the semi – arid Argentine Pampa. *Spanish journal of agricultural research*. 2 (3), 385-391. Recuperado de [http://www.inia.es/gcontrec/pub/385-391-\(8303\)-Optimal_1161693825250.pdf](http://www.inia.es/gcontrec/pub/385-391-(8303)-Optimal_1161693825250.pdf)
- Martín de Troiani, R., Sánchez, T., Antón de Ferramola, L. (2005). Incidencia de la fertilización en Amarantho. Zona semiárida pampeana [Argentina]. *Revista FCA UNCuyo*. Tomo XXXVII. Nº 2. 65-71. Recuperado de http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitaes/784/troianiAgrarias2-05.pdf
- Fang, E. F., Lin, P., Wong, J. H., Tsao, S. W., Ng, T. B. (2010). A lectin with anti – HIV – 1 reverse transcriptase, antitumor, and nitric oxide inducing activities from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. extralong autumnpurple bean. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58 (4): 2221-9. doi: 10.1021/jf903964u.
- Cordeiro, A. (2014). *Avaliação do potencial inseticida de lectinas de sementes de Moringa oleifera contra larvas de Aedes aegypti resistentes e susceptíveis a organofosfato e adultos de Sitophilus zeamais*. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Recife, Brasil.
- Kheeree, N., Sangvanich, P., Puthong, S., Karnchanatat, A. (2010). Antifungal and antiproliferative activities of lectin from the rhizomes of *Curcuma amarissima* Roscoe.

Applied Biochemistry and Biotechnology. 162 (3): 912 – 25. doi: 10.1007/s12010-009-8804-8.

Lam, S. K., Ng, T. B. (2010). Lectins: productions and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89(1): 45-55. doi: 10.1007/s00253-010-2892-9.

Swanson, M. D., Winter, H. C., Goldstein, I. J., Markovitz, D. M. (2010). A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. *Journal of Biological Chemistry*. 285(12): 8646-8655. doi: 10.1074/jbc.M109.034926.

Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. (2004). Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*. 44 (4): 385-403. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.05.005.

17. Referencias bibliográficas

[AABB, 2012] American Association of Blood Banks. (2012). *Manual Técnico*. (17ª ed.). Maryland, USA: AABB.

[Abbas, 2012] Abbas, A. Lichtman, A. y Pillai, S. (2012). *Inmunología celular y molecular*. (7ª ed.). Barcelona, España: ELSEVIER.

[Balaguera Gualteros y otros, 2012] Balaguera Gualteros, A., García Rosasco, M., Valverde, J. (2012). Lectina de *Arachis hypogaea* para estudiar la activación de criptoantígenos eritrocitarios por enzimas bacterianas. *Revista Argentina de Transfusión*. Vol. XXXVIII (3): 211-214.

[Bucher y Weakley, 1990] Bucher, M., Weakley, A. (1990). *Status survey of seabeach amaranth (Amaranthus pumilus Rafinesque) in North and South Carolina*. Report to North Carolina Plant Conservation Program, North Carolina Dept. of Agriculture, Raleigh, NC, and Asheville Field Office, U. S. Fish and Wildlife Service, Asheville, NC. 148 pp.

[Calderón de la Barca y otros, 1987] Calderón de la Barca, A. M., Vázquez-Moreno, L. (1987). *Amaranthus cruentus* lectin: purification, stability, and some biochemical properties. *Journal of Food Biochemistry*. 12: 117-126.

- [Carpio, 2016] Carpio, J. E. (2016). *Aislamiento y caracterización bioquímica de proteínas citotóxicas (lectinas) de semillas de Lupinus mutabilis sweet "tarwi"*. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela profesional y Académica de Biología, Arequipa, Perú.
- [Carrero Berzal, 2010] Carrero Berzal, P. (2010). *Polifenoles como miméticos de lectinas: una nueva aproximación en la terapia del sida*. Universidad de Alcalá, Facultad de Farmacia, Alcalá, España.
- [Castel, 2010] Castel, M. V. (2010). *Estudio de las propiedades funcionales, tecnológicas y fisiológicas de las proteínas de amaranto*. Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química, Santa Fe, Argentina.
- [Elizalde y otros, 2009] Elizalde, A., Porrilla, Y. P., Chaparro, D. C. (2009). *Factores antinutricionales en semillas*. Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Colombia.
- [Gallego del Sol y otros, 2006] Gallego del Sol, F., Nagano, C. S., Cavada, B. S., Sampaio, A. H., Sanz, L., Calvete, J. J. (2006). Lectinas. *Investigación y Ciencia*. 361 (10): 58-67. Recuperado de <https://www.investigacionyciencia.es/files/5379.pdf>
- [Gallego Rubio, 2014] Gallego Rubio, M. (2014). *Lectinas inactivadoras de ribosomas: aplicaciones y usos más importantes*. Universidad de Valladolid, Facultad de Medicina, Valladolid, España.
- [García Arbeláez, 2009] García Arbeláez, C. A. (2009). Fundamentos de genética e inmunología para bancos de sangre y medicina transfusional. *Medicina y laboratorio*. 15: 37-68.
- [García Pérez, 2000] García Pérez, H. M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAG*. 1 (2):31-41.
- [Greizerstein, 1995] Greizerstein, E. J. (1995). *Estudios citogenéticos y de electroforesis de proteínas seminales en el género Amaranthus (Amaranthaceae)*. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Argentina.
- [Hernández Cruz y otros, 2005] Hernández Cruz, P., Pérez Campos, E., Martínez Martínez, L., Ortiz, B., Martínez, G. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Revista de Educación Bioquímica*. 24 (1): 21-27.

