

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA LECNITA
DE FRIJOL TÉPARI (*Phaseolus acutifolius*) CON ACTIVIDAD
CITOTÓXICA SOBRE CÉLULAS CANCERÍGENAS**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN NUTRICIÓN HUMANA

PRESENTA:

IOVANNA CONSUELO TORRES ARTEAGA

DIRIGIDA POR:

**DR. ALEJANDRO BLANCO LABRA
DRA. TERESA GARCÍA GASCA**

C.U. QUERÉTARO, QRO., JUNIO, 2010

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

 **Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.

 **NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).

 **SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN HUMANA

**Purificación y caracterización parcial de una lectina de
frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) con actividad
citotóxica sobre células cancerígenas**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN HUMANA**

Presenta

Iovanna Consuelo Torres Arteaga

Dirigido por

Dr. Alejandro Blanco Labra y Dra. Teresa García Gasca

SINODALES

Dr. Alejandro Blanco Labra
Presidente

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Secretario

Dr. Cesar Leobardo Aguirre Mancilla
Sinodal

Dra. María Guadalupe Flavia Loarca Piña
Sinodal

M.C. Adriana Jheny Rodríguez Méndez
Sinodal,

Biólogo Jaimé Ángeles Angeles
~~Director de la Facultad de~~
Ciencias Naturales

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, México
Junio, 2010

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO
DE MECANISMOS DE DEFENSA DE PLANTAS DE LA UNIDAD
DE BIOQUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS DEL
CINVESTAV IRAPUATO A CARGO DEL DR. ALEJANDRO
BLANCO LABRA Y EN EL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE LA
UNIVERSIDAD DE CALIFORNIA EN DAVIS, CA, EU EN
COLABORACIÓN CON EL DR. CARLITO LEBRILLA.**

RESUMEN

Las lectinas de leguminosas son glicoproteínas dependientes de cationes cuya forma activa comúnmente es tetramérica. Son biológicamente activas en animales y presentan actividades anticancerígenas. En nuestro laboratorio se han observado que una fracción semipura de lectinas de frijol Tépari (FCL) presenta efecto citotóxico diferencial sobre células de diferentes tipos de cáncer humano. Sin embargo, los pocos datos respecto a la identidad molecular de las proteínas con actividad biológica y sus características bioquímicas son controversiales. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue purificar y caracterizar parcialmente al menos una lectina bioactiva de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*). Se probaron diferentes estrategias de extracción y purificación y se lograron obtener resultados reproducibles utilizando como solvente de extracción Tris-HCl pH 8 a 4° C, precipitación secuencial con sulfato de amonio al 40 y 60% de saturación y cromatografía en columna de exclusión de peso molecular con Sephadex G-75. Mediante este método se lograron separar dos poblaciones de proteínas con actividad aglutinante, PA (Peso molecular aparente de 29.8 kDa, *pI* 4.6 y actividad específica de 12339 UA/mg proteína) y PB (Peso molecular aparente de 26.1 kDa, *pI* 4.72 y actividad específica de 8226 UA/mg proteína). Posteriormente se obtuvo un pico mayoritario de proteína de cada población mediante una columna de Superosa 12HR10/30 para FPLC acoplada a HPLC. Los picos mayoritarios fueron analizados por espectrometría de masas para proteínas y carbohidratos. Los resultados mostraron al menos dos proteínas con alta homología a la única secuencia deducida para una lectina de frijol Tépari, pero con ligeras diferencias entre ellas mismas. El espectro de carbohidratos mostró que ambas proteínas presentan el mismo tipo y cantidad de carbohidratos. El pH óptimo para la recuperación de la actividad aglutinante de PA fue de 4 a 5 y para PB fue de 6, pero ambas poblaciones mostraron el mismo perfil de estabilidad a pH. Asimismo, se observó que PA depende principalmente de calcio para mantener su actividad aglutinante mientras que PB de magnesio. En resumen, fue posible purificar y caracterizar parcialmente dos lectinas bioactivas presentes en frijol Tépari. Futuros estudios se enfocarán en el mayor conocimiento de su identidad molecular.

Palabras clave: Frijol Tépari, lectinas, *Phaseolus acutifolius*, purificación de proteínas.

ABSTRACT

Legume lectins are cation dependent glycoproteins whose bioactive form is commonly tetrameric. They are biologically active in animals and exhibit anticancer activities. In our laboratory, we have observed that a semipure fraction from Tepary bean lectin (FCL) has differential cytotoxic effects on different types of cancer human cells. However, the few available data regarding the molecular identity of proteins with biological activity and its biochemical characteristics are controversial. Therefore, the objective of this study was to purify and partially characterize at least one bioactive lectin extracted from Tepary bean seeds. Different strategies of extraction and purification were tested with best results when using Tris-HCl pH 8-4 ° C as the extraction solvent, followed by sequential precipitation with ammonium sulfate to 40 and 60% saturation and molecular weight exclusion column chromatography with Sephadex G-75. This method rendered two separated proteins bands with agglutination activity; PA (apparent molecular weight of 29.8 kDa, *pI* 4.6 and specific activity of 12 339 AU/mg protein) and PB (apparent molecular weight of 26.1 kDa, *pI* 4.72 and specific activity of 8226 AU/mg protein). Later on one major peak was obtained from each one, using molecular weight exclusion Superose 12HR10/30 column for FPLC coupled to HPLC. The major peaks were analyzed by mass spectrometry for protein and carbohydrates. The results showed at least two proteins with high homology to the unique deduced sequence for one Tepary bean lectin but with slight differences between them. The spectrum of carbohydrates composition showed that both proteins exhibit the same type and quantity of carbohydrates. The optimum pH for agglutination recovery of PA was 4-5 and 6 for PB, showing the same pH stability profile. It was also noted that PA depends mostly on calcium to maintain its activity while PB required magnesium. In summary, it was possible to purify and characterize two different bioactive lectins present in Tepary bean. Future studies will focus further on the determination of their molecular identity.

Key words: Lectins, tepary beans, *Phaseolus acutifolius*, protein purification.

AGRADECIMIENTOS

A Josefina por el amor y apoyo que me ha brindado en la realización de mis proyectos.

A Luz por su apoyo y esfuerzo en cada momento desde que inicie con este proyecto.

A mi familia porque cada uno colaboró con este logro.

Al Dr. Alejandro Blanco Labra por darme de nuevo la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su sincera amistad y por alentarme a tomar decisiones importantes en este proyecto de vida.

A la Dra. Teresa García Gasca por darme la valiosa oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por hacer de esta experiencia muy gratificante, por escucharme cuando lo necesite y sobre todo por confiar en mi trabajo.

Al Dr. Jorge Torres por el apoyo incondicional en este proyecto, por sus atinados comentarios y por brindarme su amistad.

Al Dr. Carlito Lebrilla por las facilidades otorgadas en su laboratorio durante mi estancia en UCDavis.

A la Dra. Mariana Barbosa por la colaboración en este proyecto, por el apoyo técnico durante mi estancia en UCDavis.

A mis compañeros de laboratorio Alondra, Elizabeth, José Luis, Saraí, Anabella, Karla, María de Jesús y Teresa, por los momentos compartidos, por las alegrías vividas y por sus comentarios.

A las Químicas Yolanda Rodríguez y Cristina Elizarraraz del departamento de cromatografía por las facilidades otorgadas.

A la QFB. Alicia Chagoya responsable del área de espectrometría de masas por el apoyo técnico.

Al Dr. Jorge Ibarra Rendón y la M.C. Regina Basurto por las facilidades otorgadas en su laboratorio.

A los miembros de mi comisión revisora al Dr. Cesar Aguirre, Dra. Flavia Loarca y Dra. Adriana Jheny Rodríguez por sus valiosas observaciones y comentarios.

A mis profesores de la maestría por colaborar en mi formación académica.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N (CINVESTAV) Unidad Irapuato por las facilidades prestadas para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco el apoyo financiero de PROMEP/103.5/04/2830 y FOMIX QRO-2007-C01-78221

DEDICATORIAS

A Leonardo, un ser increíble que me transformo la vida y que me impulsa cada día a seguir creciendo y nunca dejar de aprender.

A Rogelio fuente de inspiración y motivación en todos mis proyectos.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	3
2.1.	Frijol Tépari (<i>Phaseolus Acutifolius</i>)	3
2.1.1	Descripción Botánica	3
2.1.2	Valor nutricional del frijol Tépari	4
2.2.	Lectinas	5
2.2.1	Definición	5
2.2.2	Lectinas vegetales	7
2.2.3	Lectinas de leguminosas	12
2.2.4	Lectinas y cáncer	18
2.3	Lectinas de frijol Tépari	21
III.	JUSTIFICACIÓN	25
IV.	HIPÓTESIS	26
V.	OBJETIVOS	26
5.1	Objetivo general	26
5.2	Objetivos específicos	26
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1	Material biológico	27
6.2	Reactivos	27
6.3	Métodos	27
6.3.1	Obtención de FCL	27
6.3.2	Cuantificación de proteína	28
6.3.3	Determinación de actividad aglutinante	29
6.3.4	Perfil electroforético monodimensional	30
6.3.5	Perfil electroforético bidimensional y determinación del punto isoeléctrico	30
6.3.6	Identificación de glicoproteínas	30
6.3.7	Cromatografía de FPLC	31
6.3.8	Cromatografía de afinidad	31
6.3.9	Identificación de la(s) lectina(s) por espectrometría de	32

	masas	
6.3.10	Secuenciación de péptidos	33
6.3.11	Identificación de los carbohidratos	34
6.3.12	Efecto de los cationes metálicos	34
6.3.13	Estabilidad de pH y pH óptimo	34
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
7.1	Optimización de la obtención del extracto crudo	36
7.2	Precipitación secuencial con sulfato de amonio	36
7.3	Cromatografía de afinidad	39
7.4	Cromatografía de exclusión de peso molecular Sephadex G75	39
7.5	Perfil electroforético monodimensional	42
7.6	Perfiles electroforéticos bidimensionales	42
7.7	Identificación de la lectina por masas	45
7.8	Cromatografía por HPLC	45
7.9	Perfil electroforético bidimensional de las fracciones obtenidas por HPLC	48
7.10	Secuenciación de péptidos	48
7.11	Identificación de carbohidratos totales	51
7.12	Efecto de los cationes metálicos en I actividad biológica de la lectinas	56
7.13	Determinación de la estabilidad al pH	56
7.14	Determinación del pH óptimo	59
VIII.	CONCLUSIONES	62
IX.	PERSPECTIVAS	62
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Planta de frijol Tépari	4
Figura 2	Aglutinación de células sobre glóbulos rojos	6
Figura 3	Representación esquemática de las estructuras tridimensionales en lectinas vegetales.	11
Figura 4	Estructura de la Concanavalina A.	12
Figura 5	Optimización de la obtención del extracto crudo.	37
Figura 6	Precipitación secuencial con sulfato de amonio.	38
Figura 7	Cromatografía de Afinidad Fétuina-Agarosa.	40
Figura 8	Cromatograma de filtración en gel.	41
Figura 9	Perfil electroforético SDS PAGE.	43
Figura 10	Perfil electroforético bidimensional de PA y PB	44
Figura 11	Cromatograma de HPLC para PA y PB	47
Figura 12	Perfil electroforético bidimensional de los picos mayoritarios de PA y PB obtenidos por FPLC-HPLC.	49
Figura 13	Comparación de los péptidos obtenidos de PA y PB con la secuencia de la lectina de Tépari deducida	50
Figura 14	Comparación de las secuencias de los péptidos de PA y PB con la secuencia de péptidos de la fitohemaglutinina de <i>Phaseolus Vulgaris</i> .	52
Figura 15	Identificación de los carbohidratos presentes en PA y PB	53
Figura 16	Identificación de los carbohidratos presentes en PA y PB .	54
Figura 17	Identificación de los carbohidratos presentes en PA y PB	55
Figura 18	Efecto de los cationes metálicos sobre la actividad aglutinante de PA y PB.	57
Figura 19	Estabilidad a pH para PA y PB.	58
Figura 20	Determinación del pH óptimo de las lectinas contenidas en P A y PB.	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Lectinas vegetales utilizadas para el estudio de glicoproteínas y su clasificación según su especificidad hacia monosacáridos.	8
Tabla 2	Mecanismos de acción de las lectinas de plantas en diferentes células malignas <i>in vivo</i> .	19
Tabla 3	Mecanismos de acción de las lectinas de plantas en diferentes células malignas <i>in vitro</i> .	20
Tabla 4	Comparación de los pesos moleculares y puntos isoeléctricos detectados en cada pico.	42
Tabla 5	Homologías encontradas para PA y PB en banco de datos a partir del análisis de espectroscopía de masas.	46

INTRODUCCIÓN

Las lectinas son un grupo de proteínas ó glicoproteínas de origen no inmune que comparten la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a los carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas. Como característica particular tienden a aglutinar a las células a las cuales se unen y se consideran armas valiosas en el campo de la genética, la biomedicina y la inmunología (Castillo-Villanueva y Adbullaev, 2005).

Las lectinas de las plantas representan parte importante de glicoproteínas biológicamente activas y poseen actividades quimiopreventivas contra el cáncer observadas en estudios *in vitro*, *in vivo* y pruebas clínicas (González de Mejía y Prisecaru, 2005). Estas moléculas han sido utilizadas para la detección de transformaciones malignas de células valiéndose del reconocimiento y la aglutinación preferencial que presentan sobre células transformadas. Se han realizado diversas investigaciones para utilizar las lectinas y polímeros sintéticos enlazados a ellas como agentes anticancerígenos *in vivo* e *in vitro* y se ha visto que inhiben el crecimiento de las células tumorales, con potencial para ser utilizadas como medicamentos para prevenir metástasis (Hernández y col., 1999).

En estudios recientes realizados en nuestro laboratorio se demostró que una fracción semipura de lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) fue capaz de reconocer a células de cáncer de colon humano CaCo-2 provocando su muerte e inhibiendo la proliferación en función de la concentración. Este efecto fue diferencial ya que se determinó menor sensibilidad para su contraparte normal, células IEC-18, las cuales requirieron del triple de concentración para provocar el mismo efecto (López, 2007). Así mismo, la misma lectina tuvo efecto sobre la proliferación y sobrevivencia de células cancerígenas de mama y cervix (Yllescas, 2006; Castañeda, 2007; Castañeda-Cuevas y col., 2007).

Reynoso-Camacho y colaboradores (2003) determinaron la dosis letal media y la toxicidad aguda de una fracción de lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*, G-400-34) en ratones CD-1 por vía intraperitoneal. En otro estudio se evalúo la toxicidad aguda y subcrónica por vía oral de la una fracción concentrada en lectina de frijol Tépari. Se observaron signos clásicos de toxicidad por lectinas en las dosis más altas (300 y 2000 mg/kg de peso corporal) siendo estos efectos reversibles en el transcurso de las primeras 48 horas, no habiendo mostrado signos de toxicidad en el estudio de la toxicidad subcrónica (López, 2008).

Tomando en cuenta los resultados anteriores, resulta necesario aislar y caracterizar bioquímica y molecularmente a la o las lectinas responsables de la actividad biológica contra células de cáncer ya que representa un importante potencial para convertirse en una herramienta valiosa para futuros estudios contra cáncer *in vivo*.

ANTECEDENTES

2.1. FRIJOL TÉPARI (*Phaseolus acutifolius*)

2.1.1 Descripción botánica

Dentro del grupo de las especies leguminosas, el frijol es una de las más importantes. El frijol común es uno de los principales alimentos consumidos en la dieta de los mexicanos y gran parte de América y África. Es una planta anual cultivada desde zonas tropicales hasta templadas. En el Norte de México se cultiva una variedad particular de frijol conocida como frijol Tépari, cuyo nombre científico es *Phaseolus acutifolius*, planta de tallo decumbente, extendido o voluble, de 0.5 a 3 m de longitud. El haz de la hoja es liso, con nervaduras prominentes en la parte abaxial, lanceoladas de 2 mm de longitud por 1 mm de ancho, pecíolos delgados de 2 a 10 cm de longitud, de foliolo terminal grande de 4 a 9.5 cm de longitud y de 2.2 a 5.2 cm de ancho. Presenta inflorescencias axiales en las hojas, pedúnculos delgados, la parte superior de la inflorescencia presenta de 2 a 5 flores, brácteas y bractéolas pequeñas. Flores de tamaño medio, pediceladas blancas o violeta pálido. Cáliz corto de 3 a 4 mm de longitud, ancho acampanado. Pubescencia en diente y cáliz disperso y frágil. Vainas con 2 a 7 semillas de 5 a 9 cm de longitud y de 8 a 13 mm de espesor. El tamaño de la semilla varía de 6.9 a 9.8 mm de longitud y 3.8 a 6.7 mm de ancho y de 2.7 a 4.8 mm de grosor. Los colores de las flores son variables: blancas, amarillas, café o negro azuladas a violeta oscuro, la forma de la semilla es ovalada a casi redonda y lenticular (Figura 1) (Freeman, 1912).

Esta especie ha crecido por un largo tiempo en Mesoamérica, principalmente en zonas desérticas o áreas con un periodo largo de sequía (González de Mejía y col., 1989). Crece de forma silvestre en algunas regiones áridas y semiáridas del suroeste de Estados Unidos desde la parte central del estado de Arizona (EUA) hasta el sur de Nicaragua. Su origen se remonta a 5000 a.C., en el Valle de Tehuacán, Puebla, lugar en donde se encontraron las semillas más antiguas. Es

una de las cinco especies de *Phaseolus* domesticadas en América en tiempos precolombinos (Debouck, 1994). El frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) está adaptado a condiciones áridas y semiáridas y es muy resistente a condiciones agronómicas adversas como son las altas concentraciones de sales y poca disponibilidad de agua, además presenta gran tolerancia a plagas de insectos y microorganismos y a diversas enfermedades que normalmente afectan al frijol común (Thomas y Waines, 1984). El frijol Tépari se cultiva en Sonora desde 1760 aproximadamente, aunque es probable que su uso provenga desde la época prehispánica. En la actualidad el agricultor de Sonora siembra el frijol Tépari para consumo personal utilizando áreas pequeñas. Las producciones por año suelen ser dos y las temporadas en las que se siembra son en los meses de febrero a abril y de junio a agosto. El suelo en el mes de junio en el desierto de Sonora alcanza los 50° C por lo que necesitan como mínimo dos lluvias de la temporada para humedecer y enfriar el suelo lo suficiente para realizar la siembra de Tépari (Nabhan y Teiwes , 1983).

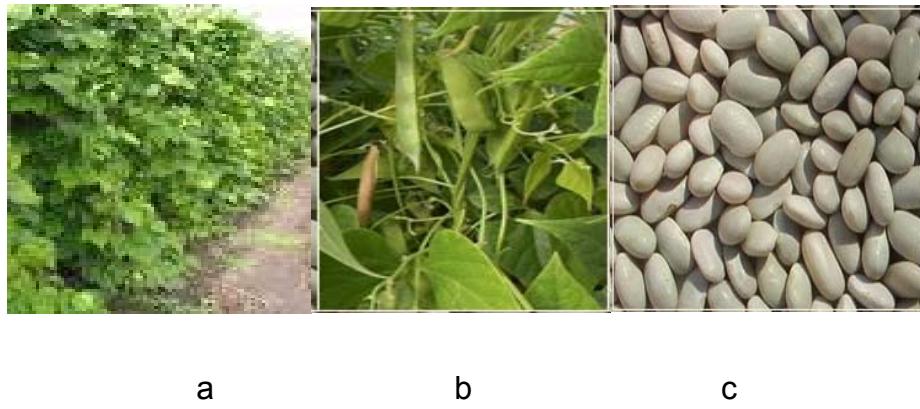


Figura 1. Planta de frijol Tépari. (a) planta de frijol Tépari (b) hoja y vaina (c) semilla.

