

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL CONTRA
UNA LECTINA BIOACTIVA DE FRIJOL TÉPARI (*Phaseolus
acutifolius*)”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ITZEL ZAMORA AVILÉS

DIRIGIDA POR

Dra. TERESA GARCÍA GASCA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2012.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL CONTRA
UNA LECTINA BIOACTIVA DE FRIJOL TÉPARI (*Phaseolus
acutifolius*)”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ITZEL ZAMORA AVILÉS

DIRIGIDA POR

Dra. TERESA GARCÍA GASCA

SINODALES

**Dra. TERESA GARCÍA GASCA
(DIRECTORA)**

**Dr. ALEJANDRO BLANCO LABRA
(SINODAL)**

**Dr. JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO
(SINODAL)**

**Dra. ADRIANA JHENY RODRÍGUEZ MÉNDEZ
(SINODAL)**

**Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ
(SINODAL)**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro a cargo de la Dra. Teresa García Gasca.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Cáncer	3
2.2 Lectinas y sus funciones	3
2.3 Clasificación de las lectinas	4
2.4 Estructura de las lectinas	5
2.5 Lectinas y su afinidad a carbohidratos	7
2.6 Lectinas y células cancerígenas	9
2.7 Toxicidad de las lectinas	10
2.8 Lectinas del frijol tépari (<i>Phaseolus acutifolius</i>)	11
2.9 Anticuerpos y antígenos	14
2.10 Anticuerpos policlonales y monoclonales	16
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	20
4.1 General	20
4.2 Específicos	20
V. METODOLOGÍA	21
5.1 Materiales	21
5.1.1 Material biológico	21
5.1.2 Reactivos	21
5.2 Métodos	22
5.2.1 Preparación de las muestras (FCL, PA y PB)	22
5.2.2 Cuantificación de proteínas y geles de electroforesis nativa y desnaturalizante	22

5.2.3 Tinción con plata	22
5.2.4 Tinción de membrana con reactivo de Schiff-ácido peryódico (PASS)	23
5.2.5 Renaturalización-reoxidación de proteínas	23
5.2.6 Determinación de actividad aglutinante en placa de 96 pozos	23
5.2.7 Producción del anticuerpo	24
5.2.8 Dot-Blot previo a las inmunizaciones	25
5.2.9 Dot-Blot para B1 y B2	26
5.2.10 Análisis estadístico	26
VI. RESULTADOS	27
6.1 Cuantificación de proteína	27
6.2 Geles de electroforesis nativos	27
6.3 Geles de electroforesis desnaturalizantes	27
6.4 Obtención del extracto proteico de las 2 bandas en Pico B	29
6.5 Bot-Blot para B1 y B2	29
6.6 Concentración de proteína en B1 y B2	30
6.7 Actividad aglutinante en B1 y B2	30
6.8 Tinción con azul de coomassie y tinción con plata de B1 y B2	31
6.9 Obtención del anticuerpo	31
VII. DISCUSIÓN	35
VIII. CONCLUSIÓN	37
IX. BIBLIOGRAFÍA	38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Lectinas vegetales utilizadas para el estudio de glicoproteínas y su clasificación según su especificidad hacia monosacáridos	5
2	Ejemplos de técnicas inmunológicas y sus sistemas de detección	16
3	Anticuerpos monoclonales aprobados en la terapia de tumores sólidos	18
4	Concentración de proteína mediante una curva patrón de proteína, empleando albúmina sérica bovina (ASB)	27
5	Concentraciones de proteína en B1 y B2 obtenidas de acuerdo a la regresión lineal y a los cálculos realizados al obtener las ecuaciones	30
6	Actividad aglutinante de B1 y B2 una vez renaturalizada la muestra	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura tridimensional de <i>Dioclea guianensis</i> y <i>Dioclea grandiflora</i>	6
2	Organización oligomérica de diversas lectinas que se unen a manosa	7
3	Detección de glicoconjugados específicos de frutalina en secciones de tejido de próstata humana por inmunohistoquímica	10
4	Marcaje con DAPI en células pancreáticas después de la exposición con aglutinina de germen de trigo (WGA)	12
5	Grano de frijol tépari (<i>Phaseolus acutifolius</i>)	12
6	Estructura básica de un anticuerpo	15
7	Gel de electroforesis nativo al 5%.	28
8	Gel al 12% corrido bajo condiciones desnaturalizantes	28
9	Membrana de nitrocelulosa resultante del Dot-Blot	30
10	Gel de electroforesis desnaturalizante al 12% teñido con azul de coomassie	31
11	Gel de electroforesis desnaturalizante al 12% teñido con plata	32
12	Dot- Blot para Anti-B1 y para Anti-B2 en una concentración 1:500 contra las muestras de los sangrados realizados durante las inmunizaciones (S1, S2, S3, S4 y S5)	32
13	Dot-Blot para Anti-B1 en una concentración 1:200, 1:500 y 1:1000 contra FCL, PB, ASB, B1 y B2	33
14	Dot-Blot para Anti-B2 en una concentración 1:200, 1:500 y 1:1000 contra FCL, PB, ASB, B1 y B2	33
15	Membrana resultante del Dot Blot para Anti- B1 en una concentración 1:500 contra diluciones de FCL (1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 y 1:16), ASB, B1 y B2	34

16	Membrana resultante del Dot-Blot para Anti-B2 en una concentración 1:500 contra diluciones de FCL (1:1 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16), así como ASB, B1 y B2.	34
----	--	----

RESUMEN

Las lectinas son glicoproteínas que reconocen de forma específica a oligosacáridos de membrana celular. Algunas lectinas vegetales presentan actividad citotóxica contra células de cáncer de forma diferencial. En nuestro laboratorio se ha determinado que una fracción concentrada en lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) presenta efecto citotóxico diferencial sobre diversas líneas celulares de cáncer humano. Sin embargo, como parte de las técnicas necesarias para su identificación en los sistemas biológicos utilizados en los estudios contra cáncer, resultan necesarias técnicas inmunológicas y no existen anticuerpos específicos contra lectinas de frijol tépari. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue la producción de un anticuerpo capaz de reconocer la lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*). A partir de una fracción concentrada de lectinas de frijol tépari (FCL) obtenida por cromatografía de exclusión de peso molecular, se purificó la proteína mediante electroforesis desnaturizante y se renaturalizó. Una vez obtenida la proteína con actividad aglutinante se inoculó a conejos Nueva Zelanda con la finalidad de obtener anticuerpos policlonales anti-lectina de frijol tépari, los cuales se purificaron y sometieron a títulos de anticuerpos mediante Dot-Blot. Se obtuvieron dos anticuerpos, Anti-B1 y Anti-B2, en los sueros de las conejas inmunizadas. En ambos casos las concentraciones que mejores resultados arrojaron fueron 1:200 y 1:500 y al emplear los anticuerpos en una concentración 1:1000 se logran resultados casi imperceptibles. Los anticuerpos pudieron evidenciar la presencia de proteínas en las fracciones usadas, en diluciones que van de 1:1 hasta 1:16 al ser empleados en una concentración 1:500.