- [Kindt, 2007] Kindt, T. J., Goldsby, R. A. y Osborne, B. A. (2007). *Inmunología de Kuby*. 6^a ed. México: Mc Graw Hill.
- [Kuskoski y otros, 2005] Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 25 (4): 726-732. Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n4/27642.pdf>
- [Lebensohn y otro, 2012] Lebensohn, N., Cotorruelo, C., García Borrás, A., Biondi, C. (2012). *Aplicación de lectinas vegetales como reactivos inmunohematológicos*. Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Rosario, Argentina.
- [López Mejía y otros, 2014] López-Mejía, O. A., López Malo, A., Palou, E. (2014). Capacidad antioxidante de subproductos de semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 64 (1): 50-58.
- [Mengoni y otros, 2016] Mengoni, A., Quiroga, A., Añón, M. (2016). Purificación y caracterización de una lectina de *Amaranthus hypochondriacus*, un compuesto antiproliferativo. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*. (11): 27-35.
- [Micucci y otros, 1987] Micucci, H. A., Camps, E. (1987). Lectinas: obtención, estructura química, propiedades y aplicaciones diagnósticas y farmacológicas. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 6 (1): 35-54.
- [Navarro y otros, 1978] Navarro, Y., Pérez, G. (1978). Detección y Caracterización preliminar de lectinas presentes en semillas de leguminosas. *Revista Colombiana de Química*. Vol. 8.
- [Piñuel y otros, 2014] Piñuel, L., Zubillaga, F., Repupilli, J., Barrio, D. (2014). La fertilización nitrogenada de *Amaranthus cruentus* L. induce la expresión de proteínas antinutricionales. Ponencia presentada en el *III Workshop Internacional de Ecofisiología de Cultivos*, Viedma, Río Negro, Argentina.
- [Reinaudi y otros, 2009] Reinaudi, N., B., Repollo, R., Janovská, D., Délamo Frier, J., Martín de Troiani, R. (2009). Evaluación de genotipos de amaranto (*Amaranthus spp.*) para la adaptabilidad productiva en el área de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa, Argentina. *Revista Científica UDO Agrícola*. 11 (1): 50-57.

- [Rincón Alonso, 2014] Rincón Alonso, M. *Lectinas de leguminosas: significación nutricional, toxicidad y aplicaciones*. (2014). Universidad de Valladolid, Facultad de Medicina, Valladolid, España.
- [Rodríguez y otros, 2004] Rodríguez, M. V., Riquelme, B., Valverde, J., Gattuso, S. (2004). Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las fabáceas sobre los eritrocitos humanos mediante el análisis de imágenes. *ANALES AFA*. 16 (1): 247-248.
- [Salgado Telpalo, 2006] Salgado Telpalo, J. D. (2006). *Purificación y caracterización bioquímica y fisicoquímica de lectinas de frijol y amaranto cultivados en el estado de Hidalgo*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Pachuca, Hidalgo.
- [SINAVIMO, 2014] Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. (2014). *Cultivo de Glycine max*. Buenos Aires, Argentina.
- [Sánchez, C.E. 2013]. Sánchez, C. E. (2013). *Recopilación y análisis de la información existente de las especies del género Amaranthus cultivadas y de sus posibles parientes silvestres en México*. Jardín Botánico. Instituto De Biología UNAM.
- [Tejeda y otros, 2011] Tejeda, A., Montesinos, R. M., Guzmán, R. (2011). *Bioseparaciones*. (2^a ed.). México: Pearson.
- [Valla, 1979] Valla, J. J. (1979). *Botánica. Morfología de las plantas superiores*. Buenos aires: Editorial Hemisferio Sur.
- [Van Driessche y otros, 2000] Van Driessche, E., De Cupere, F., Cruz, E., Machado, J., Beeckmans, S. (2000). Lectinas de origen vegetal: definiciones, métodos de purificación y aplicaciones. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 19 (2): 54-147.
- [Varki y otros, 2009] Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W. and Etzler, M. E. (2009). *Essentials of Glycobiology*. (2nd Ed.). Cold Spring Harbor, New York, USA.