2.1.2 Valor nutricional del frijol Tépari.

El frijol Tépari se utiliza principalmente como alimento para humanos y animales debido a su gran contenido proteico sin embargo, es poco consumido por lo que su alto contenido de proteínas y carbohidratos está subutilizado (Osman y col., 2003). Es considerado como una fuente importante de proteínas; a pesar de que

presenta deficiencia en aminoácidos azufrados, su contenido es ligeramente mayor a los reportados en otras variedades de frijol cultivadas en condiciones ecológicas menos adversas. Tiene un valor proteico promedio de 25% en base seca y 23% en base húmeda (Intriago-Ortega, 1985; Idouraine y Yensen, 1991). La concentración de cenizas, grasas y carbohidratos totales del frijol Tépari son similares a otras variedades comunes del género *Phaseolus*. Sin embargo, presenta compuestos antinutrídios como son fitatos, lectinas e inhibidores de proteasas que, aunque relativamente altas en el extracto crudo, desaparecen casi del todo después de la cocción; por lo que al ser consumidos no constituyen un riesgo para la salud (González de Mejia y col., 1989; Idouraine y Yensen, 1991). Respecto al frijol común, el frijol Tépari tiene concentraciones menores de lectinas sin embargo, éstas poseen una actividad biológica mayor (González de Mejía y col., 2005).

2.2. LECTINAS

2.2.1 Definición

Las semillas de las plantas, en especial de leguminosas, son ricas en lectinas (Scheerens y col., 1983). Las lectinas son un grupo de proteínas o glicoproteínas de origen no inmune, variables en su secuencia de aminoácidos y estructura. Estas proteínas poseen al menos un dominio no catalítico que se une a monosacáridos y oligosacáridos específica y reversiblemente y precipitan algunos polisacáridos y glicoproteínas de manera específica (Goldstein y col., 1980; Peumans y Van Damme 1995; Sharon, 1996).

Las lectinas pueden aglutinar células mostrando un alto grado de especificidad por eritrocitos humanos de grupos sanguíneos específicos, así como por eritrocitos de diferentes especies animales (Boyd y Sharpleigh, 1954). Se ha propuesto que el término lectina se utilice genéricamente para definir a todas las proteínas que se ligan específicamente a azúcares, designándolas como

fitolectinas, zoolectinas o micolectinas, dependiendo de su origen (Sharon y Lis, 1972; Liener, 1976; Sharon, 1996; Wang y col., 2002).

La aglutinación de células consiste en la agregación sistemática de células mediada por macromoléculas específicas (anticuerpos o lectinas) que reconocen estructuras moleculares sobre la superficie celular (Figura 2). Este proceso depende del número de determinantes antigénicos y de su localización en la célula, así como del tipo de macromolécula y del medio de reacción (Rodríguez y col., 2004)

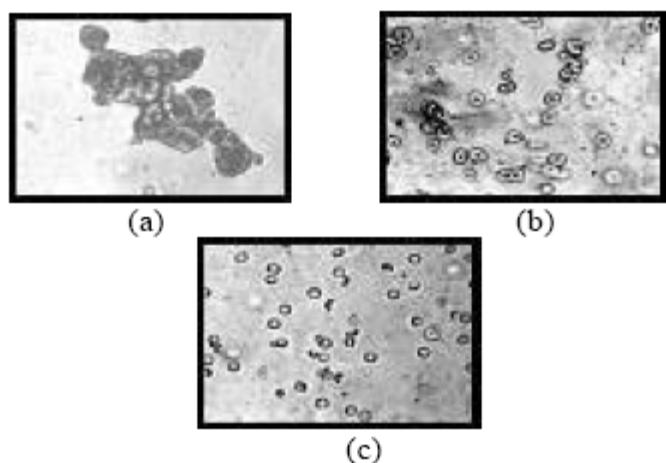


Figura 2. Aglutinación de eritocitos por lectinas. Imágenes con un aumento de 100X mostrando tres situaciones diferentes debido al efecto de las lectinas sobre glóbulos rojos en donde (a) aglutinado, (b) moderadamente aglutinado, (c) no aglutinado (Rodríguez y col., 2004).

Sharon (1996) agrupó a las lectinas en distintas familias de proteínas homólogas que comparten propiedades estructurales comunes. La familia más grande y mejor caracterizada es la de las leguminosas, mientras que las lectinas de cereales forman una familia más pequeña. Los otros dos tipos de lectinas son los de origen animal. Peumans y Van Damme (1995) clasificaron a las lectinas según su estructura en tres tipos principales:

1. Merolectinas: son proteínas pequeñas que poseen exclusivamente un dominio de unión a carbohidratos. Debido a su naturaleza monovalente no pueden precipitar glicoconjungados o aglutinar células
2. Hololectinas: poseen dos o más dominios de unión a carbohidratos idénticos u homólogos. Este grupo incluye todas las lectinas con múltiples sitios de unión, las cuales tienen la capacidad de aglutinar células o precipitar glicoconjungados. La mayoría de las lectinas de plantas conocidas son hololectinas, debido a que ellas se comportan como hemaglutininas.
3. Quimerolectinas: son proteínas de fusión que poseen un dominio de unión a carbohidratos y un dominio con actividad catalítica u otra actividad biológica que actúa independientemente del dominio de unión a carbohidratos. Dependiendo del número de sitios de unión al azúcar las quimerolectinas se comportan como merolectinas u hololectinas.

Posteriormente, Weis y Drickamer (1996) clasificaron a las lectinas en cinco grupos principales:

- Dependientes de Ca^{2+} o tipo C.
- Galectinas, unidas a galactosa.
- Tipo P, receptores de manosa 6-fosfato.
- Tipo I, que incluyen las sialoadhesinas y otras proteínas de unión a carbohidratos relacionadas con las inmunoglobulinas.
- Tipo L, relacionadas en secuencia a las lectinas de las leguminosas.

2.2.2 Lectinas vegetales

Las lectinas vegetales suelen clasificarse de varias maneras, por ejemplo: la especificidad hacia el monosacárido que inhibe su actividad hemaglutinante (Tabla 1) y hacia las estructuras oligosacáridicas que reconocen. Se clasifican en lectinas que reconocen N-glicanos, que son oligosacáridos unidos a un residuo de asparagina en las proteínas mediante una N-acetilglucosamina y

lectinas que reconocen a los O-glicanos, que son oligosacáridos unidos a un residuo de serina o treonina en las proteínas mediante una N-acetilgalactosamina (Hernandez y col., 2005).

Tabla 1. Lectinas vegetales utilizadas para el estudio de glicoproteínas y su clasificación según su especificidad hacia monosacáridos.

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

(Hernández y col., 2005).

Las lectinas en las plantas se encuentran en mayor concentración en las semillas y tejidos de almacenamiento, constituyendo entre el 2 al 10% del total de las proteínas, principalmente en las semillas de leguminosas. Estas proteínas en semillas se localizan principalmente en los cuerpos proteicos de las células de los cotiledones y en menor cantidad en hojas, raíces y tallos, lo cual sugiere que las lectinas juegan un papel fisiológico importante en las plantas (Liener, 1976; Etzler, 1985; Chrispeels y Raikhel, 1991). Probablemente las lectinas son sintetizadas en las hojas e, inmediatamente, transferidas a las semillas durante el desarrollo y diferenciación de los embriones debido a que la proporción de lectinas en las hojas maduras disminuye rápidamente al incrementar su concentración en el citoplasma de los cotiledones y los embriones. Cuando la semilla germina, hay una disminución progresiva del contenido de lectinas

proporcional a la pérdida de proteínas de reserva (Mialonier y col., 1973; Pueppke y Bauer, 1978).

Estructuralmente existen características comunes entre las lectinas de una familia determinada, lo que ha permitido el estudio de la interacción lectina-carbohidrato. Mákela (1957) propuso una clasificación en base a la estructura molecular de lectinas vegetales, la cual tiende a reemplazar a la clasificación basada en la especificidad y en la cual se pueden distinguir seis familias de lectinas.

1. Lectinas aisladas de leguminosas. Es la familia de lectinas vegetales más estudiada, generalmente se encuentran constituidas por dos o cuatro subunidades idénticas de 25 a 30 kDa. Cada una de las sub-unidades contiene un sitio de unión para iones metálicos Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} . Una subunidad contiene aproximadamente 250 aminoácidos y presenta una gran homología con las otras subunidades. Está constituida por doce hojas β antiparalelas conectadas entre sí mediante α -hélices, lo que genera una estructura aplanada en forma de domo (Figura 3-1), cuatro hélices localizados en la parte superior del monómero forman el sitio de reconocimiento a carbohidratos.
2. Lectinas con dominios tipo heveína o específicas de quitina. Los miembros de esta familia generalmente presentan dos subunidades idénticas, ricas en cisteínas contrariamente a las lectinas de leguminosas. Una subunidad está constituida por cuatro dominios tipo heveína, conteniendo cuatro puentes disulfuros, lo cual origina que no existan estructuras secundarias regulares a excepción de una pequeña α hélice de cinco residuos, cada dominio presenta un sitio de reconocimiento a carbohidrato, que no necesita la presencia de iones metálicos (Figura 3-2).
3. Lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa. A este grupo de lectinas pertenecen las de orquídeas, ajo y amarilis, con secuencias de aminoácidos altamente conservadas. Estas lectinas son tetraméricas, cada

monómero tiene un peso molecular de 12 kDa, así como una secuencia de 36 aminoácidos repetidas tres veces. El sitio de reconocimiento a carbohidrato está constituido por cuatro hojas β antiparelolas unidas entre sí por giros (Figura 3-3). El conjunto se asocia de manera que forma una corona aplanada, dejando aparecer un gran túnel central.

4. Lectinas en forma de prisma β o del tipo jacalina. En este grupo, se encuentran lectinas vegetales, que presentan estructuras tridimensionales muy similares a la de *Artocarpus integrifolia* (jacalina). Son lectinas tetraméricas glicosiladas, donde cada sub-unidad contiene una cadena pesada (α) y una cadena ligera (β), y está constituida por tres hojas β antiparalelas arregladas a manera de un prisma triangular (Figura 3-4).

5. Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas. Estas proteínas forman parte de los venenos más tóxicos. Su estructura molecular es compleja. Están constituidas por dos cadenas, la A y B, las cuales son diferentes y se encuentran unidas por dos puentes disulfuro. La cadena A es la responsable de la toxicidad (actividad de N-glicosidasa sobre el ribosoma que inactiva la traducción), mientras que la cadena β posee la actividad de lectina. La cadena β está constituida por dos dominios que presentan cuatro sub-unidades, las cuales contienen α -hélices y hojas β (Figura 3-5).

6.-Lectinas tipo amaranto. Dentro de este grupo se encuentran lectinas provenientes de distintas especies de amaranto, entre las que destacan *Amaranthus caudatus* y *Amaranthus leucocarpus*. Cada proteína se encuentra formada por dos monómeros en los que existen dos dominios N y C, unidos por una pequeña hélice 10^3 , cada dominio muestra una conformación de trébol β semejante a la conformación observada en la cadena β de la lectina de *Ricinus communis* (Figura 3-6).

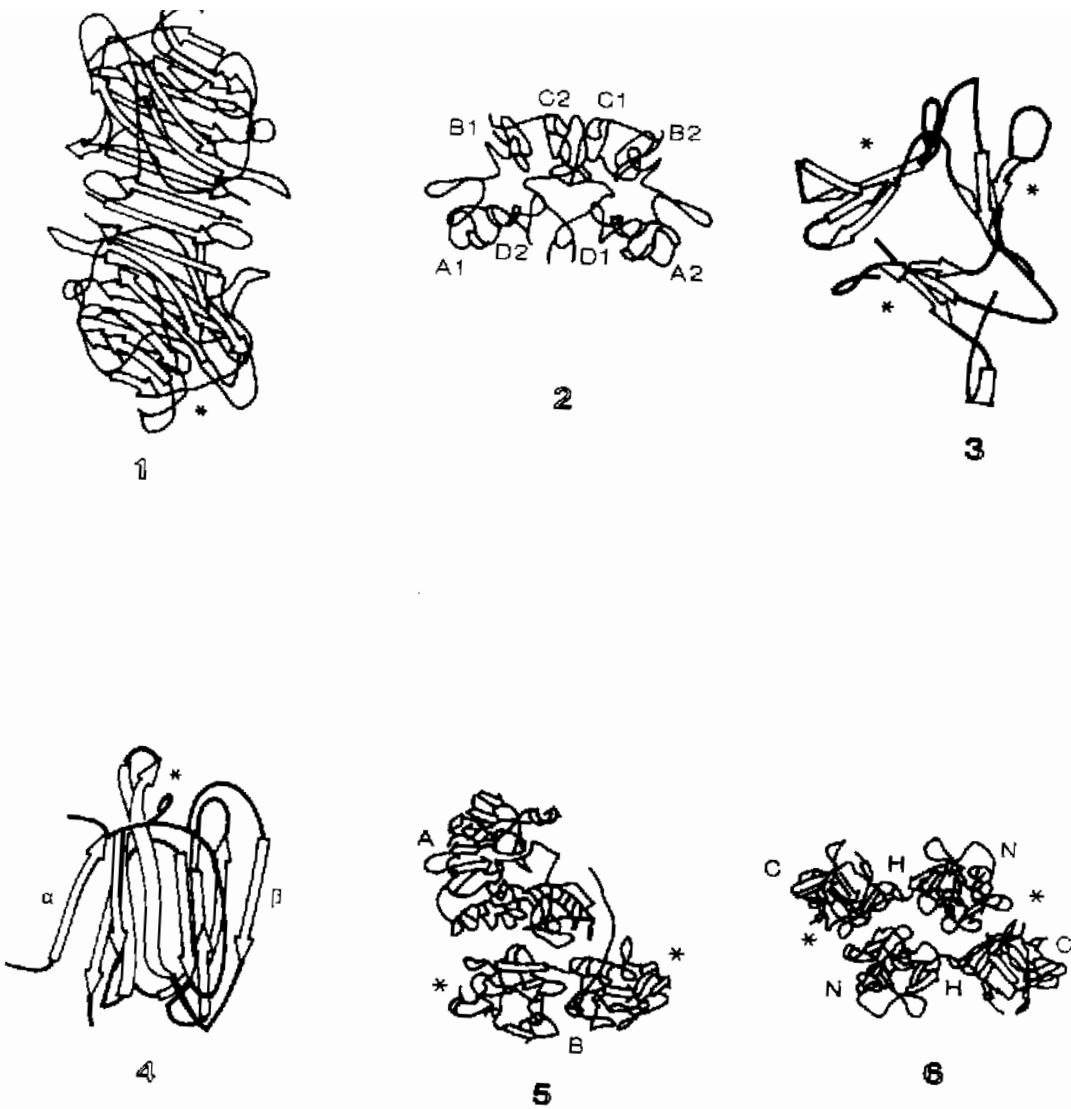


FIGURA 3. Representación esquemática de las estructuras tridimensionales en lectinas vegetales. Lectinas aisladas de leguminosas (1) con su sitio de unión al carbohidrato (*), lectinas con dominio tipo heveina, en donde cada uno de los dominios son representados con letras de la A-D, mismos que tienen un sitio de reconocimiento a carbohidrato (2), lectinas aisladas de monocotiledóneas, específicas de manosa (3), lectinas con estructura tipo prisma β (4), lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas (5), lectinas tipo amaranto (6) (Rudiger y Rouge, 1998).

2.2.3 Lectinas de leguminosas.

a) Estructura.

La mayoría de las lectinas de leguminosas presentes en la planta contienen al menos un grupo N-Glicano. Por ejemplo, la Concanavalina A que se obtiene de *Cannavalia enzyformis* actúa uniéndose a restos de α -D-glucosa y α -D-manosa. Las lectinas de leguminosas son el único grupo de lectinas que contienen cationes divalentes con sitio específico para ligar metal, los cuales son esenciales para la unión de carbohidratos. Los promotores de las lectinas de leguminosas, consisten de una o dos cadenas. Están constituidas de una hoja β de 7 curvas (parte frontal) y una hoja β plana de seis (parte trasera), interconectadas por vueltas y lazos para formar una estructura tridimensional (Figura 4). La orientación de las líneas antiparalelas de las hojas β le proporciona una estructura rígida y fuerte que puede explicar la extrema resistencia de las lectinas de leguminosas al ataque proteolítico enzimático por lo que son resistentes a la digestión por las enzimas de los mamíferos y sobreviven al paso a través del tracto digestivo (Lis y Sharon, 1998; Rhodes, 1999).

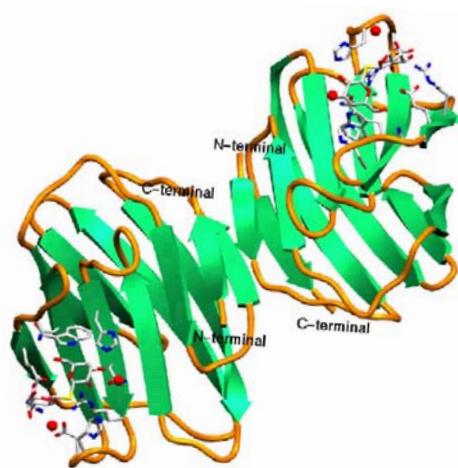


Figura 4. Estructura de la Concanavalina A. La Concanavalina A es una lectina obtenida de *Cannavalia enzyformis*, se presenta como un dímero con dos regiones opuestas para el sitio de unión a carbohidratos (<http://www.juliet.med.jhmi.edu>).

b) Toxicidad y efecto antinutríctio.

Las lectinas de los alimentos son capaces de sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal para ejercer su actividad biológica. Estas proteínas presentan alta resistencia a la digestión por las enzimas proteolíticas de los mamíferos ya que tienen unión efectiva con los receptores de superficie de las células epiteliales del intestino (Rhodes, 1999; Lajolo y Genovese, 2002).

Estudios realizados en ratas muestran que, aproximadamente, un 8% de la aglutinina de soya intacta permaneció en su forma libre, además de la cantidad ligada al epitelio (Lajolo y Genovese, 2002). En otro estudio se observó que la mayor parte de la lectina del frijol Kintoki, administrada a ratones mediante cánula de intubación gástrica, se encontró en el tracto digestivo a niveles de 88.7%, 99.4%, 99.5% y 78.6% después de 0.5, 2, 5 y 24 h posteriores a la intubación, respectivamente (Hara y col., 1984). La concanavalina A fue recuperada en cantidades significativas sin presentar alteraciones en el contenido fecal de ratas 4 h después de su administración oral. De las heces se recuperó el 90% 4 días posterior a la administración de la misma, indicando que dicha lectina es estable durante su paso por el tracto gastrointestinal (Nakata y Kimura, 1985).

Las lectinas se unen el epitelio intestinal de las ratas e interfieren con la absorción de nutrientes (Lajolo y Genovese, 2002). Al incluirlas en una dieta de 0.73 mg/g de alimento, las lectinas de soya mostraron una reducción en la retención del nitrógeno y un aumento de la excreción de nitrógeno a través de la orina, indicando interferencia con el metabolismo de la proteína (Czerwinski y col., 2005). Además, las lectinas de la soya reducen la producción de insulina de las ratas a las que se les dan dosis orales mayores a 0.02 g/kg de peso corporal (Puszta y Bardocz, 1996).

c) Inactivación.