Palabras clave: anticuerpos, frijol tépari, lectina, *Phaseolus acutifolius*.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las cuales se da un aumento en el número de células más allá de los valores normales. En la búsqueda de nuevas alternativas para tratar cáncer se han estudiado nuevas terapias que emplean fitoquímicos, entre ellos las lectinas. Éstas son glicoproteínas de origen no inmune que reconocen moléculas de la superficie celular uniéndose principalmente a carbohidratos. Se encuentran en la mayoría de los organismos incluyendo animales, plantas, hongos, bacterias y virus. En plantas se localizan principalmente en los cotiledones y endospermos de semillas y entre sus funciones destacan la regulación fisiológica, estimulación mitogénica, defensa contra el ataque de microorganismos, almacenamiento de proteínas, transporte de carbohidratos, entre otras. Las lectinas de leguminosas presentan efectos sobre células animales, como la aglutinación de linfocitos, eritrocitos, espermatozoides, plaquetas, bacterias y células tumorales.

Diversos estudios muestran que lectinas vegetales son capaces de provocar la muerte de células cancerígenas debido a la interacción entre los patrones de glicosilación de las células cancerígenas y los carbohidratos unidos a la lectina. Ejemplos de ello son la Conavalina A (Con A) y la aglutinina de germen de trigo (WGA), las cuales interaccionan con las células cancerígenas induciendo apoptosis, citotoxicidad e inhibición en el crecimiento de los tumores.

Phaseolus acutifolius es una especie de frijol poco común ya que crece en zonas áridas y semiáridas, además de ser resistente a concentraciones muy altas de sal y poca disponibilidad de agua y, asimismo, presenta tolerancia a plagas de insectos y microorganismos. Este frijol, conocido como tépari, contiene lectinas con actividad citotóxica diferencial. En nuestro laboratorio se ha mostrado que una fracción concentrada de lectina (FCL) de frijol tépari obtenida mediante cromatografía de exclusión de peso molecular presenta efecto citotóxico diferencial sobre células transformadas respecto a su contraparte normal y sobre células de diferentes tipos de cáncer humano como las de cáncer de mama (MCF-7 y ZR-75), cérvico uterino

(HeLa, SiHa y C33A) y colon (CaCo2 y HT-29). El mecanismo de acción apunta a que la muerte celular está relacionada con la inducción de apoptosis. Estudios en curso sugieren que la administración intragástrica de la FCL a animales de laboratorio reduce el número de tumores.

Estudios sobre las características e identidad de la o las glicoproteínas bioactivas han mostrado que la FCL presenta dos sub-poblaciones (Pico A y Pico B) que presentan reconocimiento por diferentes tipos de sangre humana. Por un lado, la fracción conocida como PA es más afín a eritrocitos tipo A+ y, por el otro, la fracción conocida como PB no mostró un reconocimiento diferencial sobre eritrocitos humanos de diferentes tipos. No obstante, al caracterizar el efecto citotóxico de la FCL se encontró que las sub-fracciones PA y PB presentaron efecto citotóxico sobre células de cáncer de colon en función de la concentración, siendo el PB la fracción más efectiva, lo que sugiere que las lectinas citotóxicas se concentran en PB.

Para continuar con los estudios sobre su mecanismo de acción es necesario detectar a la glicoproteína bioactiva. Una de las estrategias es el uso de técnicas inmunológicas, las cuales emplean anticuerpos policlonales. Para ello se purificaron las dos principales bandas de glicoproteínas bioactivas a partir del PB y se inocularon conejos hembra Nueva Zelanda para la obtención, purificación y titulación de los anticuerpos.

II. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer es un padecimiento multifuncional producido por cambios en las células. Debido a estas alteraciones, las células cancerosas proliferan de forma autónoma generando tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva, destruyendo tejidos y órganos normales (Karp, 1996). Es el mayor problema de salud en países como Estados Unidos y en lo que va del 2012, han surgido 1,638,910 nuevos casos de cáncer y 577,190 personas han muerto siendo los de mayor incidencia el de pulmón, colon, mama y próstata (Siegel y col., 2012).

Debido a su impacto sobre la salud humana, el cáncer ha sido foco de esfuerzos intensos de investigación durante décadas y, aunque se ha logrado un gran avance en el estudio molecular y celular, aún no se ha logrado obtener una cura como tal. Por lo anterior, los esfuerzos se han concentrado en buscar terapias a partir de compuestos activos que puedan combatir dicho padecimiento (Karp, 1996).

2.2 Lectinas y sus funciones

Las plantas contienen un gran número de compuestos activos capaces de modular la iniciación, promoción o progresión del cáncer, entre dichos compuestos se encuentran las lectinas (Abdullaev y González de Mejía, 1997). Éstas son glicoproteínas de origen no inmune contenidas en todos los organismos como los vertebrados, invertebrados, bacterias y virus (Sharon y Lis, 1998). Son capaces de reconocer de manera específica carbohidratos de la superficie celular o en suspensión, aglutinar células y precipitar glicoconjugados, comúnmente las lectinas no poseen actividad enzimática (Hernández y col., 2005).

En las plantas, las lectinas tienen funciones como la regulación fisiológica, defensa contra el ataque de microorganismos, transporte de carbohidratos, estimulación mitogénica, reconocimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium*, entre otras. Las lectinas de plantas tienen estructuras variables y

ejercen efectos biológicos sobre células animales los cuales dependen de la planta de la cual proceden. Así entonces, las lectinas pueden ser antitumorales, inmunomoduladoras, anti-insectos, anti fúngicas, antibacteriales, anti-HIV y mitogénicas (Sharma y col., 2008; Ferriz-Martinez y col., 2010). Las lectinas vegetales pueden resistir la digestión y sobrevivir al tracto digestivo, se pueden unir a las células gastrointestinales o entrar a circulación de forma intacta y mantener su actividad biológica (González de Mejía y Prisecaru, 2005).

2.3 Clasificación de las lectinas

Debido a su diversidad, el clasificar a las lectinas es todo un reto. Arason (1996) propuso una clasificación dividiendo a las lectinas en 6 familias basándose en comparaciones de los dominios de reconocimiento de los carbohidratos (CRD, por sus siglas en inglés) teniendo así: (1) lectinas de leguminosas, (2) lectinas de cereal, (3) lectinas tipo P, (4) lectinas tipo S, (5) lectinas tipo C y (6) pentraxinas. Las primeras 2 provienen de plantas mientras las demás de animales. Otra clasificación es la de Van Damme y col. (2004) quienes las clasificaron en 7 familias basándose en sus CRD. Dichas familias son: amarantinas, lectinas de floema de cucurbitáceas, lectinas de leguminosas, lectinas con dominio heveína, lectinas relacionadas a jacalina, lectinas de unión a manosa de monocotiledóneas y proteínas inactivadoras de ribosoma tipo 2. Sin embargo, la clasificación de las lectinas sigue en desarrollo debido a las nuevas secuencias y datos funcionales obtenidos constantemente (De Holff y col., 2009).