Debido a su naturaleza proteica, las lectinas son inactivadas bajo ciertas condiciones debido a desnaturización irreversible. Para el consumo como alimento, las leguminosas son tratadas mediante calor, así estos factores antinutricionales se inactivan debido a la termolabilidad de las lectinas (Lajolo y Genovese, 2002). Sin embargo, se puede encontrar alguna actividad residual cuando no son tratadas con métodos de cocción adecuados y cuando los tiempos a los que se someten son cortos (Lajolo y Genovese, 2002; González de Mejía y Prisecaru, 2005). La toxicidad de las lectinas de frijol es inactivada mediante el cocimiento por al menos 15 min a presión atmosférica o por 7.5 min bajo presión. Se ha reportado una completa inactivación en la toxicidad de la lectina de soya mediante tratamiento de calor a 100° C durante 10 min. Por lo tanto, aparentemente no existe actividad residual en las leguminosas al ser cocidas de manera adecuada (Lajolo y Genevese, 2002).

El autoclave ha demostrado ser de gran ayuda en mantener los valores nutritivos de las leguminosas, su efecto probablemente está relacionado con la destrucción de las hemaglutininas tóxicas y otros factores inhibidores del crecimiento. El uso del autoclave durante 5 min a una temperatura de 92° C es suficiente para eliminar la actividad de hemaglutinación en el caso del frijol navy (González de Mejía y Prisecaru, 2005). Sin embargo, para una completa eliminación de la toxicidad del frijol rojo y silvestre, se requiere remojarlos previamente. Se ha encontrado que el calor seco es menos efectivo, 30 minutos de calor seco tienen poco efecto sobre la actividad de la hemaglutinina de ciertas variedades de *P. vulgaris*, detectándose actividad aún después de 18 h de calor (Tareq al-Ati, 2001). El uso del horno de microondas convencional no es un método efectivo para la inactivación de la toxicidad de lectinas, el calor del microondas destruye adecuadamente las hemaglutininas y los inhibidores de tripsina en la mayoría de granos de leguminosas, pero esto no sucede en el caso del frijol común (González de Mejía y Prisecaru, 2005).

d) Función biológica.

Entre las funciones fisiológicas atribuidas a las lectinas en leguminosas se encuentra el reconocimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno en la superficie de las raíces antes de la nodulación (Janzen y col., 1976; Chrispeels y Raikhel, 1991). Se ha sugerido que la función más importante de las lectinas es la defensa de la planta contra sus predadores. La interacción de las lectinas presentes en las vacuolas con otras sustancias dentro y fuera de las células se debe a que, cuando las semillas secas absorben agua, las proteínas presentes en las vacuolas, especialmente las lectinas, son liberadas y forman una solución con el agua adsorbida. Esto trae como consecuencia la presencia de las lectinas en las cercanías de la semilla en germinación, donde pueden interaccionar con microorganismos, tanto benéficos como patógenos. Por otra parte, cuando la semilla u otros órganos de la planta son consumidos por los fitófagos, las lectinas pueden salir de las estructuras celulares dañadas y entrar en contacto con las glicoproteínas que se encuentran en el tracto intestinal de los fitófagos inhibiendo la absorción de nutrientes (Chrispeels y Raikhel, 1991).

En las membranas de células animales, los carbohidratos sirven como señales de reconocimiento para proteínas receptoras (como el caso de las lectinas) en innumerables procesos biológicos, tanto normales como patológicos. Al mismo tiempo, el reconocimiento de carbohidratos por lectinas es central en numerosos mecanismos de defensa del organismo, como la respuesta inmune y la inflamación. Además, son fundamentales en los procesos de fecundación y desarrollo embrionario, así como en el desarrollo neuronal. La estructura de los carbohidratos de la superficie celular y su reconocimiento por lectinas sufre profundas alteraciones dependiendo del estado de desarrollo o en numerosas patologías, como por ejemplo, el cáncer (<http://www.iqfr.csic.es/Mabio>).

En diversas especies animales se han reportado evidencias de lectinas que participan en fenómenos tales como el reconocimiento y la eliminación de glicoproteínas del sistema circulatorio, así como de células envejecidas, células

tumorales y microorganismos, mediante un proceso en el que se marca a un patógeno para su ingestión y destrucción (proceso de opsonización) y la participación de células con actividad fagocítica. También participan en procesos de reconocimiento que permiten la diferenciación celular, la organogénesis, la migración de linfocitos y como factores determinantes en la metástasis (Barondes, 1981; Gallily y col., 1984; Sharon, 1984; Merrit y col., 1994).

Se ha propuesto su utilización como auxiliares en el trasplante de médula ósea de pacientes con inmunodeficiencias severas. La actividad mitogénica de algunas lectinas ha sido muy importante para el análisis de los eventos bioquímicos que se desarrollan durante la estimulación de los linfocitos *in vivo* y son aplicadas en la valoración de la actividad celular de diferentes enfermedades infecciosas. Las lectinas también han sido empleadas en la separación de poblaciones celulares (Lis y Sharon, 1986). Las interacciones entre proteínas y glicanos juegan un papel fundamental en numerosos eventos de la regulación de la fisiología del sistema inmune, como maduración tímica, activación, migración y apoptosis de células T. Los carbohidratos son capaces de modular la fisiología linfocitaria a través de la interacción específica con lectinas endógenas como selectinas y galectinas. Estas lectinas endógenas son capaces de reconocer estructuras sacáridicas localizadas en glicoproteínas de la superficie celular y regular procesos tan diversos como proliferación, diferenciación y ciclo celular. Existen diversos niveles de control de la interacción entre lectinas y azúcares; por ejemplo la expresión regulada de estas lectinas durante el desarrollo de una respuesta inmune y la regulación espacio-temporal de la actividad de glicosiltransferasas y glicosidasas, cuya función es crear y modificar los azúcares específicos para estas lectinas. Hay evidencias de que la expresión y actividad de estas enzimas se regulan en forma positiva o negativa durante diferentes eventos del desarrollo, ejecución y finalización de la respuesta inmune (Toscano y col., 2006).

La activación de linfocitos T es un evento esencial en la iniciación de una respuesta inmune adaptativa. Las lectinas vegetales fitohemaglutinina (PHA) y

concanavalina A (Con A) constituyen una herramienta de uso cotidiano en numerosos laboratorios de investigación en inmunología. Estas proteínas son ampliamente reconocidas por su capacidad de activar linfocitos y promover su proliferación a través de la interacción con residuos sacáridicos presentes en numerosas glicoproteínas de membrana, incluyendo aquéllas involucradas en la sinapsis inmunológica. En este sentido, la amplia utilización de estas proteínas refleja la importancia de las interacciones entre proteínas y carbohidratos en el fenómeno de activación linfocitaria (Toscano y col., 2006).

e) Identificación y reconocimiento específico

El empleo de lectinas vegetales para el estudio de las interacciones proteína-carbohidratos ha puesto en evidencia muchos mecanismos de interacción molecular como es el caso del reconocimiento de receptores glicosilados en la superficie celular. Un ejemplo de la participación de los oligosacáridos es la regulación que ejercen sobre el crecimiento celular, donde las modificaciones en las estructuras oligosacáridicas de proteínas de membrana se han asociado con la capacidad de las células para invadir y colonizar otros tejidos. (Hernández y col., 2005). De igual forma, estas proteínas inmovilizadas en un soporte inerte son utilizadas para purificar macromoléculas que contienen carbohidratos, por ejemplo glicoproteínas, enzimas, hormonas y diversos receptores de membrana, entre los que destaca el receptor para la insulina (Lis y Sharon, 1986).

La gran importancia de las lectinas se debe fundamentalmente a sus propiedades biológicas como la interacción con grupos sanguíneos específicos, aglutinación de linfocitos eritrocitos, espermatozoides, plaquetas, bacterias y células tumorales. Las lectinas de plantas pueden distinguir entre células normales y células malignas debido a que se producen diferencias significativas en la superficie de las células cancerígenas (Aub y col., 1963). Debido a sus propiedades específicas, las lectinas se han utilizado como herramientas en la bioquímica, biología celular, inmunología, genética y biomedicina con propósitos

analíticos y preparativos, así como para el diagnóstico y terapia en el cáncer (Hernández y col., 1999; Guillot y col., 2004; Sharon y Lis, 2004).

Los glicoconjungados de las superficies celulares son conocidos por su desempeño importante en las interacciones célula-célula, tales como el reconocimiento, la comunicación y adhesión (Kobata, 1998; Gabius, 2001). Tales interacciones son también importantes en la tumorogénesis, progresión del tumor y metástasis (Gabius y Gabius, 1997; Kannagi y col., 2004). Durante la diferenciación celular y la transformación maligna, la biosíntesis de las cadenas de oligosacáridos de glicoproteínas está frecuentemente alterada y esta alteración puede ser detectada por las lectinas (Dabelsteen, 1996; Fan y col., 2004). Estudios sobre membrana han informado el uso de lectinas para estudiar cambios estructurales en los glicoconjungados presentes en las superficies celulares. También se emplean para la detección de transformaciones malignas de células a través de la aglutinación preferencial que muestran las lectinas con las células transformadas (Hernández y col., 1999). Muchas de las anomalías en las glicosilaciones encontradas en el cáncer de colon correlacionan con su potencial invasivo y su pronóstico (Rhodes, 1999).

2.2.4 Lectinas y cáncer

Los trabajos reportados utilizando diferentes lectinas de plantas en casos de cáncer *in vivo* (Tabla 2) e *in vitro* (Tabla 3) permiten avanzar en el conocimiento de los mecanismos de acción de estas proteínas, los cuales dependen de diferentes factores como pueden ser el origen celular, clase de tumor y concentración de lectina. Se han realizado investigaciones para utilizar las lectinas y polímeros sintéticos enlazados a ellas como agentes anticarcinogénicos *in vivo* e *in vitro*. Se ha visto que inhiben el crecimiento de las células tumorales y también se han utilizado como medicamentos para prevenir metástasis (Hernández y col., 1999).

Tabla 2. Mecanismos de acción de las lectinas de plantas en diferentes células malignas *in vivo*.

Lectina	Mecanismo de acción	Tipo
PHA (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Inhibición del crecimiento de tumores	Linfomas ascíticos murinos
SBA (<i>Glycine max</i>)	Fortalecimiento del sistema inmune del huésped	Linfomas ascíticos murinos
TMA I y II (<i>Tricholoma mongolicum</i>)	Inhibición del tumor y prolongación de la vida de los animales	Células de sarcoma 180 (ratón)
GS-1 (<i>Griffonia simplicifolia</i>)	Inhibición del crecimiento de tumor	Células ascíticas Ehrlich (ratón)
VCA (<i>Viscum album</i> , L <i>coloratum</i>)	Inhibición del crecimiento de tumores y metástasis por el incremento de la apoptosis y la inhibición de la angiogénesis	Ratón inoculado con células de melanoma B16-BL6
KML-C (Korean mistletoe; <i>Viscum album coloratum</i>)	Actividad inmunomoduladora para fortalecer el sistema de defensa del huésped, efecto en metástasis asociado a muerte natural y macrófagos	Melanoma murino, carcinoma de colon y linfoma
ML-I (<i>Viscum album</i>)	Efecto antitumoral con reducción del crecimiento del linfoma trasplantado	Ratón con tumores de linfoma no-Hodgkin

(Castillo-Villanueva y Abdulaiev, 2005).

Jordinson y colaboradores (1999) reportaron que la lectina de frijol inhibe la proliferación sin una aparente citotoxicidad y estimula la diferenciación y la síntesis de proteínas. Rhodes (1999) informó que las lectinas son abundantes en frutas y vegetales y que la ingesta de estos alimentos protege contra el cáncer de colon, reportando que algunos de los efectos tóxicos de las lectinas son dependientes de su interacción con la flora intestinal y que las lectinas de la dieta pueden ser internalizadas y circular intactas en la sangre periférica.

Tabla 3. Mecanismos de acción de las lectinas de plantas en diferentes células malignas *in vitro*.

Lectina	Mecanismo de acción	Línea celular	Tipo
PHA-L (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Inhibición del crecimiento celular a altas concentraciones	LoVo, HCT-15, SW837	Cáncer colorrectal humano
Con A (Concavalina A)	Inhibición del crecimiento celular a altas concentraciones	LoVo, HCT-15, SW837	Cáncer colorrectal humano
WGA (<i>Triticum vulgare</i>)	Inhibición del crecimiento celular a altas concentraciones	LoVo, HCT-15, SW837	Cáncer colorrectal humano
DSA (<i>Datura stramonium</i>)	Inducción de diferenciación irreversible e inhibición de proliferación celular	C6 glioma, U251, SNB-75, SNB-78.	Glioma de rata, tumor de cerebro humano
VCA (<i>Viscum album</i> , L coloratum)	Inhibición del crecimiento dosis-dependiente Inhibición de proliferación dosis. dependiente, con inducción de apoptosis Inducción de apoptosis a través de la activación de caspasa 3 Inhibición de la telomerasa Inducción de apoptosis por la defosforilación de Akt	Molt-4 B16-BL6 HL-60 SK-Hep-1, Hep3B A253	T linfoblástico humano agudo Melanoma metastásico Leucemia promieloide aguda Hepatocarcinoma humano Cáncer humano
ML-I (<i>Viscum album</i>)	Inducción de apoptosis	Jurkat T-cell, BJAB B-cell	Leucemia humana
ABL (<i>Agaricus bisporus</i>)	Inhibición de la proliferación, internalización y bloqueo de la importación de proteínas nucleares dependientes de NLS.	HT29	Adenocarcinoma de colon humano
VFA (<i>Vicia faba</i>)	Inhibición de proliferación no asociado a citotoxicidad, posible interacción con moléculas de adhesión.	LS174T, SW1222 y HT29	Cáncer de colon humano
AAL (<i>Agrocybe aegerita</i>)	Inducción de apoptosis con actividad de ADNasa	HeLa, SW480, SCG-7901, MGC80-3, BGC-823, HL-60, S-180	Cánceres humanos y sarcoma de ratón

(Castillo-Villanueva y Abdulaiev, 2005).

Estudios en animales de laboratorio han mostrado que las lectinas ingeridas tienen un intervalo muy amplio de efectos que pueden ser relevantes en enfermedades humanas. Algunas observaciones sugieren que las lectinas que presentan efectos de crecimiento-promoción sobre el intestino pueden tener aplicaciones interesantes en la formulación de nuevos tratamientos del cáncer. Estos incluyen cambios en la diferenciación, así como en la proliferación de células intestinales y colónicas. El crecimiento de células tumorales implantadas se puede afectar por la ingestión de lectinas. Además, las lectinas de la dieta pueden afectar la flora intestinal, poseen potente actividad antimetastásica y tienen un perfil toxicológico favorable (González de Mejía y Prisecaru, 2005).

2.3 Lectinas de frijol Tépari

a) Toxicidad *in vivo*

Se ha determinado la toxicidad aguda de la lectina de frijol del tépari (*Phaseolus acutifolius*, G-400-34) en ratones CD-1 por vía intraperitoneal. La DL₅₀ fue 1100 mg/kg para machos y 1120 mg/kg para hembras. El peso de los animales disminuyó en una manera dependiente a la dosis. Los cambios anatómicos más importantes producidos por la lectina de frijol Tépari se presentaron en el timo y el bazo. El timo mostró atrofia lo que se manifestó en una disminución significativa en el peso del órgano, especialmente en los ratones hembras. Esto podría deberse al estrés sobre el sistema inmune provocado por la lectina, mientras que el bazo presentó un incremento significativo en el peso y esto podría ser debido a un efecto sobre la proliferación de linfocitos. La concentración más alta por gramo de tejido fue encontrada en bazo, seguido de pulmones, riñones, corazón, hígado y timo. Como resultado de este estudio se determinó que la lectina de frijol Tépari presentó baja toxicidad en las condiciones probadas, lo que sugiere que esta lectina podría evaluarse en estudios contra cáncer (Reynoso-Camacho, y col., 2003).

Además se ha evaluado la toxicidad aguda y subcrónica de la lectina de frijol Tépari administrada por vía intragástrica y se observó que no provoca toxicidad a ratas Sprague Dawley. En el estudio de la toxicidad aguda se observaron signos clásicos de toxicidad por lectinas con las dosis más altas probadas (300 y 2000 mg/kg de peso corporal), tales como diarrea, piloerección y aletargamiento, con total recuperación después de 48 h. No se observaron alteraciones histopatológicas en colon, intestino delgado, estómago, hígado, riñones, corazón, pulmones, timo y bazo. La dosis de 50 mg/kg de peso mostró efecto positivo sobre el número de leucocitos, por lo que se utilizó dicha dosis para el estudio de toxicidad subcrónica, en el que tampoco se observaron alteraciones (López, 2008; López-Sánchez y col., 2010). Resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que lectinas de frijol Tépari resisten a la digestión ya que se encuentra actividad aglutinante en heces de ratas 24 y 72 horas posteriores a la administración de una dosis de 50 mg de una fracción concentrada en lectinas/kg de peso (Garcia-Gasca, datos no publicados).

b) Efecto citotóxico

En un estudio realizado con lectinas obtenidas de frijol Tépari se mostró un efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células cancerosas SW 480. La inhibición continuó aún después de 48 horas de que las células fueron expuestas a la lectina; así mismo se observó un efecto inhibitorio sobre la capacidad de formar colonias (Valadez-Vega y col., 2007). Los estudios con lectinas de frijol Tépari han demostrado que poseen un efecto citotóxico diferencial sobre células normales y cancerígenas en función de las concentraciones utilizadas. Hernández-Rivera y colaboradores (2007) mostraron que una fracción semipura de lectinas de frijol Tépari obtenida mediante cromatografía de exclusión de peso molecular es capaz de inhibir el crecimiento de células transformadas de ratón 3T3/v-mos, en función de la concentración y de forma diferencial con respecto a su contra parte normal. Dicha fracción ha mostrado que el efecto sobre la muerte de células de cáncer de colon HT-29 no

se encuentra relacionado con necrosis y se ha observado activación de caspasa 3, lo que sugiere un mecanismo apoptótico (Ángeles, 2010).

Una fracción de lectina de frijol Tépari obtenida mediante cromatografía de exclusión de peso molecular y posteriormente por cromatografía de intercambio iónico mostró capacidad de afectar de manera diferencial la sobrevivencia de células de cáncer humano. Las células más sensibles al efecto citotóxico de esta lectina fueron las células de cáncer de colon CaCo2 y de cáncer de mama glandular MCF-7. La lectina mostró un efecto diferencial entre células CaCo-2 y células de íleon normales IEC-18 (Yllescas, 2006; Castañeda, 2007; Castañeda-Cuevas y col., 2007; López, 2007; López-Sánchez y col., 2010).

d) Purificación y caracterización de lectinas de frijol Tépari

Debido a la importancia del potencial efecto anticancerígeno que presentan las lectinas, existe gran interés en la caracterización bioquímica de estas moléculas. Una de las técnicas más utilizadas para la purificación de las lectinas ha sido la cromatografía de afinidad que se basa en el reconocimiento de oligosacáridos, los cuales permiten la separación de lectinas.

Diferentes grupos de investigación han trabajado en la purificación de lectinas de leguminosas. En el caso de las lectinas de frijol Tépari, se han basado en la utilización de diferentes métodos cromatográficos, particularmente cromatografía de afinidad. Pusztai y colaboradores (1987) aislaron y caracterizaron parcialmente lectinas de este frijol usando una columna de fetuina-sepharosa 4B y reportaron la presencia de dos isoformas: leucoaglutinina (PAL) con cuatro subunidades de peso molecular aproximado de 29 kDa y eritroaglutinina (PHA) con cuatro subunidades de peso molecular aproximado de 28 kDa. Vargas-Abores y colaboradores (1987) purificaron las lectinas del Tépari usando una columna de estroma-sefadex y encontraron cuatro subunidades con peso molecular aproximado de 21 kDa, también reportaron que el 7.4% del peso total son carbohidratos. Posteriormente, Pratt y colaboradores (1990) reportaron

cuatro isolectinas con peso molecular aparente de 30 kDa cada una al purificarlas con cromatografía de intercambio iónico y HPLC. Reynoso-Camacho y colaboradores (2003) reportaron la purificación de lectinas de frijol Tépari utilizando cromatografía de afinidad con fetuina-agarosa. Reportaron que la lectina de frijol Tépari es un tetrámero con un peso molecular de alrededor de 120 kDa cuyas subunidades están en un rango de 34-40 kDa. Castillo-Villanueva y colaboradores (2007) purificaron dicha lectina por cromatografía de afinidad usando una columna con membranas de eritrocitos humanos de tipo sanguíneo O. Reportaron la presencia de un tetrámero con peso molecular aproximado de 121 kDa, cada subunidad con peso molecular aparente de 30 kDa con una composición de azúcares del 10% del peso total al purificarlas por cromatografía de intercambio iónico. Además encontraron cuatro isolectinas con idénticos aminoácidos terminales (ANDLSFNFQRFNETN) y describieron que la lectina no se inhibe por azúcares simples sin embargo, mostró especificidad a galactosa y no presenta especificidad diferencial por eritrocitos de diferentes tipos humanos. Por otro lado, Mirkov y colaboradores (1994) dedujeron una secuencia para la proteína de la lectina de frijol Tépari a partir del estudio de genes para glicoproteínas filogenéticamente emparentadas. Hasta ahora no se han secuenciado proteínas o genes funcionales para lectinas de frijol Tépari.

En nuestro laboratorio se ha obtenido una fracción semipura de lectinas de frijol Tépari mediante cromatografía de exclusión molecular (FCL) (García, 2002) y posteriormente López (2007) avanzó en la purificación de una lectina de frijol Tépari mediante cromatografía de intercambio iónico. Como resultado de este estudio se encontró que dicha lectina mostró un peso molecular aparente de 34 kDa. Sin embargo, no fue posible purificarla mediante cromatografía de afinidad como reportaron Puszta y colaboradores (1987) y Reynoso y colaboradores (2003) y el procedimiento de cromatografía por intercambio iónico mermó la actividad aglutinante hasta en un 80%. Los resultados disponibles hasta ahora son inconsistentes y no muestran claramente las características y la identidad de la lectina citotóxica de frijol Tépari.

III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente no se cuenta con información concluyente acerca de la identidad y características de la fracción semipura de la lectina de frijol Tépari que presenta efecto citotóxico sobre células de cáncer humano. Se han reportado diferentes estudios en donde caracterizan parcialmente algunas lectinas de frijol Tépari sin embargo, la información obtenida muestra diferencias importantes en las lectinas estudiadas con respecto a la estudiada en nuestro laboratorio. Es necesario contar con un método bien definido que permita obtener una a forma pura de lectina funcional para su caracterización biológica y molecular. Lo anterior permitirá conocer sus principales características fisicoquímicas y bioquímicas para avanzar en la caracterización futura del efecto biológico.

IV. HIPÓTESIS

Es posible caracterizar bioquímicamente una proteína contenida en la fracción de lectinas presente en frijol Tépari sin perder su actividad biológica.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL.

Purificar y caracterizar parcialmente una de las lectinas presentes en la fracción semipura de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sin pérdida de su actividad biológica.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Seleccionar los métodos de purificación que permitan incrementar el rendimiento y recuperación de la actividad biológica de las principales lectinas presentes en la FCL de frijol Tépari.
2. Determinar el peso molecular aparente de la(s) lectina(s) presentes en la FCL.
3. Determinar el punto isoeléctrico de la(s) lectina(s) presentes en la FCL.
4. Determinar la dependencia de cationes metálicos de la(s) lectina(s) presentes en la FCL.
5. Medir la estabilidad a pH y pH óptimo de la(s) lectina(s) presentes en la FCL.
6. Determinar la secuencia parcial de los principales péptidos obtenidos.
7. Determinar la composición cualitativa de los carbohidratos presentes en los principales péptidos obtenidos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico.

Semillas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) adquiridas en un el mercado local de Hermosillo, Sonora.

6.2 Reactivos.

Todos los reactivos fueron grado analítico, provenientes de las casas comerciales Sigma (St. Louis Mo, USA) y J.T. Baker (Phillipsburg, USA). Los reactivos para electroforesis se adquirieron en Bio-Rad (Hércules, Ca, EUA). Las matrices para cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico fueron de Pharmacia (Pharmacia Biotech; Uppsala, Suiza). Las placas de 96 pozos de Corning (Corning Costar; Corning, NY, EUA). Los eritocitos de conejo se obtuvieron de un mismo animal con eritrocitos de alta afinidad a la lectina.

6.3 Métodos.

6.3.1 Obtención de FCL

La harina se obtuvo mediante la trituración de las semillas de frijol Tépari en un molino Tekmar modelo A-10 Analytical mill. La harina obtenida de esta molienda se desgrasó con una mezcla de cloroformo-metanol 2:1 en una proporción 4:1 p/v con agitación por 15 min y después se filtro con vacío, este proceso se repitió 2 veces más. Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente en una campana de extracción. Con la finalidad de optimizar la obtención de la FCL se pesaron 100 g de harina y se probaron los siguientes sistemas de solventes: 500 mL de H₂O, 500 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8 (Tris-HCl), 500 mL de NaCl 0.15 M (NaCl) o 500 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS). La mezcla se dejó en agitación durante 12 h a 4° C o a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó en una centrifuga Bekman JU2 con rotor JA-20 a

39,200 g, durante 60 min para obtener el extracto crudo y se determinó la actividad aglutinante de cada uno.

Después de haber determinado el mejor solvente para la extracción, se recuperó el sobrenadante y se realizó una precipitación secuencial con sulfato de amonio, iniciando con 40% de saturación y terminando con 80% de saturación y se determinó el intervalo de saturación adecuado. En el procedimiento definitivo se realizó una precipitación al 40% de saturación con sulfato de amonio, con agitación lenta por 30 min y se dejó equilibrar por 30 min a 4° C, posteriormente se centrifugó a 39,200 g durante 45 min. El sobrenadante se llevó a 60% de saturación con sulfato de amonio con agitación lenta por 30 min y se dejó equilibrar por 30 min a 4° C. Posteriormente se centrifugó a 39,200 g durante 45 min, se recuperó el precipitado (P60) y se desechar el sobrenadante. La fracción P60 se resuspendió en un volumen mínimo de agua desionizada, para ser dializada en membranas de 3 kDa de tamaño de poro hasta la eliminación total de sales. Para eliminar partículas suspendidas se centrifugó y se prepararon alícuotas de 4 mL que se cargaron en una columna de 167 x 1.7 cm para filtración en gel con Sephadex G-75 (Pharmacia Biotech; Uppsala, Suiza), dicha columna se equilibró con buffer de bicarbonato de amonio 0.01 M (pH 7.8). El experimento se realizó a 4° C y las fracciones fueron recolectadas a una velocidad de 0.3 mL/min, con la misma solución amortiguadora. El volumen colectado en cada fracción fue de 4 mL y a cada fracción se le midió absorbancia a 280 nm en un espectofotómetro Beckman DU-65. Las fracciones que indicaron presencia de proteínas se sometieron a un análisis de actividad aglutinante para colectar sólo las fracciones con actividad de lectina.

6.3.2 Cuantificación de proteína.

La proteína se cuantificó por el micro método de Bradford (Bradford, 1976). Esta es una técnica que determina la concentración de proteína soluble y se basa en el cambio de coloración al unirse a diferentes concentraciones de proteína. El colorante utilizado es el azul brillante de Coomassie G-250, colorante acídico

que se une principalmente a aminoácidos básicos (Lys, Arg, His) y aromáticos (Trp, Tyr, Phe) y la sensibilidad de este método cae en el rango de 1-25 µg/mL. Para la determinación de la concentración de proteína se utilizó una solución estándar de albúmina sérica de bovino (ASB) a diferentes concentraciones y reactivo comercial de Bradford así como placas de 96 pozos. Brevemente, se colocaron 10 µL de los estándares de proteína o 10 µL de la muestra problema y se adicionaron 200 µL del reactivo de Bradford, se incubaron a temperatura ambiente por 15 min y el cambio de color generado se leyó a 595 nm en un lector de microplacas.

6.3.3 Determinación de actividad aglutinante.

Para determinar la actividad aglutinante se utilizó el método de las diluciones dobles seriadas en placas de 96 pozos (Jaffé, 1980), en donde se colocaran 100 µL de PBS como control negativo, después en los pozos de cada línea (2A, 3A,..., 8A) se agregaron, por triplicado, 100 µL de la fracción a probar con concentración de proteína conocida. Posteriormente se agregaron 50 µL de PBS a toda la placa y se realizaron diluciones dobles seriadas comenzando en los primeros pozos y pasando a los siguientes (1A, 1B, 1C,...,1L). Finalmente, a cada pozo se le agregaron 50 µL de eritrocitos de conejo al 2%, los cuales habían sido previamente fijados con glutaraldehído (Turner y Liener, 1975) y se incubó a 37° C durante 3 h. La placa se leyó en un microscopio invertido y la actividad aglutinante se determinó utilizando una escala arbitraria y apreciativa.

La actividad específica se cuantificó mediante la ecuación:

$$AE = \frac{2^n}{mg}$$

Donde: AE=Actividad específica aglutinante (U/mg) expresada en unidades por mg de proteína inicial, n=Última dilución con aglutinación apreciable al microscopio, mg es la cantidad de proteína en mg.

6.3.4 Perfil electroforético monodimensional.

El perfil electroforético de la fracción se obtuvo mediante electroforesis nativa y desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), al 10% en el gel separador y en el concentrador al 4%, utilizando una cámara de electroforesis de acuerdo al método de Schägger y Von Jagow (1987). Para correr el sistema se utilizó una cámara de electroforesis Mini-Protean III de Biorad, utilizándose marcadores de amplio rango, posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomassie.

6.3.5 Perfil electroforético bidimensional y determinación del punto isoeléctrico

El perfil electroforético se obtuvo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones, la primera dimensión o isoelectroenfoque consiste en la separación de proteínas por punto isoeléctrico (pI). Para esta dimensión se utilizaron tiras de acrilamida con un intervalo de pH de 3-7 en un sistema lineal el isoelectroenfoque en un equipo IPG-phor Isoelectric Focusing System de Amersham Biosciences, con las siguientes condiciones: 15 h de rehidratación, 1 h a 250 volts (V), 30 min a 500 volts, 30 min a 1000 volts y 2 h a 8000 volts. Para la segunda dimensión, que consiste en la separación de proteínas por peso molecular (PM), se equilibró la tira de pH con una solución de equilibrio durante 15 min con dos cambios. Una vez equilibrada se colocó la tira sobre el gel de poliacrilamida al 10% en una cámara Hoffer y se selló con agarosa. Las condiciones de corrida fueron 30 min a 80 V y posteriormente se incrementó el voltaje a 120 V. La determinación del pI se realizó mediante una escala arbitraria en el gel en donde el gel se mide transversalmente y cada centímetro del gel corresponde a una unidad de pH.

6.3.6 Identificación de glicoproteínas.

Se corrió una electrofóresis bajo las condiciones del sistema Schagger y Von Jagow (1987) en gel de poliacrilamida al 10%. La determinación de glicoproteínas se realizó con la técnica de tinción de Schiff (Sigma-Aldrich)/ácido

peryódico (PASS). Brevemente, los geles se fijaron con etanol al 50% por 30 min, posteriormente se lavaron con agua destilada por 10 min y se incubaron 30 min en una solución de ácido peryódico 1% (v/v) ácido acético 3% (v/v) (preparada en fresco). Después de esto, los geles se lavaron con agua destilada 6 veces por 5 min para después lavarse 2 veces por 10 min con una solución de metabisulfito de sodio 0.1% en 10 mM HCl (preparada en fresco) y se incubaron con el reactivo de Schiff por una hora en ausencia de luz. Pasado este tiempo se llevaron con la solución de metabisulfito de sodio al 0.1% en HCl durante 1 h en ausencia de luz, enseguida los geles se lavaron varias veces por 2 h en ausencia de luz con una solución de metabisulfito de sodio 0.5% (v/v) en 10 mM HCl (preparada en fresco). Por último, se dejaron los geles en una solución de ácido acético 7.5% (v/v) metanol 5% (v/v) en agua destilada. Las bandas color violeta indican presencia de glicoproteínas (Walker, 1994).

6.3.7 Cromatografía de FPLC (Fast performance Liquid Chromatography)

Con la finalidad de avanzar en la purificación la muestra se hizo pasar a través de una columna de FPLC acoplada a HPLC con una columna de Superosa 12HR10/30 de filtración en gel, la cual fue equilibrada con un buffer de fosfato de sodio 0.01M pH 7.5, la elución se mantuvo a flujo constante de 0.4 mL/min.

6.3.8 Cromatografía de afinidad

Las muestras utilizadas en la columna de afinidad fueron extracto crudo y la obtenida de la cromatografía de exclusión de peso molecular (G-75). Se utilizó una matriz de fetuina-agarosa empacada en una columna de Bio-Rad de 1.5 cm de diámetro y 3 cm de largo equilibrada con Glicina-HCl 50 mM pH 8. La muestra se hizo pasar por dicha columna, para posteriormente eluir con Glicina-HCl 50 mM pH 2.8 y NaCl 2 M (Solución B). Se utilizó el siguiente gradiente:

Minutos	% Solución B
0	0
30	0
150	100
20	100
10	0

Las fracciones se recuperaron y se les midió actividad aglutinante.

6.3.9 Identificación de la(s) lectina(s) por espectrometría de masas

A partir de los geles obtenidos mediante electroforesis en 2D se cortaron los spots o las manchas de manera que quedaron de un tamaño aproximado de 2-3 mm. Posteriormente lavaron dos veces con 50 µL de agua ultrapura durante 30 min, 2 lavados con 50 µL de acetonitrilo al 50% durante 10 min y finalmente otro lavado con acetonitrilo al 100% durante 10 min. Posteriormente los spots se rehidrataron con 25 µL de NH₄HCO₃ 100 mM y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se le adicionaron 25 µL de acetonitrilo al 100% y se dejó incubar 15 min a temperatura ambiente con agitación, se retiró el sobrenadante y se secó en Speed Vac. Para la reducción se rehidrataron con 50 µL de DTT 10mM y 500 µL de Tris 100 mM pH 9 y se incubaron por 45 min a 56° C con agitación, transcurrido este tiempo se dejó enfriar y se retiró el sobrenadante. Para la alquilación se agregaron 50 µL de ácido yodo acético (IAA) 55 mM en NH₄HCO₃ 100 mM y se incubó por 15 min en la oscuridad. Posteriormente se lavaron los pedazos del gel con igual volumen de NH₄HCO₃ 100 mM/acetonitrilo 100% y se incubaron por 15 min, eliminó el sobrenadante y se adicionó de 50 a 100 µL de acetonitrilo al 100%, se incubó por 15 min y se secó. Para la digestión se rehidrataron los geles con 15 µL de una solución que contenía 25 µL Tripsina 0.1 µg/µL y 225 UI de NH₄HCO₃ 50 mM y se incubaron por 45 min a 4° C. Se eliminó el líquido remanente, se le adicionaron 20 µL de NH₄HCO₃ 50 mM y se incubó toda la noche a 37° C.

Para la extracción y purificación de péptidos se retiró el sobrenadante de la digestión y se colocó en tubos de 0.6 μ L previamente enjuagados con ácido fórmico al 5%, se le adicionaron 25 μ L de agua y se incubó por 10 min con agitación. Posteriormente se sonicó 5 min, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. Este paso se repitió dos veces más, pero se utilizó acetonitrilo 60%/fórmico 5%, se juntaron los sobrenadantes, se secó la muestra a la intemperie y se le adicionaron 5 μ L de ácido fórmico al 5%.

Para la limpieza de la muestra se equilibró la punta Zip Tip 2 veces con acetonitrilo al 100% y 3 veces con ácido fórmico al 5%, se tomaron 3 μ L de la muestra digerida y se aspiró para retirar el volumen, esto se hizo por al menos 6 veces. Después se lavaron los péptidos contenidos en la Zip Tip con ácido fórmico al 5% 2 veces y se colocó 1.3 μ L de solución de elución (acetonitrilo al 60%/ácido fórmico 1%). Se aspiró y retiró el volumen de la solución en la Zip Tip para eluir los péptidos retenidos en la resina y después cargar la muestra en el capilar y posteriormente en Q/Tof

6.3.10 Secuenciación de péptidos

Las muestras de HPLC liofilizadas se resuspendieron en una solución 50 mM de bicarbonato de amonio y acetonitrilo (ACN) al 10%, posteriormente se le adicionaron 10 mM de Tris 2-carbixietilfosfina (TCEP), se calentó a 35° C por 10 min y se dejó enfriar. Se adicionó IAA a una concentración final de 15 mM y se incubó por 1 h a temperatura ambiente en ausencia de luz, posteriormente se incubó con 5 mM de ditiotreitol (DTT) por 10 min, al finalizar la incubación se le adicionaron 30 ng de tripsina y posteriormente se preincubó de 4 a 12 h a 37° C. Se agregó ácido fórmico al 5% por 10 min y finalmente la muestra se concentró en un Speed Vac para su análisis en el equipo LTQ-FT-ICR (método modificado de nano spray utilizando una fuente acoplada de Waters UPCL). Los resultados se analizaron con el programa Scaffold 2.

6.3.11 Identificación de los carbohidratos.

De la muestra proveniente de HPLC se utilizaron 20 µg de proteína previamente cuantificada por Bradford. Posteriormente se incubó con la enzima PNGase F a 37° C por 12 h para liberar los N-Glicanos. Los oligosacáridos liberados fueron purificados por SPE (solid-phase extraction) y PGC (porous graphitic carbon). Previamente la columna PGC fue lavada con agua ultra pura y posteriormente con 0.05% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) en 80% de acetonitrilo (ACN)/H₂O (v/v), para posteriormente aplicarle los oligosacáridos. La columna fue lavada con agua desionizada con un flujo de 1mL/min con la finalidad de remover sales y residuos de buffer. Los oligosacáridos fueron eludidos con 10% de ACN en H₂O, 20% de ACN en H₂O, 40% de ACN en 0.05% de TFA en H₂O. Cada fracción fue colectada y concentrada para su análisis por MALDI

6.3.12 Efecto de cationes metálicos.

Para evaluar el efecto de los cationes metálicos la muestra, en una concentración de 1 mg en 0.5 mL de tris-HCl pH 8, se incubaron por 24 h con 0.5 mL de EDTA 20 mM a 6° C. Posteriormente la muestra se dializó exhaustivamente en una cámara de microdiálisis marca Bethesda Research Laboratories (BRL), con una membrana de 3.5 kDa marca Spectra/Por contra tris-HCl 20 mM pH 8. Se tomaron alícuotas de 100 µL y se incubaron individualmente con 100 µL de CaCl₂, MgCl₂ o MnCl₂ 2mM por 24 y finalmente se realizó el ensayo de aglutinación.