Otra clasificación se basa en la especificidad hacia el monosacárido que inhibe su actividad hemaglutinante y hacia las estructuras oligosacáridicas que reconocen (Cuadro 1). Así, se clasifican en lectinas que reconocen N-glicanos (oligosacáridos unidos a un residuo de asparagina en las proteínas mediante una N-acetil-glucosamida) y lectinas que reconocen O-glicanos (oligosacáridos unidos a un residuo de serina o treonina en las proteínas mediante una N-acetil-galactosamina) (Hernández y col., 2005).

Cuadro 1. Lectinas vegetales utilizadas para el estudio de glicoproteínas y su clasificación según su especificidad hacia monosacáridos (Hernández y col., 2005).

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

2.4 Estructura de las lectinas

Todas las lectinas de leguminosas pueden formar dímeros o tetrámeros y presentan variación en la estructura así como en el modo en que éstos se asocian entre sí. La actividad biológica de las lectinas de leguminosas depende por la disposición relativa de los lugares de unión a azúcares en la estructura oligomérica. Estudios de difracción de rayos X han demostrado que, en la lectina *Dioclea guianensis*, la sustitución de una histidina por una asparagina en la posición 3 impide la formación de la red de interacciones que estabilizan la conformación de los bucles de la cavidad central. El número reducido de contactos entre los dímeros de *Dioclea guianensis* respecto a *Dioclea grandiflora* explica la existencia del equilibrio entre las conformaciones dimérica y tetramérica (Figura 1) (Gallego del Sol y col., 2006).

La caracterización de estructuras primarias, isoformas y modelos moleculares de lectinas, resultan ser un campo de investigación muy activo dentro de la ciencia debido a que algunas lectinas están compuestas de subunidades con diferentes

sitios de unión. En la Figura 2 se observa la organización oligomérica de las lectinas, tal es el caso de aquellas encontradas en plátano y arroz. La forma exacta del sitio de unión y la naturaleza de los residuos de aminoácidos en la lectina a la cual los carbohidratos se unen determina su especificidad, incluso pequeños cambios en la estructura de los sitios de unión resultan en cambios significativos en la especificidad y actividad biológica (González de Mejía y Prisecaru, 2005).

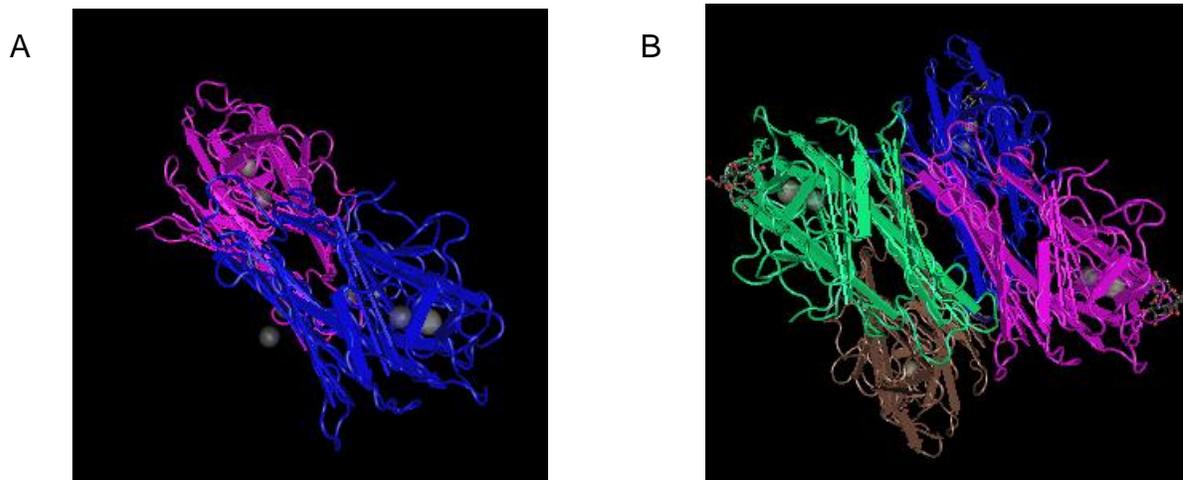


Figura 1. Estructura tridimensional de (A) *Dioclea guianensis* (Wah y col., 2001) y (B) *Dioclea grandiflora* (Rozwarski y col., 1998).

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 a dos cadenas, las cuales 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. 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).

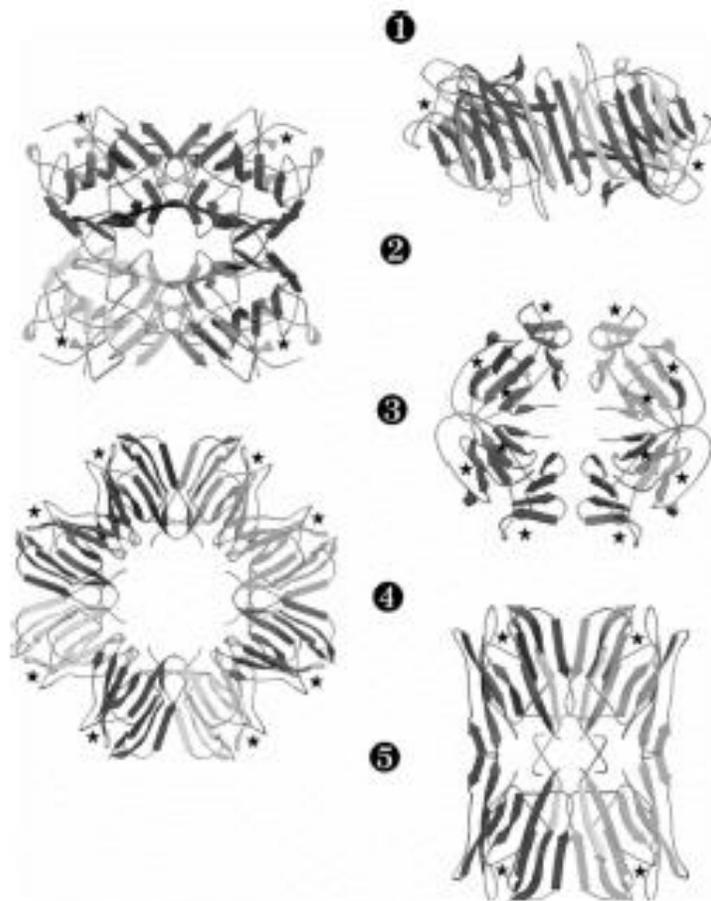


Figura 2. Organización oligomérica de diversas lectinas que se unen a manosa. Los asteriscos (*) indican los sitios de unión a monosacáridos (1) Dímero de *Lathyrus ochrus*, (2) Tetrámero de Con. A, (3) Tetrámero de *Galanthus nivalis*, (4) Octámero de *Helianthus tuberosus*, (5) Tetrámero de Jacalina (González de Mejía y Prinsecaru, 2005).