6.3.13 Estabilidad al pH y determinación del pH óptimo.

Para la determinación del pH óptimo se incubó la muestra por 24 h a 6° C en diferentes soluciones amortiguadoras desde pH 2 hasta pH 10. Las soluciones amortiguadoras utilizadas fueron 50 mM de glicina-HCl (pH 2-3), 50 mM de ácido succínico (pH 4-5), 50 mM de ácido succínico-NaOH (pH 6), 50 mM Tris-HCl (pH 7-8), 50 mM de glicina-NaOH (pH 9-10). Finalmente se realizó el ensayo de aglutinación.

Para determinar la estabilidad al pH se incubó 1 mg de la muestra por 24 h y se disolvió en 100 μ L de agua y 900 μ L de cada buffer; posteriormente se mantuvo la mezcla a 6° C durante 24 h. Pasado este tiempo se realizó el ensayo de aglutinación diluyendo serialmente con PBS.

6.3.14 Análisis estadístico

Para determinar las diferencias entre tratamientos con solventes se compararon las medias mediante ANOVA por el método de Tukey ($p \leq 0.05$).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Optimización de la obtención del extracto crudo.

Se probaron diferentes solventes con el objeto de extraer la mayor cantidad de proteína con actividad aglutinante. Los solventes que permitieron la mejor extracción fueron H₂O a temperatura ambiente, NaCl a temperatura ambiente y Tris-HCl pH 8 a 4° C con una actividad aglutinante, de 2506, 2294.72 y 2409 UA/mg proteína, respectivamente (Figura 5). Se eligió Tris-HCl pH 8 a 4° C para extraer la proteína con actividad aglutinante debido a que con este solvente era posible un mejor control de las condiciones de extracción como pH y temperatura. Con este método se logró extraer la mayor cantidad de proteína con actividad aglutinante comparado con trabajos previos en donde se extraía con H₂O a 4° C y se obtenía en promedio 1422 UA/mg proteína (López, 2008). Esto permitió recuperar aproximadamente el doble de proteína con actividad aglutinante comparado con lo reportado previamente.

7.2 Precipitación secuencial con sulfato de amonio.

Se realizó una precipitación secuencial, con la finalidad de determinar el porcentaje de saturación con sulfato de amonio con el que se precipitaba la mayor cantidad de proteína con actividad aglutinante, ya que en los trabajos previos la precipitación se realizaban de la misma manera en que se precipitaba el inhibidor de proteasas del Tépari, siendo los porcentajes de saturación al 40% y posteriormente al 65%. Se determinó que el porcentaje en el que se precipitó la mayor cantidad de proteína con actividad aglutinante fue al 50%, por lo que se optó por precipitar al 40% en un primer paso para eliminar proteína no específica y posteriormente llevarlo al 60% de saturación para precipitar la proteína con actividad aglutinante. En este paso se logró obtener una actividad total de 4000 UA (Figura 6).

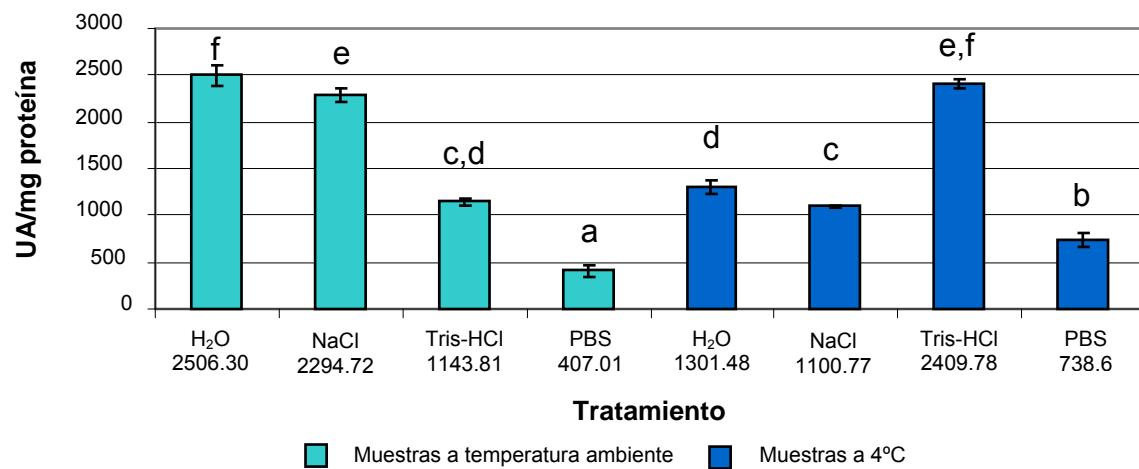


Figura 5. Optimización de la obtención del extracto crudo. Actividad específica (UA/mg proteína) extraída por solvente, donde H₂O agua, NaCl cloruro de sodio 0.15 M pH 8, Tris-HCl 50 mM pH 8, PBS solución de fosfatos. Las letras minúsculas indican diferencia estadística significativa entre los solventes de las diferentes muestras (Tukey, $p \leq 0.05$).

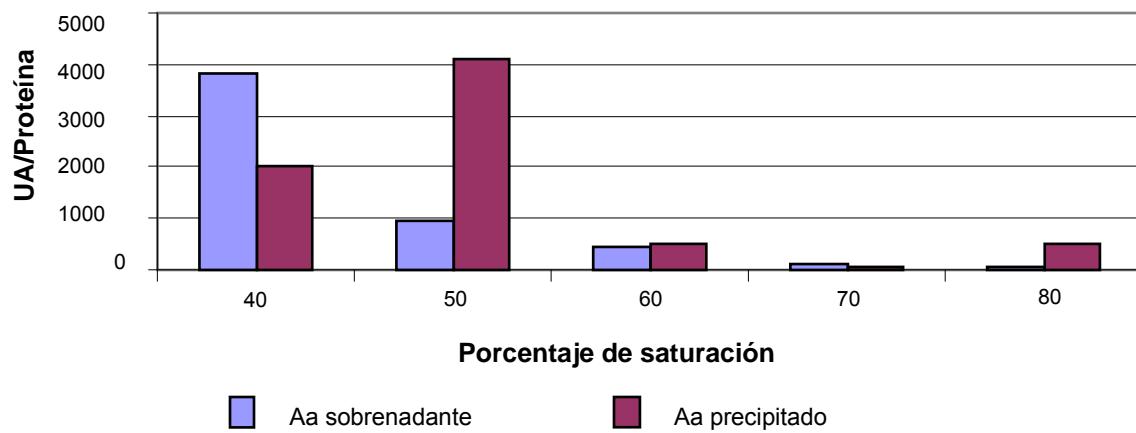


Figura 6. Precipitación secuencial con sulfato de amonio. Se precipitó desde 40% hasta 80% de saturación en donde Aa significa actividad aglutinante.

7.3 Cromatografía de Afinidad.

Reportes previos indican que la lectina de frijol Tépari se logra purificar parcialmente mediante una columna de afinidad con fetuina-agarosa (Reynoso-Camacho, 2003). Con esta finalidad, dicha columna fue montada en nuestro laboratorio sin embargo, no se logró purificar la lectina ya que no fue retenida por la columna y la actividad aglutinante se recuperaba en el volumen muerto (Figura 7). Debido a esto se optó por trabajar con cromatografía de exclusión de peso molecular.

7.4 Cromatografía de exclusión de peso molecular Sephadex G 75.

Una vez precipitada la proteína con actividad aglutinante, la muestra se dializó y se realizó la cromatografía de filtración en gel (G-75). Se colectaron las fracciones y se les leyó absorbancia a 280 nm (línea azul). A cada fracción que mostró tener actividad se le midió actividad aglutinante (línea rosa). Como se puede apreciar en la Figura 8, se obtuvieron dos picos bien diferenciados con importante actividad aglutinante a diferencia de lo reportado en trabajos previos en donde solo se observaba un solo pico con actividad aglutinante de 5020 UA/proteína (López, 2007). Este resultado muestra dos picos con pesos moleculares diferentes y cuya actividad aglutinante fue de más del doble de la que se había logrado recuperar anteriormente ya que el Pico A (PA) presentó una actividad de 12339.33 UA/mg proteína y en el caso del Pico B (PB) una actividad de 8226.22 UA/mg de proteína. Castillo-Villanueva y colaboradores (2007) reportaron la purificación de una lectina con 4 isoformas sin embargo, por definición las isoformas difieren muy poco en sus pesos moleculares y su separación por cromatografía de exclusión de peso molecular es difícil, por lo que en este caso nuestros resultados sugieren que pudiera tratarse de dos lectinas diferentes, o formas oligoméricas distintas, o pudieran ser cadenas polipeptídicas iguales o muy semejantes pero con modificaciones en cantidad y tipo de sus oligosacáridos de antena, lo cual podría explicar la diferencia en pesos moleculares.

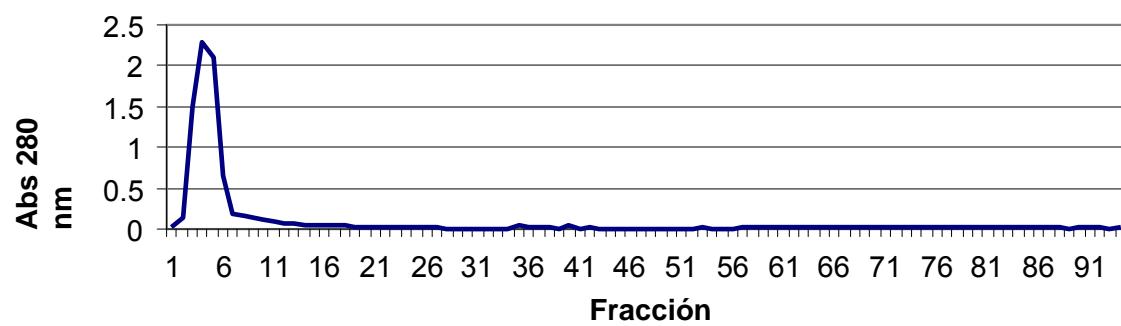


Figura 7. Cromatografia de Afinidad Fetauina-Agarosa. Línea azul representa la absorbancia a 280 nm.

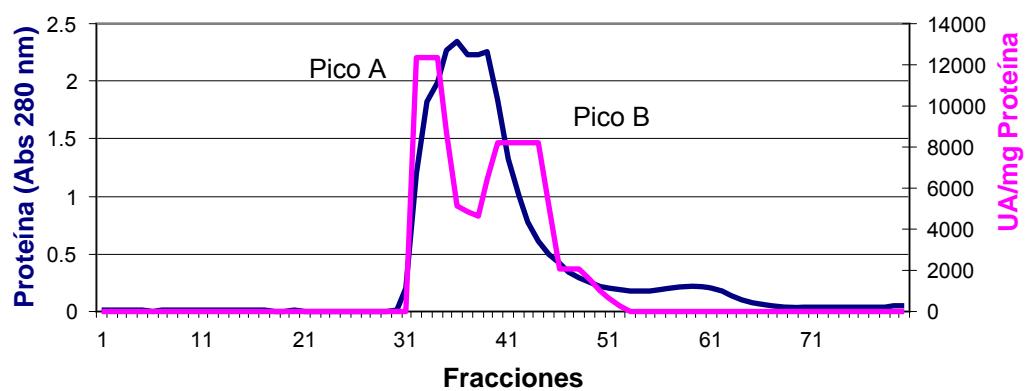


Figura 8. Cromatograma de filtración en gel. Línea azul absorbancia a 280 nm, en línea rosa se muestra la actividad aglutinante de cada una de las fracciones obtenidas en cromatografía de filtración en gel.

7.5 Perfil electroforético monodimensional

Se determinó el patrón electroforético (SDS-PAGE) de la proteína con actividad aglutinante en los diferentes estados de purificación (Figura 9). Se observa que las bandas que se identifican con la tinción de glicoproteínas se van intensificando en los últimos pasos de purificación, las cuales presentan un peso molecular aparente de 30.1 y 25.5 kDa. En el PB se observan con mayor intensidad estas bandas lo que indica que al pasar por los diferentes pasos de purificación se va enriqueciendo la obtención de la proteína con actividad aglutinante.

7.6 Perfiles electroforéticos bidimensionales

Se determinó el patrón electroforético bidimensional de cada uno de los picos identificados y separados por cromatografía de exclusión de peso molecular, de esta manera se pudo observar la pureza de la lectina, a su vez se realizó una tinción para identificar glicoproteínas. Se determinó el peso molecular aparente y el punto isoeléctrico aproximado de las glicoproteínas detectadas (Tabla 4). Para el PA se observaron dos glicoproteínas con peso molecular aparente de 29.8 y 57.5 kDa y punto isoeléctrico de 4.6 y 4.9, respectivamente. En el caso del PB se detectaron 3 glicoproteínas con peso molecular aparente de 26.1, 40.6 y 71.9 kDa y punto isoeléctrico de 4.7, 5.6 y 4.8, respectivamente (Figura 10). Lo anterior muestra una diferencia de cerca de 4 kDa entre las dos manchas mayoritarias, lo cual sugiere que sean proteínas diferentes.

Tabla 4. Comparación de los pesos moleculares y puntos isoeléctricos detectados en cada pico.

Pico A	Peso molecular	pH tiras de pH 4-7
Más abundante	29.8 kDa	4.6
Menos abundante	57.5 kDa	4.9
Pico B		
Más abundante	26.1 kDa	4.72
Mediano	40.6 kDa	5.6
Menos abundante	71.9 kDa	4.87

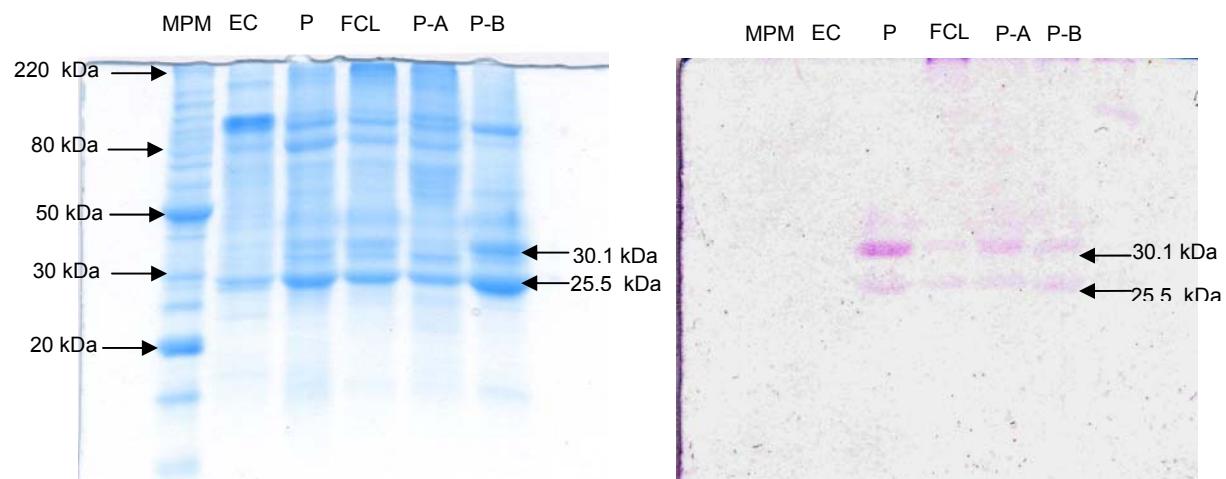
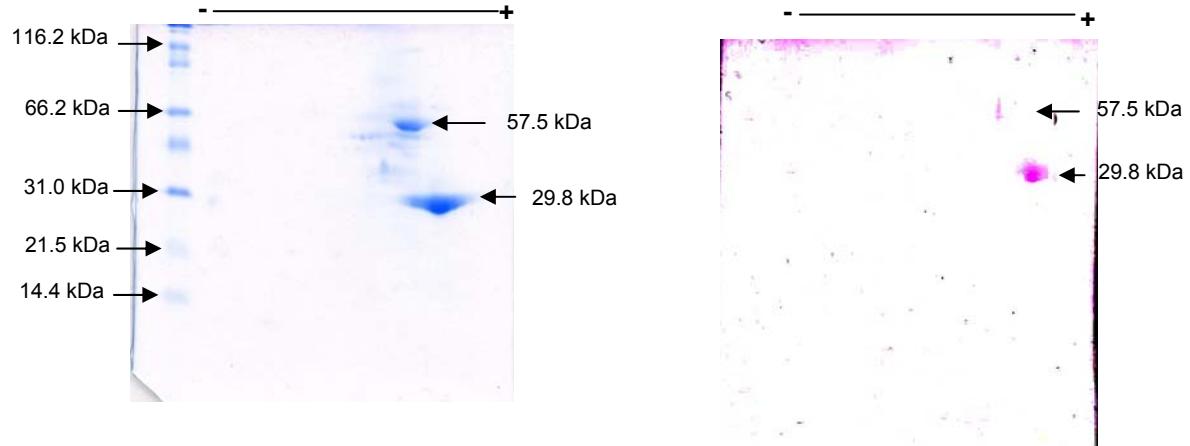


Figura 9. Perfil electroforético SDS PAGE en donde MPM son los marcadores de peso molecular, EC extracto crudo, P precipitado y dializado, FCL pool completo de las fracciones que mostraron actividad aglutinante, P-A primer pico con actividad aglutinante, P-B segundo pico con actividad aglutinante.

A



B

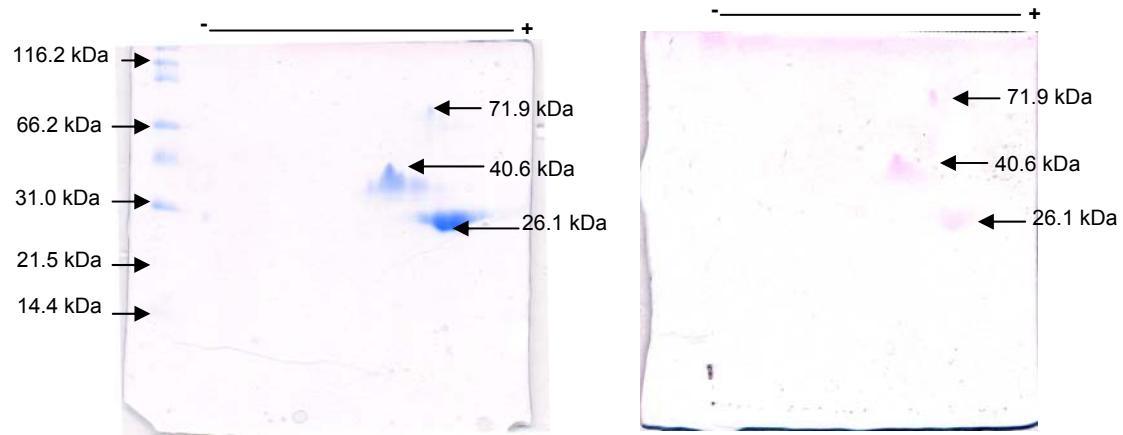


Figura 10. Perfil electroforético bidimensional de las fracciones correspondientes al PA (A) y PB (B). PA y PB provenientes de la cromatografía de exclusión de peso molecular se sometieron a electroforesis bidimensional.

7.7 Identificación de la lectina por espectrometría de masas

Con la finalidad de conocer cuál de las glicoproteínas identificadas en los geles era la lectina de interés, se realizó un análisis de dichas glicoproteínas en un espectrómetro de masas Q/TOF a partir de las muestras obtenidas de los geles 2D. Los resultados no fueron claros ya que para la mancha predominante del PA (29.8 kDa) se encontraron 12 homologías positivas con aglutininas de frijol o sus precursores, incluyendo *P. acutifolius*, así como con soya mientras que para la mancha predominante del PB (26.1 kDa) se encontraron 8 homologías (Tabla 5) (<http://blast.wustl.edu>). Lo anterior puede explicarse si se toma en cuenta que estudios sobre el mapeo genético en *P. vulgaris* indican que las fitohemaglutininas, los inhibidores de alfa amilasa y las arcelinas, aparecen en un mismo locus y se ha postulado que provienen de un gen común (Sharon y Lis, 1990; Mirkov y col., 1994; Loris y col., 1998). Sin embargo, estos resultados no mostraban claridad respecto a la identidad de la proteína estudiada, por lo tanto de optó por avanzar en la purificación con la finalidad de contar con una muestra más limpia para el análisis molecular.

Mirkov y colaboradores (1994) dedujeron una secuencia para la lectina de frijol Tépari en base al estudio del gen común para glicoproteínas emparentadas. Las secuencias que coincidieron con la estructura propuesta del gen de la lectina de *P. acutifolius* fueron GNVETNDLLWSFASK para el PA y AHTVAVFFPTLYNR para PB.

7.8 Cromatografía por HPLC

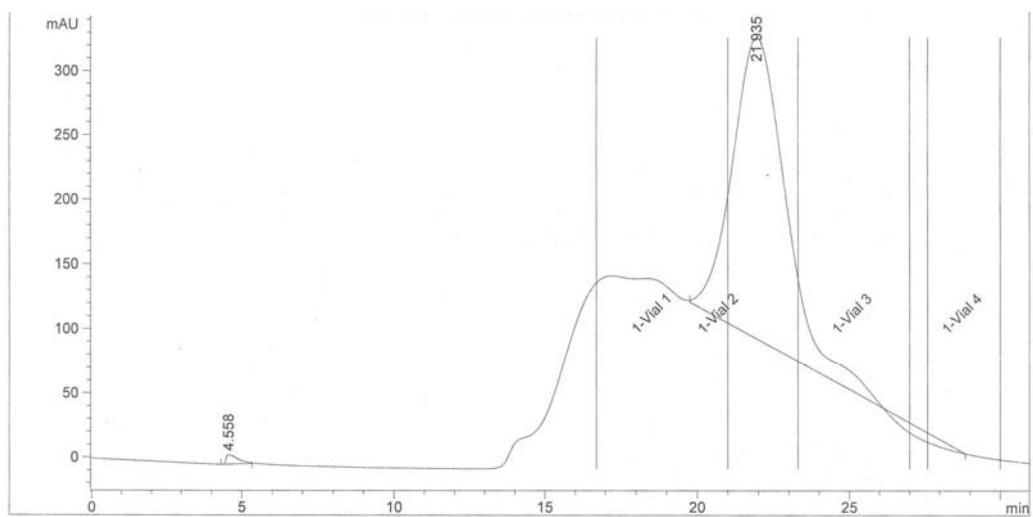
Las muestras de PA y PB se sometieron a una columna de FPLC acoplado a un equipo de HPLC para determinar su perfil cromatográfico y, de esta forma, limpiar más a la proteína de interés. Esto dio como resultado un pico abundante o mayoritario bien definido para cada caso (Figura 11). Dichos picos se separaron y almacenaron para los siguientes estudios.

Tabla 5. Homologías encontradas para PA y PB en banco de datos a partir del análisis de espectroscopía de masas.

PA	PB
1. /:sptrembl Q8RVX9 Q8RVX9 Phytohemagglutinin precursor (<i>P. vulgaris</i>).	1. /:sptrembl Q8RVH1 Q8RVH1 Lectin precursor (<i>P. vulgaris</i>).
2. /:pdb 1G8W 1G8W-A Improved structure of phytohemagglutinin-L from the kidney bean (<i>P. vulgaris</i>).	2. /:sptrembl Q40750 Q40750 Probable leucoagglutinating phytohemagglutinin precursor (PHA-L) (<i>P. acutifolius</i>).
3. /:swiss P05087 PHAL_PHAVU Leucoagglutinating phytohemagglutinin precursor (PHA-L) (<i>P. vulgaris</i>).	3. /:sptrembl Q8RVX6 Q8RVX6 Phytohemagglutinin precursor (<i>P. vulgaris</i>).
4. /:sptrembl Q40750 Q40750 Probable leucoagglutinating phytohemagglutinin precursor (PHA-L) (<i>P. acutifolius</i>).	4. /:sptrembl Q8RVH3 Q8RVH3 Phytohemagglutinin precursor (PHA-E) (<i>P. vulgaris</i>).
5. /:pdb 1FAT 1FAT-A Phytohemagglutinin-L	5. /:sptrembl Q8RVY1 Q8RVY1 Phytohemagglutinin precursor (PHA-E) (<i>P. vulgaris</i>).
6. /:sptrembl Q43628 Q43628 Erythroagglutinating phytohemagglutinin precursor (<i>P. vulgaris</i>).	6. /:swiss P05088 PHAE_PHAVU Erythroagglutinating phytohemagglutinin precursor (PHA-E) (<i>P. vulgaris</i>).
7. /:sptrembl Q8RVH2 Q8RVH2 Phytohemagglutinin precursor (<i>P. vulgaris</i>).	7. /:sptrembl Q8RVY0 Q8RVY0 Phytohemagglutinin precursor (PHA-E) (<i>P. vulgaris</i>).
8. /:sptrembl Q8RVH1 Q8RVH1 Lectin precursor (<i>P. vulgaris</i>).	8. /:sptrembl Q8RW23 Q8RW23 Phytohemagglutinin (PHA-E) (<i>P. coccineus</i>).
9. /:pdb 1G9F 1G9F-A Crystal structure of the soybean agglutinin in a complex with a biantennary blood group antigen analog.	
10. /:sptrembl Q5ZF29 Q5ZF29_9FABA Lectin precursor (<i>P. glabellus</i>).	
11. /:swiss P05046 LEC_SOYBNLectin precursor (Agglutinin) (Soybean lectin).	
12. /:sptrembl Q8RVX5 Q8RVX5 Lectin precursor (<i>P. vulgaris</i>).	

<http://blast.wustl.edu>

A



B

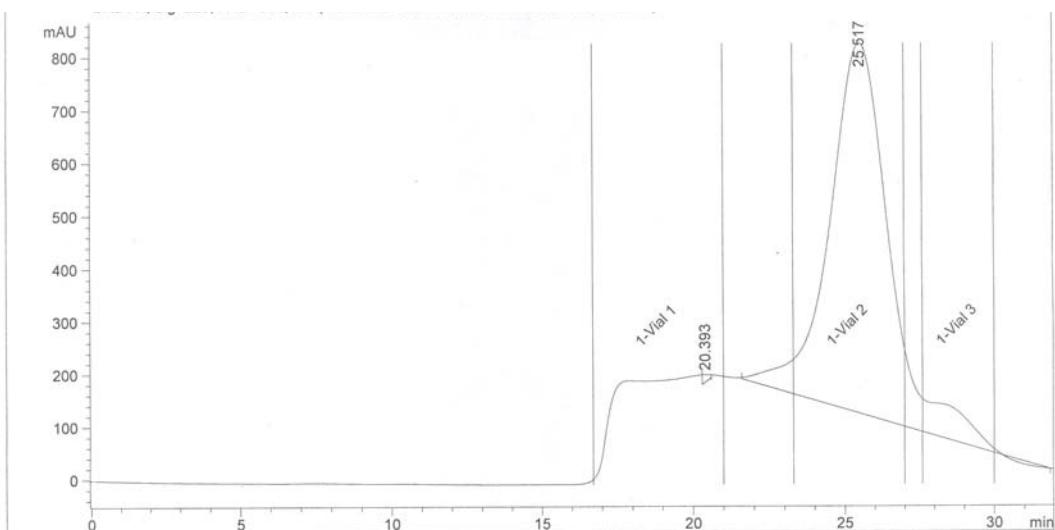


Figura 11. Cromatograma de HPLC para PA (A) y PB (B). Las muestras de PA y PB provenientes de la cromatografía de exclusión de peso molecular se sometieron a FPLC y HPLC.

A diferencia del cromatograma del PA, en el PB se observa una diferencia en el tamaño de los picos separados, siendo el primer pico más abundante que el segundo. Asimismo, los tiempos de retención fueron distintos, de 21.9 y 25.5 para PA y PB, respectivamente y con una actividad biológica de 12800 UA/mg proteína para ambos picos. Lo anterior da cuenta nuevamente de que muy probablemente se trata de dos glicoproteínas diferentes.

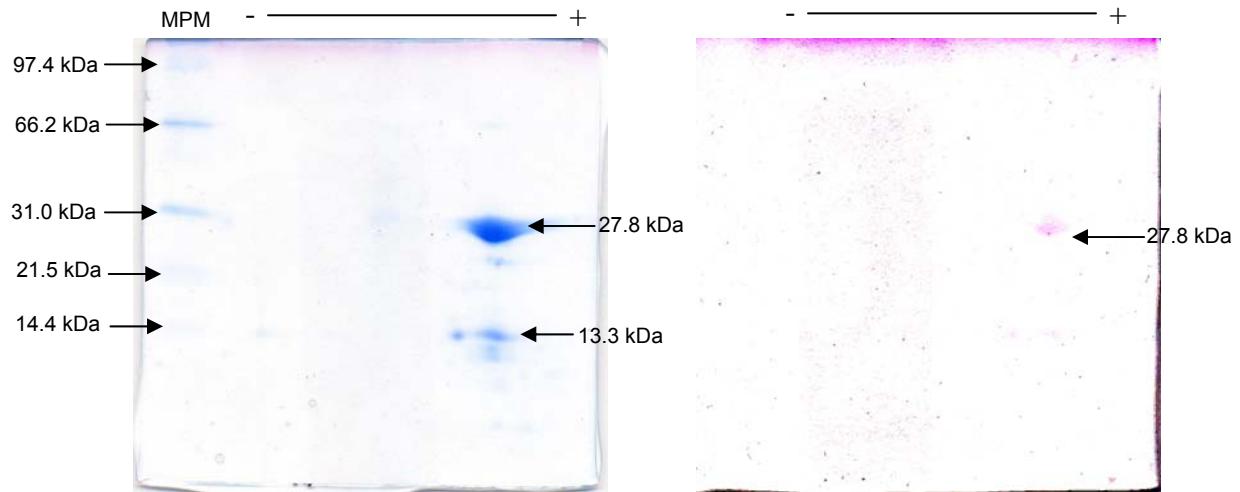
7.9 Perfil electroforético bidimensional de las fracciones obtenidas por HPLC

Se determinó el perfil electroforético del pico mayoritario de las fracciones de HPLC con la finalidad de saber que tan limpia estaba la muestra y saber si el pico mayoritario correspondía a la glicoproteína de interés. A los geles se les realizó primero una tinción de glicoproteínas y, posteriormente, se tiñeron con azul de Coomassie para ver otras proteínas. La Figura 12 muestra que en ambos casos, las glicoproteínas de interés se recuperaron muy limpias ya que, para el caso del PA, sólo se observan dos manchas de 13.3 y 27 kDa mientras que para PB dos manchas de 12.9 y 21.7 kDa.

7.10 Secuenciación de péptidos.

A partir de las manchas de mayor peso molecular se realizó el estudio de secuenciación de péptidos en el equipo LTQ-FT-ICR. Los péptidos se utilizaron en solución ya que se ha observado que al tomar la muestra del gel se podrían afectar los carbohidratos de la proteína. Después de analizar las secuencias obtenidas a través del programa Scaffold 2 se compararon las secuencias con bases de datos y con la secuencia deducida por Mirkov y colaboradores (1994). Se identificaron varios péptidos con alta similitud a dicha secuencia (Figura 13). En esta comparación también se detectaron algunas diferencias entre PA y PB en las siguientes posiciones: 101 RQ, 122 QK, 171 KR, 181 GV, 182 QN, 185 DN, 229 RS (residuos en color rojo). Con respecto a la secuencia deducida de la lectina de Tépari se determinó el porcentaje de cobertura u homología, dando como resultado un 76%.

A



B

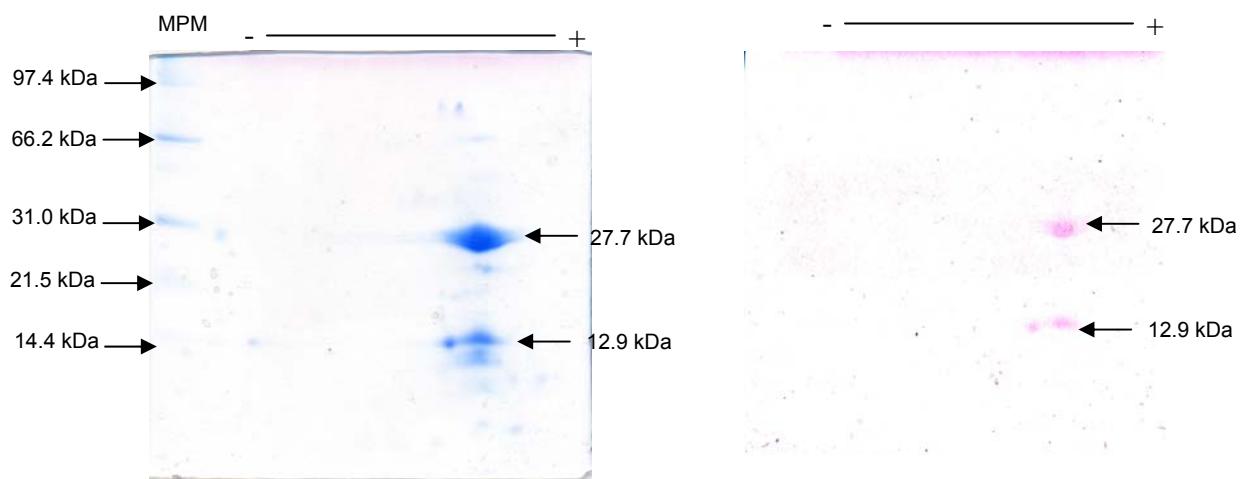


Figura 12. Perfil electroforético bidimensional de los picos mayoritarios de PA y PB obtenidos por FPLC-HPLC.

PA

MASSNFSTVL SLALFLPLLT HANSANDISF NFQRFNETNL ILQGDASVSS
SGQLRLTNLN DNGEPTLSSL GRAFYSTPIQ IWDSTTGAVA SFATSFTFNI
RVPNNAGPAD GLAFALVPVG SKPKdrGGLL GLFDGSDSRA HTVAVEFDTL
YNRDWDPRerHIGIDVNSIKsikTTPWDF QQGEDAEVLI TYDSSTKLLV
ASLVYPSQKT SFIVSDTVDL KSVLPEWVRV GFSATSGITK GNVEETNDLLS
WSFASKLSDG TTSEGLNLAN FVLNQIL

PB

MASSNFSTVL SLALFLPLLT HANSANDISF NFQRFNETNL ILQGDASVSS
SGQLRLTNLN DNGEPTLSSL GRAFYSTPIQ IWDSTTGAVA SFATSFTFNI
RVPNNAGPAD GLAFALVPVG SKPKdrGGLL GLFDGSDSRA HTVAVEFDTL
YNRDWDPRerHIGIDVNSIKsikTTPWDF QQGEDAEVLI TYDSSTKLLV
ASLVYPSQKT SFIVSDTVDL KSVLPEWVRV GFSATSGITK GNVEETNDLLS
WSFASKLSDG TTSEGLNLAN FVLNQIL

Figura 13. Comparación de los péptidos obtenidos de PA y PB con la secuencia de la lectina de Tépari deducida por Mirkov y col. (1994). Los péptidos obtenidos a partir de la secuenciación se compararon con la secuencia deducida para la proteína de frijol tépari. En amarillo se muestra la cobertura y el rojo las diferencias.

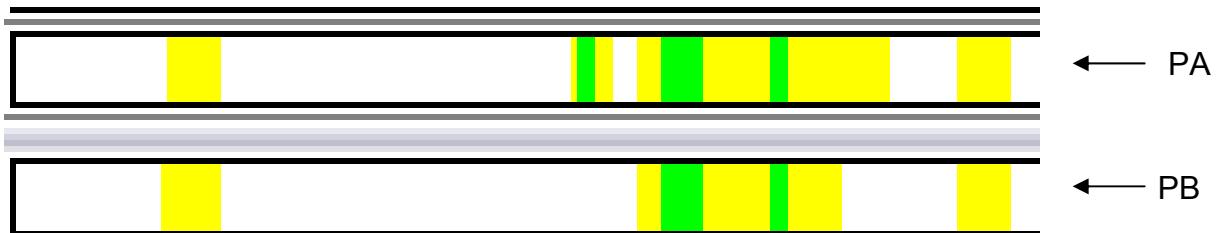
Así mismo, se compararon las muestras PA y PB con las secuencias ya reportadas para la fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (Figura 14). Las áreas en color amarillo corresponden a los péptidos identificados en PA y PB con homología con las secuencias reportadas de *Phaseolus vulgaris*, las áreas en verde corresponden a posibles modificaciones postraduccionales, indicando posibles diferencias en sitios de glicosilación. Como se puede apreciar, en las imágenes se pudo confirmar que existen diferencias significativas entre PA y PB (círculo rojo). Estas diferencias son indicativas de que las fracciones analizadas de PA y PB corresponden a proteínas diferentes, aunque con esta evidencia no es concluyente. Es importante hacer notar que las muestras analizadas se encontraban en solución, por lo que no es posible asegurar que la proteína estudiada se encontrara en un 100% de pureza. Lo anterior no permite concluir sobre la identidad de las glicoproteínas estudiadas por lo que se sugiere utilizar otras herramientas que permitan la obtención de la secuencia peptídica.

También se realizó la comparación de cada uno de los péptidos encontrados en el presente trabajo con las secuencias reportadas por Castillo-Villanueva (2007). De 13 secuencias reportadas por dichos autores, sólo una (GNVETNDLL) coincidió. Lo anterior que se trata de proteínas diferentes, esto puede explicar también el hecho de que los métodos de purificación utilizados por otros autores no han tenido éxito al tratar de purificar las lectinas de interés en el presente trabajo.

7.11 Identificación de carbohidratos totales.

Tanto para el PA como para el PB se identificaron los siguientes carbohidratos (numerados de acuerdo al número de unidades encontradas): con 10% de ACN fue posible observar la presencia de manosa 4, manosa 5, manosa 6, manosa 7, manosa 8 y manosa 9 (Figura 15); con 20% de ACN se observaron hexosa 6, hexosa 7, hexosa 8, hexosa 9, hexosa 10 (Figura 16) y con 40 % ACN fucosa y xilosa (Figura 17).