2.5 Lectinas y su afinidad a carbohidratos

Aunque las lectinas son proteínas de origen no-inmune se unen a carbohidratos de forma reversible y también pueden aglutinar células, así como precipitar polisacáridos o glicoconjugados. Su habilidad para unirse a carbohidratos es mayor hacia estructuras más complejas que a estructuras simples. Los carbohidratos pueden interactuar con las lectinas a través de puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, uniones metálicas e interacciones hidrofóbicas. Los resultados de unión específicos de puentes de hidrógeno y uniones metálicas se dan a través de hidroxilos presentes en carbohidratos, los cuales pueden actuar como aceptores y donadores de puentes de hidrógeno. Las moléculas de agua con frecuencia son el

punto de dichas interacciones, el hidroxilo en la posición C4 tiene un papel principal en este tipo de eventos. El sitio de unión primario entre los carbohidratos y las lectinas es crítico para el reconocimiento de los carbohidratos, los sitios secundarios contribuyen a potenciar la afinidad de la lectina hacia los oligosacáridos específicos (Komath y col., 2005).

Los glicoconjugados 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; Kannagi y col., 2004). Tales interacciones son también importantes en la tumorigénesis, progresión del tumor y metástasis (Kannagi y col., 2004). Además, las glicoproteínas de la superficie celular tienen diferentes funciones entre las que destacan: diferenciación celular, adhesión, proliferación, cambios morfológicos y modulación funcional. Sin embargo, el papel principal de las glicosilaciones reside en determinar y establecer el plegamiento de las proteínas, a su vez modificando las propiedades fisicoquímicas y determinando la inmunogenicidad celular (González de Mejía y Prisecaru, 2005).

Dichas propiedades se han aprovechado en la caracterización de diversos grupos sanguíneos, también han sido usados como matrices para el aislamiento, purificación y caracterización de glicoproteínas y glicopéptidos. De la misma manera, se han empleado como sondas para detección de oligosacáridos *in situ*, en caracterizaciones histológicas, histoquímicas e inmunológicas. También han servido para la tipificación de células y bacterias, fraccionamiento de linfocitos y células de médula ósea. Otra de sus aplicaciones es la estimulación de linfocitos y el análisis de cromosomas en citogenética humana. Debido a la relación que tienen con la membrana celular, se les ha empleado para estudiar los cambios en la superficie celular durante los procesos fisiológicos y patológicos, tales como la diferenciación celular y como marcadores para el diagnóstico de cáncer (Valadez-Vega y col., 2007).

2.6 Lectinas y células cancerígenas

Numerosos estudios sugieren que las células cancerígenas presentan patrones de glicosilación alterados, los cuales pueden ser detectados por lectinas mediante ensayos de histoquímica. El cáncer es un proceso complejo en el cual existen cambios en la proliferación, patrones de adhesión y la migración juega un importante papel en la tumorigénesis y metástasis. La proteólisis de la matriz extracelular y las proteínas de la superficie producen cambios cruciales en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Las nuevas señales generadas provenientes de la superficie celular pueden afectar la expresión de genes e influenciar en el comportamiento celular. Las células transformadas pierden la propiedad de adherirse y como consecuencia, varias moléculas asociadas a la superficie celular cambian sus funciones y promueven el crecimiento, la movilidad, degradación de la matriz extracelular y metástasis (DeClerck y col., 2004).

Las lectinas pueden unirse a la membrana celular a través del reconocimiento de glicoconjugados específicos, resultando en cambios de la función celular. Diferentes estudios han mostrado una fuerte correlación entre ciertos modelos de unión de lectina y su activación biológica en tumores. Las lectinas de leguminosas inhiben la adhesión celular, la proliferación y formación de colonias. Particularmente las lectinas tienen propiedades anticancerígenas *in vitro* e *in vivo* debido a la unión de proteínas a la membrana celular o receptores de células cancerígenas causando toxicidad, apoptosis e inhibición en el crecimiento del tumor (Kiss y col., 1997; González de Mejía y Prisecaru, 2005; Ferriz-Martínez y col., 2010). Por ejemplo, las lectinas han mostrado habilidad para reconocer células de cáncer de próstata (Figura 3) (Malagolini y col., 2008; Oliveira y col., 2009).

La ingestión de lectinas afecta al sistema inmune alterando la producción de varias interleucinas o activando algunas cinasas. Las lectinas pueden unirse a los ribosomas e inhibir la síntesis de proteínas así como modificar el ciclo celular induciendo la acumulación de mecanismos no apoptóticos en la fase G1, arresto

celular y apoptosis en G2/M, también pueden activar la vía de las caspasas. Así mismo las lectinas también pueden regular la actividad telomerasa e inhibir la angiogénesis (González de Mejía y Prisecaru, 2005).

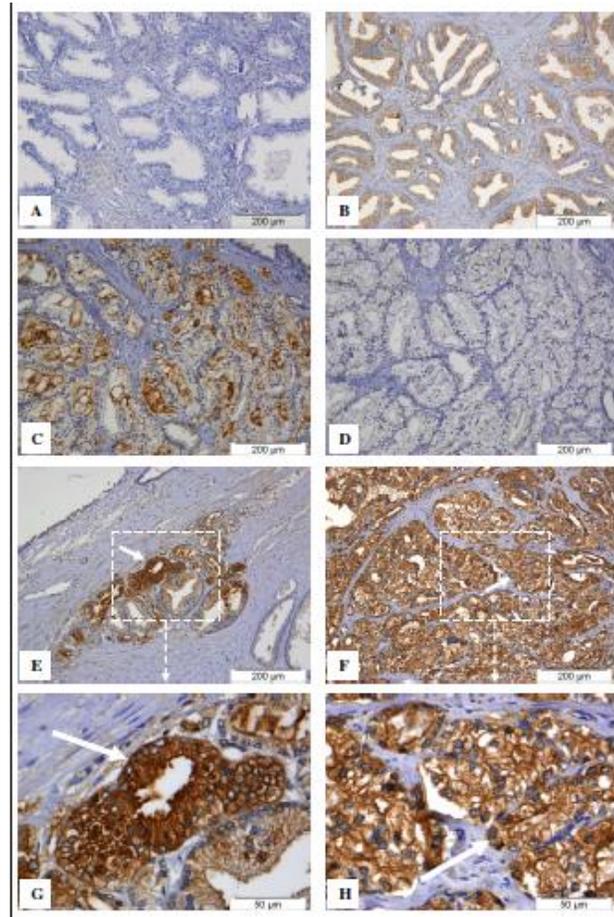


Figura 3. Detección de glicoconjugados específicos de frutalina en secciones de tejido de próstata humana por inmunohistoquímica. Muestras de tejido benigno de hiperplasia en próstata (A y B) y carcinoma (C-H) (Oliveira y col., 2009).