Sequence Coverage	Protein	Category	Bio Sample	MS/MS Sa...	Prob	%Spec	#Pep	#Uniq	#Spec	%Cov	Weight
	phytohemag... forward		FT20090708...	GPM005000...	100%	1.4%	3	4	46	33%	29 kDa
	phytohemag... forward		FT20090708...	GPM005000...	100%	2.5%	3	4	72	27%	29 kDa



PA

gi|19744134 (100%), 29,332.7 Da
phytohemagglutinin [Phaseolus vulgaris]
3 unique peptides, 4 unique spectra, 46 total spectra, 91/273 amino acids (33% coverage)

```

MASSKLLSLA LFLVLLTLAN SASETSFSFQ RFNETNLLIQ GNASVSSSGQ LRLTNLNNGNG
EPRVGSLGRA FYSAPIQIWD KTTGTVASFA TSFTFNMQVP NNAGPADGLA FALVPVGSQL
KDKGGFLGLF DGSNSNFHTV AVEFDTLYNK DWDPERHIG IDVNSIRSIK TTPWNFVNIGE
NAEVILITYDS STKLVLVASLV YPSQKTSFIV SDTVDLKSVL PEWVSVGFSA TTGINKGNVE
TNDVLSWSFA SKLSDGTTSE GLNLANLVLN KIL

```

The sequence is highlighted with color-coded regions: yellow for homology with Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin, green for post-translational modifications, and red for differences between PA and PB. A red circle highlights a difference at position 46.

PB

gi|19744134 (100%), 29,332.7 Da
phytohemagglutinin [Phaseolus vulgaris]
3 unique peptides, 4 unique spectra, 72 total spectra, 73/273 amino acids (27% coverage)

```

MASSKLLSLA LFLVLLTLAN SASETSFSFQ RFNETNLLIQ GNASVSSSGQ LRLTNLNNGNG
EPRVGSLGRA FYSAPIQIWD KTTGTVASFA TSFTFNMQVP NNAGPADGLA FALVPVGSQL
KDKGGFLGLF DGSNSNFHTV AVEFDTLYNK DWDPERHIG IDVNSIRSIK TTPWNFVNIGE
NAEVILITYDS STKLVLVASLV YPSQKTSFIV SDTVDLKSVL PEWVSVGFSA TTGINKGNVE
TNDVLSWSFA SKLSDGTTSE GLNLANLVLN KIL

```

The sequence is highlighted with color-coded regions: yellow for homology with Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin, green for post-translational modifications, and red for differences between PA and PB. A red circle highlights a difference at position 46.

Figura 14. Comparación de las secuencias de los péptidos provenientes de las muestras PA y PB con la secuencia de péptidos de la fitohemaglutinina de *Phaseolus Vulgaris*. En amarillo se señala la homología con la fitohemagglutinina de frijol común, en verde se señalan posibles cambios postraduccionales y en rojo se señalan las diferencias entre los péptidos que están presentes en PA pero no en PB.

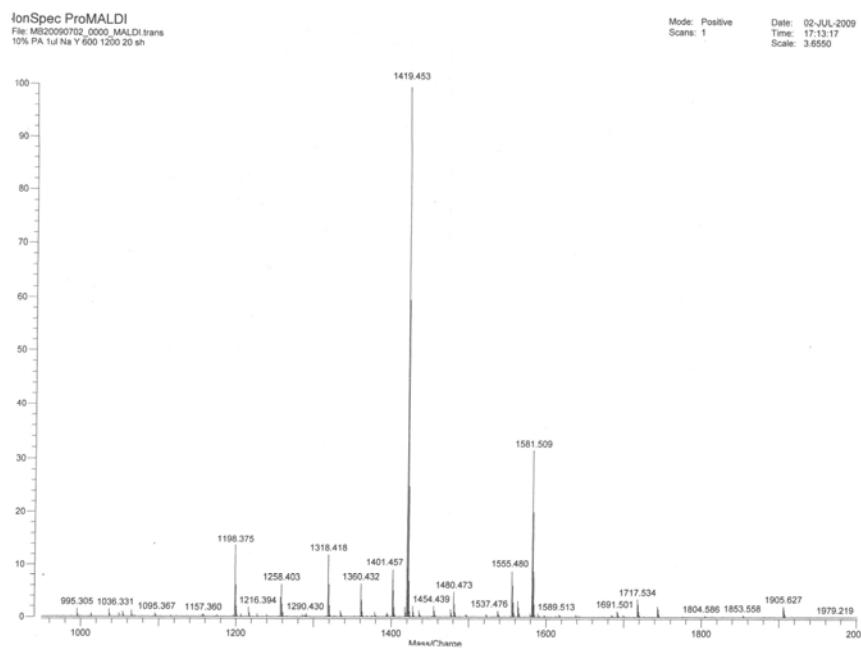
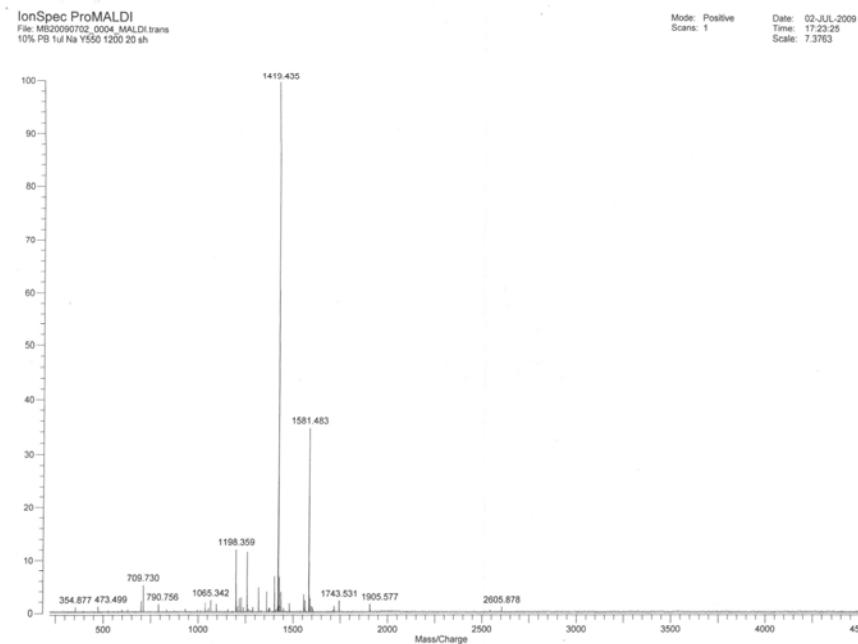
A**B**

Figura 15. Identificación de los carbohidratos presentes en PA (A) y PB (B) mediante espectrometría por MALDI al 10% de ACN.

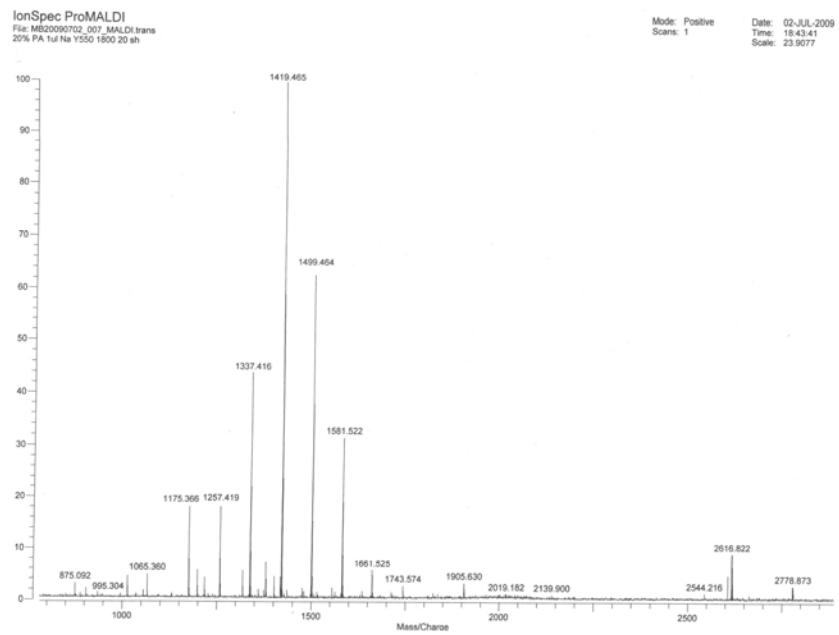
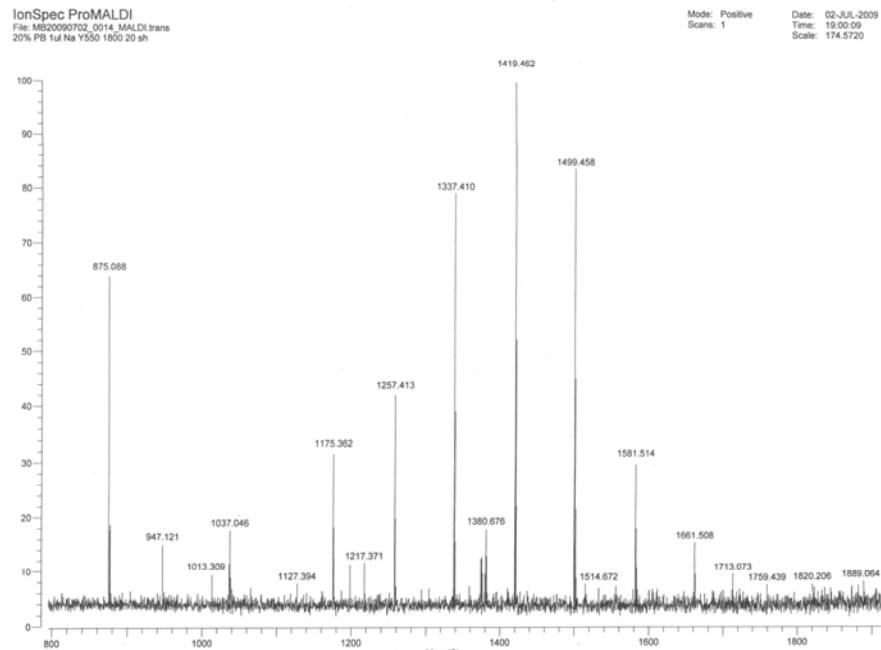
A**B**

Figura 16. Identificación de los carbohidratos presentes en PA (A) y PB (B) mediante espectrometría por MALDI al 20% de ACN.

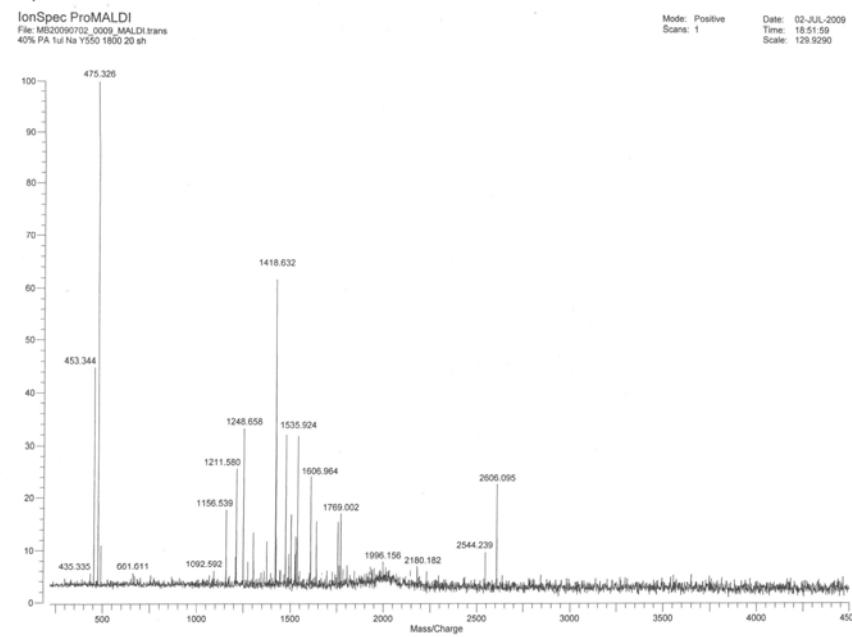
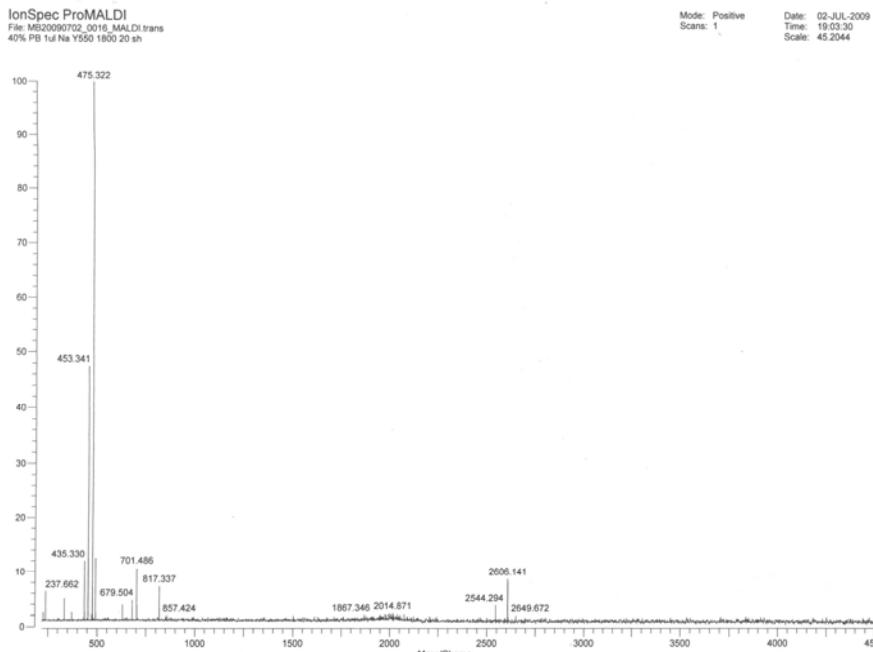
A**B**

Figura 17. Identificación de los carbohidratos presentes en PA (A) y PB (B) mediante espectrometría por MALDI al 40% de ACN.

Los carbohidratos que se lograron identificar para ambas muestras fueron los mismos sin embargo, estos resultados son parciales debido a que la enzima utilizada (PNGase F) fue genérica. Lo anterior implica que la enzima corta en sitios donde se encuentra fucosa α 1-3, por lo que dicha enzima no estaría cortando en los sitios en donde se encontrase fucosa 1-6 y por lo tanto todos los carbohidratos presentes en dicha posición no se analizaron. Futuros estudios se enfocarán en la utilización de enzimas específicas como la PNGase A para determinar las posibles diferencias en el tipo y orden de carbohidratos presentes en las antenas de las glicoproteínas.

7.12 Efecto de los cationes metálicos en la actividad biológica de la lectina

Se determinó el efecto de los cationes metálicos sobre la actividad biológica de la lectina en cada uno de los picos (PA y PB), con la finalidad de conocer el metal al que es dependiente la lectina. Como se puede apreciar en la Figura 18, la incubación con cloruro de calcio permitió la mayor recuperación de actividad (1333 UA/mg) para el PA, mientras que para el PB fue con la incubación con cloruro de magnesio (800 UA/mg proteína). Este resultado sugiere, nuevamente, que las lectinas contenidas en PA y PB no son las mismas. En ninguno de los casos se logró recuperar el 100% de actividad antes de quitar los metales con EDTA (6400 UA/mg proteína). Lo anterior se puede deber posiblemente a que las proteínas pudieran haber adoptado una forma monomérica con menor actividad biológica ya que el tratamiento con EDTA podría haber propiciado un cambio conformacional.

7.13 Determinación de la estabilidad al pH del pico A y pico B.

Se determinó el pH en el cual las lectinas presentan mayor estabilidad. Las lectinas contenidas en ambos picos (PA y PB) presentaron la misma tendencia y fueron más estables en el rango de pH de 4-5 con actividad biológica de 3200 y 4622.2 UA/mg proteína, respectivamente (Figura 19) aunque los valores de actividad fueron mayores para PA.

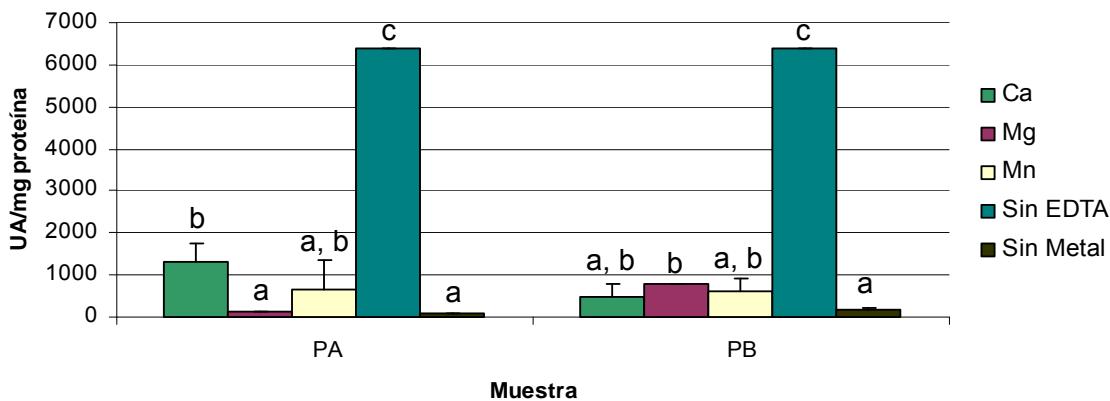
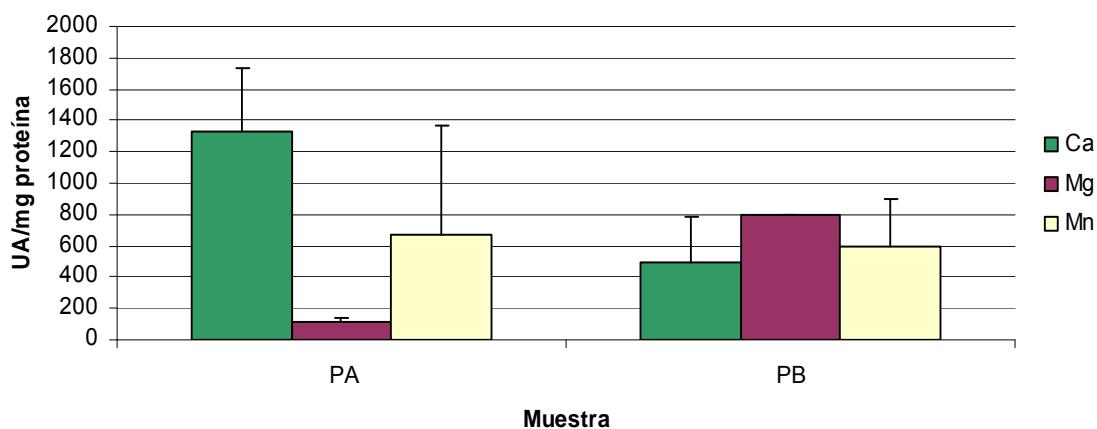
A**B**

Figura 18. Efecto de los cationes metálicos sobre la actividad aglutinante de PA y PB. Se muestra la comparación con la actividad de las proteínas nativas (A) así como la actividad recuperada al agregar calcio, magnesio y manganeso (B). Las letras minúsculas (A) indican diferencia estadística significativa entre la actividad biológica recuperada en las muestras (Tukey, $p \leq 0.05$).