2.7 Toxicidad de las lectinas

Debido a su naturaleza proteínica, algunas lectinas presentan toxicidad. Lectinas purificadas de frijoles o de soya afectan el crecimiento de ratas e inducen alargamiento del intestino delgado dañando al epitelio, estimulando hipertrofia e hiperplasia del páncreas. La lectina de frijol común (PHA) tiene influencia en el tamaño, metabolismo y función del tracto gastrointestinal entero de las ratas, induciendo crecimiento del intestino delgado de forma dependiente en la dosis y

tiempo, incrementando el número de células de las criptas, además de producir hipertrofia del intestino grueso y del páncreas (Lajolo y Genovese, 2002). Además, las lectinas de leguminosas pueden interferir reduciendo el crecimiento celular o interferir con la absorción de nutrientes, así algunas lectinas son letales si se ingieren en altas concentraciones (Reynoso y col., 2003).

En los últimos años se ha estudiado la toxicidad que algunas lectinas tienen sobre células de cáncer y los patrones de unión entre la célula y la lectina en células normales y cancerígenas. Se ha encontrado que las células de cáncer de colon humano CCL-220/Colo320 DM se unen a camas de agarosa con aglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) y de germen de trigo (WGA), mientras que las células normales CRL-1459/CCD-18Co no lo hacen (Heinrich y col., 2005). Las lectinas de germen de trigo son altamente tóxicas para las células de carcinoma de páncreas humano, provocando la concentración de la cromatina, la fragmentación nuclear y la liberación de DNA (Figura 4), lo cual es consistente con la apoptosis (Schwarz y col., 1999). Por otro lado, se ha encontrado también que las células cancerígenas de estroma humano tratadas con lectinas presentan mayor adhesión al sustrato a diferencia de las que no son tratadas (Nishimura y col., 2004), lo que habla de la selectividad que presentan las lectinas hacia diversas líneas celulares de cáncer.

2.8 Lectinas del frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*)

Phaseolus acutifolius (Figura 5) se ha cultivado desde hace mucho tiempo en Mesoamérica, se siembra en la orilla de las milpas al inicio de las lluvias, o en las casas en casi cualquier época. Las vainas se cosechan al alcanzar la madurez y se dejan secar al sol, una semana después se recoge el grano y finalmente se conservan en canastos o vasijas de barro. Se puede alcanzar un rendimiento aceptable con menos de 400 mm de precipitación anual a diferencia de otras legumbres (Debouk, 1994).

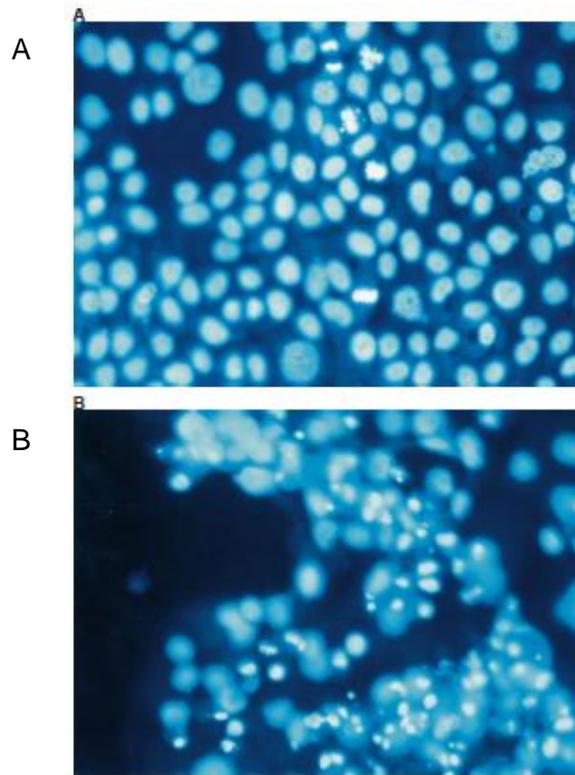


Figura 4. Marcaje con DAPI en células pancreáticas después de la exposición con aglutinina de germen de trigo (WGA). Marcaje con DAPI revela la condensación de cromatina en la línea celular BxPC antes (A) y después (B) de la exposición de 20 mg/mL de WGA. (Schwarz y col., 1999).



Figura 5. Grano de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*).

Lectinas de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) han mostrado tener efecto sobre la proliferación y sobrevivencia de células cancerígenas. En un trabajo llevado a cabo por Hernández y col. (2007) se demostró que una fracción rica en lectina de frijol tépari fue capaz de inducir muerte celular en fibroblastos transformados de ratón

3T3/v-mos mediante algún mecanismo distinto a necrosis, posiblemente apoptosis. Además, la fracción rica en lectina presentó un efecto diferencial respecto a las células normales (3T3) y las cancerígenas, siendo las células cancerígenas 8 veces más sensibles que las normales. De la misma manera, las células de cáncer de mama (MCF-7 y ZR-75), cérvico-uterino (HeLa, SiHa y C33A) y colon (CaCo2) mostraron inhibición en la proliferación celular al ser tratadas con una fracción de lectina semi-pura, siendo en este caso las células de colon las más afectadas (10 veces más sensibles que las células de mama y 100 veces más que las de cérvix) (Castañeda-Cuevas y col., 2007; López-Sánchez y col., 2010). Lo anterior sugiere el potencial que tienen las lectinas para afectar el crecimiento celular en células cancerígenas

En el trabajo de investigación realizado por Torres (2010) se logró identificar 2 subpoblaciones de lectinas a partir de una fracción semi-pura de lectina de frijol tépari las cuales se denominaron Pico A (Peso molecular aparente de 29.8 kDa, *pI* 4.6 y actividad específica de 12339 UA/mg proteína) y Pico B (Peso molecular aparente de 26.1 kDa, *pI* 4.72 y actividad específica de 8226 UA/mg proteína). Además, por otro lado, en un estudio de espectrofotometría de masas para proteínas y carbohidratos se encontraron al menos 2 proteínas con alta homología a la única secuencia deducida para una lectina de frijol tépari con ligeras diferencias entre ellas mismas. Se encontró que ambas proteínas presentan el mismo tipo y cantidad de carbohidratos. El pH para la recuperación de la actividad aglutinante de PA fue de 4 a 5, mientras que para PB fue de 6; así mismo, se encontró que PA depende de calcio principalmente para mantener su actividad aglutinante, por otro lado PB depende de magnesio.

Ángeles en el 2010 estudió el efecto citotóxico de un concentrado de lectina de frijol tépari sobre células de cáncer de colon (HT-29). En dicha investigación encontró que la fracción concentrada de lectina presentó un efecto citotóxico diferencial sobre células de cáncer de colon HT-29 y sobre células normales de epitelio intestinal IEC-18 con un efecto dependiente de la dosis y la línea celular. Además

las sub-fracciones PA y PB presentaron efecto citotóxico sobre células de cáncer de colon en función de concentración. Las concentraciones letal e inhibitoria 50 de la FCL y de las sub-fracciones PA y PB sobre células HT-29 fueron diferentes (PB>FCL>PA), lo que sugiere que las lectinas citotóxicas se concentran en la fracción PB.

2.9 Anticuerpos y antígenos.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas, son una familia de glucoproteínas relacionadas desde el punto de vista estructural que son producidas por los linfocitos B. Todos los anticuerpos poseen una estructura común simétrica compuesta por dos cadenas pesadas idénticas unidas por enlaces covalentes y dos cadenas ligeras idénticas, cada una unida a una de las cadenas pesadas. Cada cadena consta de dominios de Ig múltiples plegados de forma independiente de aproximadamente 110 aminoácidos que contienen secuencias conservadas y puentes disulfuro intracatenarios (Abbas y Lichtman, 2003).

En la Figura 6 se esquematiza la estructura molecular de un anticuerpo (Lipman y col., 2005). Los anticuerpos se clasifican en diferentes isotipos dependiendo de las diferencias en sus regiones C de la cadena pesada, por lo que las distintas clases de anticuerpos se denominan IgM, IgD, IgG, IgE e IgA.

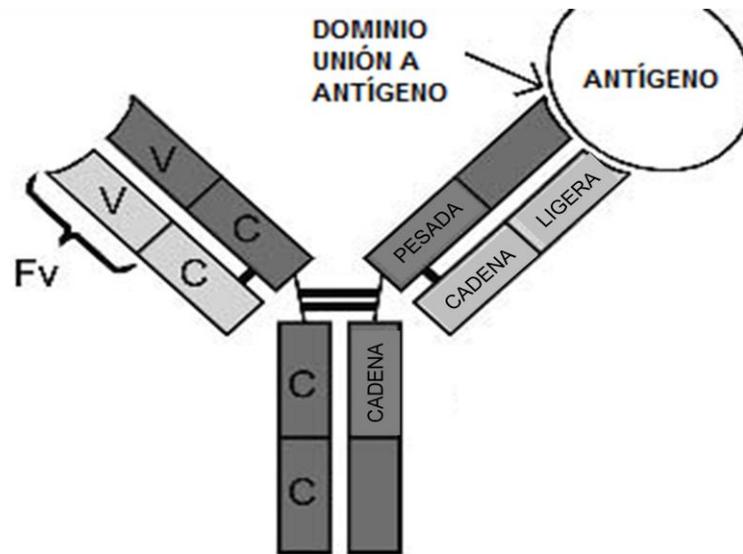


Figura 6. Estructura básica de un anticuerpo. La estructura consiste de 2 cadenas idénticas pesadas y ligeras, cada una de las cadenas contiene una región constante (C) y una variable (V) unidos por puentes disulfuro (Lipman y col., 2005).

Los antígenos son sustancias que se unen específicamente a los anticuerpos o los receptores para el antígeno de las células T. Los anticuerpos se unen a una gran diversidad de moléculas biológicas que actúan como antígenos, entre ellos podemos citar a las proteínas principalmente, aunque también reconocen carbohidratos y en raras ocasiones lípidos y ácidos nucleicos. La unión del anticuerpo al antígeno presenta una gran especificidad y los anticuerpos son capaces de detectar pequeñas diferencias en las estructuras químicas de los antígenos (Abbas y Lichtman, 2003).

La unión antígeno-anticuerpo es una interacción reversible en la que están involucrados enlaces no covalentes. En la interacción *in vitro* de un antígeno con su correspondiente anticuerpo se distinguen dos etapas, la interacción primaria la cual no es visible y la interacción secundaria, que sigue a la anterior y se caracteriza por la aparición de un fenómeno visible como la aglutinación o la precipitación (Castillo, 2007).

Las técnicas inmunológicas permiten evidenciar la interacción antígeno-anticuerpo a través de una reacción secundaria. La estrategia consiste en marcar el anticuerpo

mediante la unión covalente a determinadas moléculas tales como fluorocromos, isotopos radioactivos o enzimas, para poder hacer visible la reacción. En el Cuadro 2 se observan algunos ejemplos de técnicas inmunológicas y sus sistemas de detección (Castillo, 2007).

Cuadro 2. Ejemplos de técnicas inmunológicas y sus sistemas de detección. (Castillo, 2007).

Tipo de técnica inmunológica	Marcador	Equipo de detección
Inmunomarcación	Enzima Fluorocromo	Microscopio óptico Microscopio de fluorescencia Citómetro de flujo
Radioinmunoanálisis (RIA) Técnicas radioinmunométricas (PRIST, RAST)	Isótopo radioactivo	Contador de radiación
ELISA	Enzima	Espectrofotómetro

2.10 Anticuerpos monoclonales y policlonales.

Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos producidos por una única clona de linfocito B, requieren un mayor tiempo de producción y son más caros. Sus principales ventajas son la homogeneidad y consistencia, pueden generarse de manera industrial y se encuentran en mayor concentración (5-20 mg/mL) que los policlonales (50-200 µg/mL) (Lipman y col., 2005).

La técnica de producción de cantidades prácticamente ilimitadas de moléculas de anticuerpos idénticas específicas de un determinante antigénico particular ha revolucionado la inmunología y ha tenido un extraordinario impacto sobre la investigación que se está llevando a cabo en diferentes campos, así como sobre la medicina clínica. El primer método de producción de anticuerpos monoclonales se basa en el hecho de que cada linfocito B produce anticuerpos con una única especificidad. Debido a que los linfocitos B normales no pueden crecer de forma

indefinida, es necesario immortalizar las células B productoras de un anticuerpo específico. Esto se lleva a cabo mediante fusión celular o hibridación de células somáticas, entre una célula B productora de anticuerpos y una célula de mieloma, seguido de la selección de las células fusionadas que secretan el anticuerpo de la especificidad deseada derivado de la célula B normal (Abbas y Lichtman, 2003).

Los anticuerpos monoclonales se han empleado para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, desórdenes hematológicos, enfermedades cardiovasculares y enfermedades infecciosas. Una terapia basada en el uso de anticuerpos monoclonales facilita el entendimiento de las vías biológicas involucradas en la patogénesis del cáncer y subsecuentemente en la identificación de antígenos de la superficie celular y moléculas bioactivas (Eisenbeis y Grau, 2012).