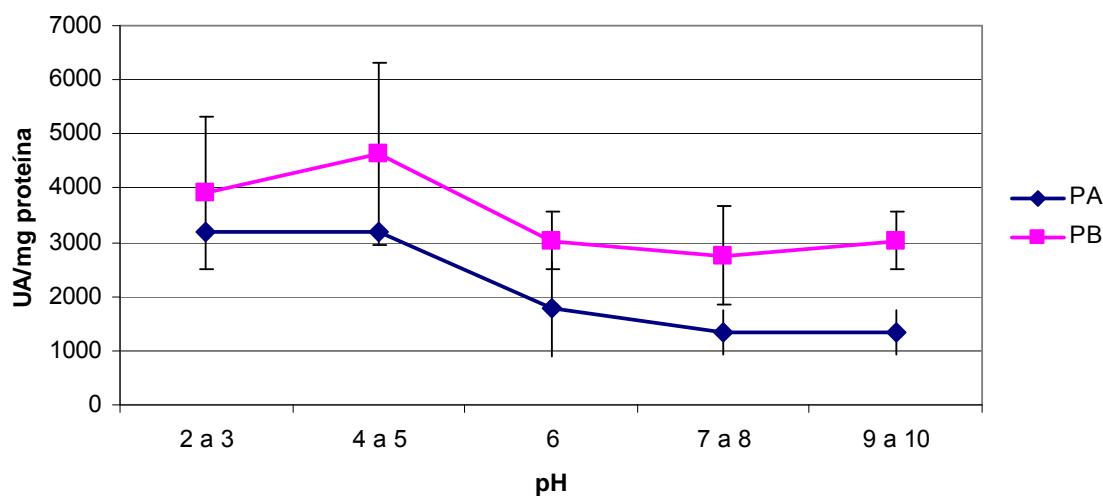


Figura 19. Estabilidad a pH para PA y PB.

7.14 Determinación del pH óptimo del pico A y pico B.

Se determinó el pH óptimo de las lectinas contenidas en PA y PB. Como se observa en la Figura 20, el pH óptimo fue diferente para PA y PB, ya que para PA correspondió al rango de 4-5 con una actividad biológica de 3556 UA/mg proteína mientras que para PB se tuvo una actividad biológica de 1689 UA/mg proteína y un pH óptimo de 6. Esto nos indica nuevamente diferencias entre ambas proteínas, que posiblemente difieran principalmente en su contenido de carbohidratos.

Los resultados obtenidos muestran claramente que la FCL obtenida por cromatografía de exclusión de peso molecular presenta al menos dos poblaciones de proteínas con actividad aglutinante. Las características bioquímicas y moleculares sugieren que las glicoproteínas contenidas en cada población son distintas toda vez que presentan diferencias en sus pesos moleculares, perfiles cromatográficos, secuencias y comportamiento biológico. Estas mismas poblaciones fueron probadas en sistemas biológicos, encontrando diferencias significativas. Al estudiar su capacidad para reconocer diferentes tipos de eritrocitos humanos se encontró que el PA presentó reconocimiento diferencial con mayor afinidad por eritrocitos tipo A mientras que la FCL y PB no presentaron reconocimiento diferencial (García-Santoyo y col., 2009). Lo anterior podría deberse a la presencia de eritro y linfoaglutininas predominantes en una u otra fracción.

Asimismo, el efecto citotóxico sobre células de cáncer de colon HT-29 fue distinto. Las concentraciones inhibitorias 50 y letales 50 fueron, de menor a mayor, PB<FCL<PA, siendo 3 veces menores para PB que para PA (Ángeles, 2010). Lo anterior indica claras diferencias en la actividad biológica de las proteínas contenidas en cada fracción que, seguramente, están vinculadas con su estructura molecular.

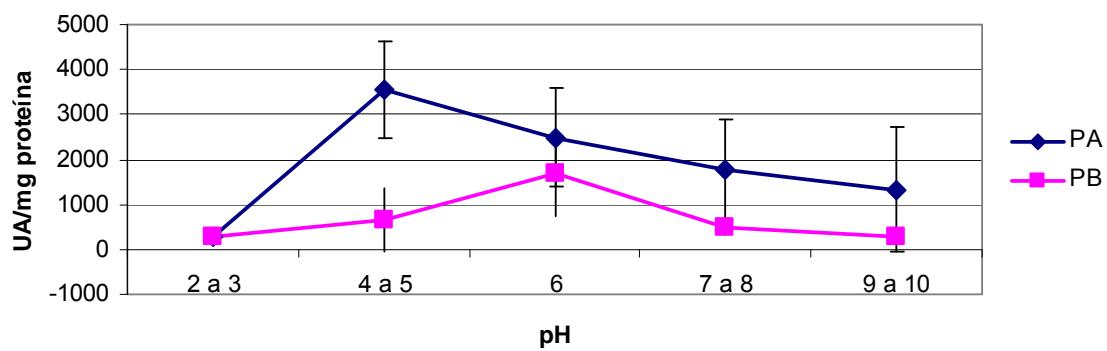


Figura 20. Determinación del pH óptimo de las lectinas contenidas en P A y PB.

VIII. CONCLUSIONES.

Se logró establecer un método reproducible para obtener dos fracciones biológicamente activas (PA y PB) mediante cromatografía de exclusión de peso molecular. Los dos picos principales mostraron tener diferencias en el peso molecular aparente, también mostraron una importante diferencia en el efecto de cationes metálicos, así como en su pH óptimo.

De los datos obtenidos por proteómica se confirman diferencias importantes entre PA y PB. Sin embargo, aún no es posible asegurar que las diferencias correspondan a las lectinas, debido a que no se cuenta con la secuencia *de novo* para cada muestra. Además, queda abierta la posibilidad de que parte de las diferencias encontradas se deban a cambios en los carbohidratos presentes en ellas, por lo que importantes diferencias podrían estar vinculadas a la formación de las unidades más complejas de los carbohidratos que conforman las antenas de las lectinas.

Los resultados obtenidos sugieren que la FCL contiene al menos dos poblaciones de lectinas biológicamente activas no descritas hasta ahora.

IX. PERSPECTIVAS.

Tomando en cuenta la importancia que tiene el poder relacionar las posibles actividades farmacológicas con una estructura de una lectina determinada, resulta importante el continuar los esfuerzos por obtener proteínas más puras a fin de poderlas caracterizar. Resulta de suma importancia determinar su peso molecular exacto, su contenido y estructura de los carbohidratos presentes. Esto permitiría buscar posibles métodos alternos para la obtención de las lectinas, tal vez expresadas en otros organismos, tales como *Pichia* o en *E. coli*. Será importante continuar con los esfuerzos para caracterizar completamente e identificar a la o las lectinas responsables del efecto citotóxico sobre células de cáncer. Lo anterior permitirá avanzar en el estudio de los mecanismos de acción.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aub JC, Tieslau C, Lankester A. 1963. Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides. Proceedings of the National Academy of Sciences.USA 50:613-9

Ángeles Zaragoza MV. 2010. Caracterización del efecto citotóxico de un concentrado de lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células de cáncer de colon (HT-29). Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología. Universidad Autónoma de Querétaro.

Barondes SH. 1981. Lectins: Their multiple endogenous cellular function. Annual Review of Biochemistry 50:207-231

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry . 72:248-254.

Boyd WC, Sharpleigh E. 1954. Specific precipitating activity of plant agglutinins (Lectins). Science. 119:419.

Castañeda Cuevas AL. 2007. Efecto citotóxico de la lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células humanas de cáncer de mama. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Nutrición. Universidad Autónoma de Querétaro.

Castañeda-Cuevas A, Yllescas-Gasca L, López-Martínez J, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A, García-Gasca T. 2007. Efecto Antiproliferativo *In Vitro* de una Lectina De Frijol Tépari sobre Diferentes Tipos de Cáncer Humano. RESPYN Edición especial No. 7. <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007/index.html>

Castillo-Villanueva A, Abdullaev F. 2005. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. Revista de Investigación Clínica 57(1):55-64.

Castillo-Villanueva A, Caballero-Ortega, H. Abdullaev-Jafarova, F. Ganfias, Y. Jiménez-Martínez, M. Bouquelet, S. Martinez, G. Mendoza-Hernandez, G. Zenteno, E. 2007 Lectin from *Phaseolus acutifolius* var. escumite: Chemical Characterization, Sugar Specificity, and Effect on Human T-Lymphocytes. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55:5781-5787.

Chrispeels MJ, Raikhel NV. 1991. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. The Plant Cell 3:1-9.

Czerwinski JH, Leontowicz M, Gralak MA. 2005. Response of rats to a moderate intake of soybean lectin. Journal of Animal and Feed Sciences. 14(suppl 1):537-540

Dabelsteen E. 1996. Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. The Journal of Pathology. 179:358-69

Debouck DG. 1994. *Phaseolus acutifolius*. Plant production and protection series. 26: 47-62. <http://www.hort.purdue.edu/newcorp/1492/beans.html> Última consulta 27 enero 2008

Etzler M. 1985. Plant lectins: Molecular and biological aspects. Annual Review of Plant Physiology. 36:209-234

Fan X, She YM, Bagshaw RD, Callahan JW, Schachter H, Mahuran DJ. 2004. A method for proteomic identification of membranebound proteins containing Asn-linked oligosaccharides. Analytical Biochemistry. 332 (1):178-86

Freeman GF. 1912 Southwestern beans and teparies. Bulletin University Arizona Agricultural Experiment Station. 68:1-55

Gabius HJ, Gabius S. 1997 Glycosciences: status and perspectives. London: Chapman and Hall.

Gabius HJ. 2001. Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: case studies for the mistletoe lectin and galectin-1 *Biochimie*. 83(7): 659-66

Gallily R, Vray B, Stain Y, Sharon N. 1984. Wheat germ agglutinin potentiate uptake of bacteria by murine peritoneal macrophages. *Inmunology*. 52:679-686

García Gasca MT. 2002. Efectos biológicos de una fracción proteínica de frijol Tépari con actividad antiproteolítica y citoaglutinante sobre fibroblastos murinos transformados. Tesis de doctorado. Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC). Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

García-Santoyo, V., Mendiola-Olaya E., Blanco-Labra A., García-Gasca, T. 2009. Afinidad de fracciones concentradas de lectinas de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) por eritrocitos humanos. http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias2009/11VCRC_46/0_Garcia_SantoyoV.pdf

Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. 1980. What should be called a lectin?. *Nature*. 285: 66.

González de Mejía E, Hankins CN, Paredes-López O, Shannon ML. 1989. The lectins and lectin-like proteins of tepary beans (*Phaseolus acutifolius*) and tepary-common bean (*Phaseolus vulgaris*) hybrids. *Journal of Food Biochemistry*: 14:117-126

Gonzalez de Mejia E, Prisecaru VI. 2005. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. *Critical Food Science and Nutrition* 45(6):425-445

González de Mejía E, Valadez-Vega M, Reynoso-Camacho R, Loarca-Pina G. 2005. Tannins, trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in tepary (*Phaseolus*

acutifolius) and common (*Phaseolus vulgaris*) beans. Plant Foods for Human Nutrition 60:137-145

Guillot J, Guerry M, Konska G, Caldefie-Chezet F, De Latour M, Penault-Llorca F. 2004. Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas. Bull Cancer 91(2):141-58

Hara T, Mukunoki Y, Tsukamoto I, Miyoshi M, Hasegawa K. 1984. Susceptibility of Kintoki bean lectin to digestive enzymes *in vitro* and its behavior in the digestive organs of mouse *in vivo*. Journal of Nutrition Science and Vitaminology 30(4):381-94

Hernández Cruz P, Pérez Campos E, Martínez Martínez L, Ortiz B, Martínez G. 2005. Las lectinas como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato Revista de Educación Bioquímica. 24(1):21-27

Hernández Díaz P, Martín González O, Rodríguez de Pablos Vélez Y, Ganem Báez F. 1999. Aplicaciones de las lectinas. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 15(2):91-95.

Hernandez-Rivera, E., Mendiola-Olaya, E., Blanco-Labra, A., Garcia-Gasca, T. 2007. Efecto Citotóxico Diferencial de una Fracción Rica en Lectinas de Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre Células Cancerígenas. RESPYN Edición especial No. 7 <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007/index.html>

<http://www.iqfr.csic.es/Mabio> Última consulta Agosto 2007

http://www.juliet.med.jhmi.edu/~bianchet/lectin_dimer.jpg. Última consulta Agosto 2007

<http://blast.wustl.edu> Última consulta enero, 2009

Idouraine A, Yensen S. 1991. Tepary bean flour, albumin and globulin fractions functional properties compares with soy protein isolate. *Journal of Food Science*. 56:1316-1318.

Intriago-Ortega MP. 1985. Aislamiento y parcial caracterización de las principales proteínas de semillas de frijol de las especies *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus acutifolius* y *Phaseolus coccineus*. Tesis de Licenciatura en Biología. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza. UNAM.

Jaffé W. 1980. Hemagglutinins (lectins). In: *Toxic constituents of plant foodstuffs*. Academic Press. New York, NY, EU: 73-102.

Janzen DH, Juster HB, Liener IE. 1976. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. *Science* 192:795-796.

Jordinson, M., El-Harury, I., Calnan, D., Calam, J. y Pignatelli, M. 1999. *Vicia faba* agglutinin, the lectin present in broad beans, stimulates differentiation of undifferentiated colon cancer cells. *Gut* 44:709-714

Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N. 2004. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Science*. 95(5):377-84

Kobata A. 1998. A retrospective and prospective view of glycopathology. *Glycoconjugates Journal*. 15: 323-31.

Lajolo F, Genovese M. 2002. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 50:6592-6598.

Liener IE. 1976. Phytohemagglutinins. *Annual Review of Plant Physiology*. 27:291-319.

Lis H, Sharon N. 1986. Lectins as molecules and as tools. Annual Review of Biochemistry. 55:35-67

Lis H, Sharon N. 1998. Lectins: Carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition. Chemical Reviews. 98:637-674.

López Martínez FJ. 2007. Efecto de la lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre la proliferación y sobrevivencia de células cancerigenas de colon. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología. Universidad Autónoma de Querétaro.

López Sánchez C. 2008. Estudio sobre la toxicidad aguda y subcronica via oral de una lectina de frijol tépari. Tesis para obtener el grado de Maestría en Nutrición Humana. Universidad Autónoma de Querétaro.

López-Sánchez C, López-Martínez FJ, Castañeda-Cuevas AL, Yllescas-Gasca L, Ferriz-Martínez RA, Torres-Arteaga IC, Gallegos-Corona MA, Rodríguez-Méndez AJ, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A, García-Gasca T. 2010. Evaluación de la Toxicidad *In Vitro* e *In Vivo* de Lectinas de Frijol Tépari. Revista Ciencia@UAQ. En prensa

Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns M. 1998. Legume lectin structure. Biochim Biophys Acta. 1383(1):9-36.

Mákela O. 1957. Studies on hemmagglutinins of leguminosae seeds. Annales Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae. Supplementum. 11:1-156

Merrit EA, Sarfaty S, Vander Akker F, L'Hoir C, Martial JA, Hol WGJ. 1994. Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. Protein Science 3:166-175

Mialonier G, Privat JP, Monsigny M, Kahlen G, Durand R. 1973. Plant Lectins: Molecular and Biological Aspects. Physiologie Vegetale. 11:519-37

Mirkov TE, Wahlstrom JM, Hagiwara K, Finardi-Filho F, Kjemtrup S, Chrispeels MJ. 1994. Evolutionary relationships among proteins in the phytohemagglutinin-arcelin-alpha-amylase inhibitor family of the common bean and its relatives. Plant Molecular Biology. 26:1103-1113

Nahban G.P. y Teiwes H. 1983. Tepary beans, O'odham farmers and desert fields. Desert Plants 5(1):15-37.

Nakata S, Kimura T. 1985. Effect of ingested toxic bean lectins on the gastrointestinal tract in the rat. Journal of Nutrition: 115(12):1621-9

Osman M, Reid P, Weber Ch. 2003. The effect of feeding Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) proteinase inhibitors on the growth an pancreas of young mice. Pakistan Journal of Nutrition 2(3):111-115

Peumans WJ, Van Damme EJM. 1995. Lectins as plant defense protein. Plant Physiology. 109:347-352.

Pueppke SG, Bauer, WD. 1978. Role of lectin in plant microorganism interactions II. Distribution of soybean lectin in tissues of glycine max (L) Merr. Plant Physiology. 61:779-784.

Pratt R C, Singh NK, Shade RE, Murdock LL, and Bressan RA. 1990 Isolation and Partial Characterization of a Seed Lectin from Tepary Bean that Delays Bruchid Beetle Development. Plant Physiology. 93, 1453-1459

Pusztai A, Watt W B and James C. Stewart 1987 Erythro-and lymphoagglutinins of *Phaseolus acutifolius*. Phytochemistry. 26 (4):1009-1013

Pusztai A, Bardocz S. 1996. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. Trends Glycosilation and Glicotechnology. 8:149-165

Reynoso-Camacho R, González de Mejía E, Loarca-Piña G. 2003. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). Food and Chemical Toxicology. 41:21–27

Rhodes JM. 1999. Beans means lectins. Gut. 44(5):593-594.

Rodriguez MV, Riquelme B, Valverde J, Gattuso S. 2004. Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las fabaceas sobre los eritrocitos humanos mediante el análisis de imágenes. Anales AFA. 16: 247-248. <http://www.unicen.edu.ar/crecic/analesafa/vol16/f9-247-248.pdf>

Rudinger H, Rouge P. 1998. Structure and Function of plant Lectin. Carbohydrate Eur 23:16-22

Scheerens JC, Tinsley AM, Abbas IR, Weber CW, Berry JW. 1983. The nutritional significance of tepary bean consumption. Desert Plants 5:11.

Shagger H, Von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry . 166:368-379.

Sharon N. 1984 Lectins: their multiple endogenous cellular functions. Annual Review of Biochemistry. 50:207-175

Sharon N. 1996. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. Trends in Biochemistry. Sci. 18:221-226.

Sharon N, Lis H. 1972. Lectins: cell agglutinating and sugar-specific proteins. Science. 177:947-959.

Sharon N, Lis H. 1990. Legume lectins--a large family of homologous proteins. FASEB J. 1990 Nov;4(14):3198-208.

Sharon N, Lis H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 14:53R-62R

Tareq al-Ati. 2001. Plant lectins. Poisonous Plants Homepage: Animal Science at Cornell University. <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/lectins.html>
Última consulta Septiembre 2008.

Thomas CV, Waines JG. 1984. Fertile backcross and allotetraploid plant from crosses between tepary beans and common bean. *Journal of Heredity*. 75:93–98.

Toscano MA, Ilarregui JM, Bianco GA, Rubinstein N, Rabinovich GA. 2006. Interacción entre proteínas y glicanos en la regulación fisiológica de las células, Medicina Buenos Aires. Universidad de Buenos Aires. 66:357-362

Turner RH, Liener IE. 1975. The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. *Analytical Biochemistry* . 68:651-653.

Valadez-Vega, M., Riverón, L., Abdullaev, F., Alvarez, G., y Garcia, A. 2007. Efecto antitumoral de lectinas de frijol sobre células cancerosas SW480. RESPYN Edición especial No. 7.

<http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007/index.html>

Vargas-Albores F, de la Fuente G, Agundis C, Córdoba F. 1987. Purification and characterization of a lectin from Phaseolus acutifolius var. latifolius. *Preparative Biochemistry*, 17(4), 379-396

Walker MJ. 1994. Methods in Molecular Biology. Basic protein and peptide protocols. Vol. 32 pp 120-126.

Wang M, Triguéros V, Paquereau L, Chavant L, Fournier D. 2002. Proteins as active compounds involved in insecticidal activity of mushroom fruitbodies. *Journal of Economic Entomology*. 95:603-607.

Weis WI, Drickamer K. 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. Annual Review of Biochemistry. 65:441-473.

Yllescas Gasca L. 2006. Efecto de las lectinas de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células de cáncer de cuello uterino. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Nutrición. Universidad Autónoma de Querétaro.