Las primeras aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos monoclonales se derivaron de la inmunización de ratones contra las proteínas del receptor del factor de crecimiento (EGFR). Sin embargo, dichos anticuerpos provocaron la activación del sistema inmune e indujeron una anafilaxia severa, como consecuencia surgieron los anticuerpos quimera, constituidos por la secuencia constante de origen humana con el dominio variable de ratón con actividad antigénica, siendo de esta forma seguros para el uso en humanos al reducir la inmunogenicidad (Eisenbeis y Grau, 2012). En el Cuadro 3 se encuentran algunos ejemplos del uso clínico de anticuerpos monoclonales.

Debido a que la mayoría de los antígenos son altamente complejos, éstos presentan numerosos epítopes que son reconocidos por una gran variedad de linfocitos. Cada linfocito es activado para proliferar y diferenciarse, por lo que a dichos anticuerpos se les llama policlonales. Los anticuerpos policlonales son generados más rápidamente que los monoclonales, además son más baratos y se requieren menos habilidades técnicas para producirlos. Debido a que los anticuerpos policlonales son más heterogéneos y reconocen epítopes antigénicos, el efecto del cambio de uno o varios epítopes es menos significativo, también son

más estables ante un amplio rango de pH y concentración salina (Lipman y col., 2005).

En 1901, el doctor militar Emil von Behring recibió el primer premio Nobel por el desarrollo inicial de anticuerpos policlonales contra enfermedades infecciosas como la difteria y tétanos. El anticuerpo policlonal AnthrivingTM o AIGIV fue desarrollado a partir del plasma de donadores saludables vacunados con Bio Thrax, una vacuna contra el ántrax, dicho anticuerpo demostró ser eficiente y tolerable (Froude y col., 2011). La producción de este tipo de anticuerpos es una herramienta fundamental que permiten el estudio, funcionamiento y caracterización de proteínas.

La selección de la especie para la producción del anticuerpo policlonal es relevante, ya que la cantidad de anticuerpos obtenidos depende del tamaño del animal. Los mamíferos más comúnmente empleados son conejos, ovejas y cabras, debido a su tamaño, a la facilidad de acceso a su sistema vascular y a su respuesta inmune. Entre dichos mamíferos, los conejos son los más empleados para generar anticuerpos policlonales para la investigación debido a que son más fáciles de manejar y económicos; sin embargo, su respuesta inmune es menos consistente y necesita múltiples inmunizaciones con el mismo antígeno para asegurar una respuesta inmune (Lipman y col., 2005).

Cuadro 3. Anticuerpos monoclonales aprobados en la terapia de tumores sólidos. (Eisenbeis y Grau, 2012).

Anticuerpo	Nombre comercial	Blanco u objetivo
Cetuximab	Erbix	EGFR
Panitumumab	Vectibix	EGFR
Transtuzumab	Herceptin	HER2
Bevacizumab	Avastin	VEGF
Girentuximab	Rencarex	Anhidrasa carbónica IX
Ipilimumab	Yervoy	CTLA-4 (Antígeno-4 de linfocito T citotóxico)

III. HIPÓTESIS

En el trabajo de investigación realizado por Oliveira y col. en el 2009, se obtuvieron anticuerpos policlonales contra una lectina llamada frutalina, los cuales se emplearon en ensayos de inmunohistoquímica sobre secciones de tejido de próstata humana. Por lo anterior, es posible obtener un anticuerpo policlonal de reconocimiento específico contra una lectina citotóxica (bioactiva) de frijol Tépari a partir de una sub-fracción concentrada, obtenida por cromatografía de exclusión de peso molecular, identificada como Pico B.

IV. OBJETIVOS

4.1 General.

Obtener un anticuerpo policlonal contra una lectina de frijol Tépari empleando la sub-fracción obtenida mediante cromatografía de exclusión identificada como Pico B.

4.2 Específicos.

1. Purificar una lectina de frijol Tépari a partir del Pico B mediante electroforesis desnaturizante.
2. Renaturalizar a la proteína y recuperar su actividad biológica.
3. Utilizar las fracciones obtenidas y liofilizadas para la inoculación en conejos y obtener el anticuerpo a partir del suero.
4. Purificar y titular el anticuerpo policlonal producido.

V. METODOLOGÍA

5.1 Materiales.

5.1.1 Material Biológico.

Fracción concentrada de lectina (FCL) de frijol tépari, Pico A y Pico B se obtuvieron en el laboratorio de Mecanismos de Defensa de Plantas del CINVESTAV-Irapuato a cargo del Dr. Alejandro Blanco Labra. Brevemente, se empleó como solvente de extracción Tris-HCl pH 8.0 a 4°C, precipitación secuencial con sulfato de amonio al 40 y 60% de saturación y cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-75. Mediante este método se lograron separar las dos sub-poblaciones de proteínas con actividad aglutinante, PA (Peso molecular aparente de 29.8 kDa, pl 4.6 y actividad específica de 12 339 UA/mg proteína) y PB (Peso molecular aparente de 26.1 kDa, pl 4.72 y actividad específica de 8226 UA/mg proteína) (Torres, 2010). Las fracciones se liofilizaron y almacenaron a -20° C hasta su uso.

Para las pruebas de actividad aglutinante, se emplearon eritrocitos humanos tipo A positivo fijados previamente en glutaraldehído (Turner y Liener, 1975).

Para la obtención de los anticuerpos se inocularon dos conejos hembra de la raza Nueva Zelanda de 3 Kg y 18 semanas de edad.

5.1.2 Reactivos

Los reactivos para electroforesis y Western Blot se adquirieron de la casa comercial Bio-Rad, los reactivos de uso general fueron de Sigma, y J.T Baker. Las placas de 96 pozos fueron marca MaxiSorp y las placas de 24 pozos Nunc. Se utilizó un adyuvante Montanide ISA 50V2 (Marca SEPPIC).

5.2 Métodos.

5.2.1 Preparación de las muestras (FCL, PA y PB).

Las fracciones concentradas en lectina de frijol tépari (FCL, PA y PB) liofilizadas se suspendieron en agua tridestilada en una concentración 1mg/mL y conservadas en congelación a -20° C.

5.2.2 Cuantificación de proteínas y elaboración de electroforesis nativa y desnaturalizante.

Se cuantificó la proteína por el método de Bradford (1976) mediante una curva patrón de proteína empleando albúmina sérica de bovino (ASB, marca Millipore) que permitió determinar la cantidad de proteína en función de la absorbancia que se presentó a 595 nm. Se procedió a preparar geles de electroforesis nativos en poliacrilamida al 5% conteniendo 25 mg de proteína de cada fracción (PA, PB y FCL) y geles desnaturalizantes al 12% (Laemmli, 1970) con la finalidad de determinar el perfil electroforético de cada fracción. Las electroforesis se corrieron en un equipo Mini-Protean Tetra Electrophoresis Cell de Bio-Rad. Los geles nativos se corrieron a 80 Volts mientras que los desnaturalizantes a 120 y 80 Volts con la finalidad de observar el patrón de bandeo; además, se incluyó otro carril con el marcador de peso molecular de amplio rango. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie durante toda la noche y se retiró el exceso de colorante con la solución metanol/ácido acético (40% 10%, v/v).

5.2.3 Tinción con plata.

Para poder visualizar el patrón de bandeo de una forma más sensible y descartar bandas que no pudieran percibirse adecuadamente mediante la tinción con Azul de Coomassie, se realizaron tinciones con plata en geles desnaturalizantes, conteniendo la fracción PB de acuerdo al procedimiento descrito por Bloom y col., 1987.

5.2.4. Tinción de membrana con reactivo de Schiff-ácido peryódico (PASS).

Se corrieron geles nativos al 5% con 40 mg de proteína a 80 Volts, posteriormente se hizo la transferencia a membrana a 0.2 Amperes, durante 60 minutos. La membrana se lavó con agua destilada durante 5 minutos, se incubó con la solución A (1 % ácido peryódico, 3% ácido acético, 96% agua destilada) por 30 minutos, posteriormente se lavó con agua destilada 2 veces x 5 minutos y se incubó con reactivo Schiff 15 minutos en oscuridad. Después se lavó con la solución B (0.1% metabisulfito de sodio en HCl 10mM) 2 veces x 15 minutos y se dejó secar a temperatura ambiente.

5.2.5 Renaturalización-reoxidación de proteínas.

Se corrieron geles bajo condiciones desnaturizantes al 12% a 80 Volts, con cantidades variables de proteína en medida que se fue concentrando la cantidad de proteína recuperada iniciando con 20 mg por carril. Después de correr el gel, éste se cortó en 2 y la primera parte (conteniendo el carril del marcador de peso molecular) y la mitad del segundo carril (correspondiente a la fracción de lectina) se tiñeron con azul de Coomassie para identificar el patrón de bandeo.

Las bandas de PB empleadas para la producción del anticuerpo policlonal se separaron y catalogaron como B1 y B2. Se sometieron a agitación suave en solución renaturalizante (Buffer 0.1 M Tris-HC pH 8.0, 1 mM de EDTA, 0.3 mM de cistina y 3 mM de cisteína) durante 15 minutos cambiando la solución 2 veces. Finalmente, las bandas se maceraron con una pequeña cantidad de PBS 1x y se centrifugaron alícuotas de 1 mL a 13,000 rpm durante 5 minutos para separar la poliacrilamida del concentrado proteico.

5.2.6 Determinación de actividad aglutinante en placa de 96 pozos

Se realizaron geles de electroforesis desnaturizantes al 12% conteniendo la fracción PB, se recuperaron las 2 bandas (B1 y B2) según la técnica descrita anteriormente y se renaturalizaron las proteínas. Una vez que se obtuvo el

concentrado proteico libre de poliacrilamida se procedió a colocar en el primer carril 100 μL del concentrado proteico B1, B2 y PBS (como control negativo) en placas de 96 pozos (por duplicado), en los demás pozos se colocaron 50 μL de PBS 1x hasta el carril 12. Después se realizaron diluciones dobles seriadas a partir del primer carril tomando 50 μL , pasándolo al segundo y así sucesivamente hasta llegar al carril 12. Se preparó una solución al 0.5% de eritrocitos humanos tipo A positivo en PBS 1x y se colocaron 50 μL en cada pozo a probar.

La placa de 96 pozos se colocó en incubación a 37°C durante 2 horas, se leyó en un microscopio invertido y la actividad aglutinante se determinó utilizando una escala arbitraria y apreciativa: alta actividad (+++), media (++) , baja (+) y nula (-). La actividad específica se cuantificó mediante la ecuación:

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

Donde: AE es la actividad específica aglutinante expresada por unidades mg de proteína (U/mg), n es la última dilución con aglutinación apreciable al microscopio y mg es la cantidad de proteína en el primer pozo.

5.2.7 Producción del anticuerpo.

Para la producción del anticuerpo contra la lectina se utilizaron dos conejos hembra de la raza Nueva Zelanda de 18 semanas de edad. Después de obtener el suero pre-inmunización, a cada conejo se les inyectó una primera dosis inicial con el adyuvante conteniendo 100 μg de las fracciones recolectadas previamente liofilizadas denominadas B1 y B2 (se colocaron 600 μg de proteína B1 y B2 respectivamente en 1 mL de PBS 1x estéril y 5 mL de adyuvante, se homogenizaron y se conservaron en congelación hasta su uso). Se aplicaron tres dosis posteriores cada 15 días con la misma cantidad de proteína en adyuvante. Cabe mencionar que en cada inmunización se aplicó una inyección con un volumen de 1 mL de solución, colocando 0.5 mL del inóculo en cada lado del animal, el

resto del inóculo se almacenó en congelación a -4°C hasta su aplicación. Las conejas se sacrificaron para la obtención de un volumen mayor de sangre, por lo que se anestesiaron y se realizó la exanguinación por punción cardiaca. La sangre se colectó en un tubo Falcon estéril y fue centrifugado a 3,000 rpm durante 15 minutos, se separó el suero del paquete celular y se congeló en alícuotas de 1 mL a -20°C .

5.2.8 Dot-Blot previo a las inmunizaciones

Se cortó un rectángulo de aproximadamente 5 x 6 cm de membrana de nitrocelulosa ($0.45\ \mu\text{m}$, Marca Bio-Rad), se dibujaron círculos con lápiz de grafito del #2 no mayores a 5 mm de diámetro para indicar la región en donde se colocó la muestra. Usando una micropipeta se colocaron $4\ \mu\text{L}$ de muestra (FCL, PB, B1, B2 y ASB (control negativo) y se dejó secar la muestra a temperatura ambiente durante 15 min.

Posteriormente, se bloqueó la membrana 1 hora a temperatura ambiente y en agitación lenta con TTBS/leche 1% (TBS 5x: Tris 100 mM y NaCl 2.5 M aforados a 1 L de agua tridestilada, se diluyó la solución TBS 5x a una concentración TBS 1x). Para preparar la solución TTBS se agregó Tween 20 en un 0.05% del volumen total de la solución TBS 1x previamente elaborada.

Después de bloquear la membrana se lavó con solución TTBS por 10 minutos, a continuación se colocó el anticuerpo anti-PHA (aglutinina de frijol común) en conejo en concentración de $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ en la solución de TTBS/leche 1% y se dejó en agitación lenta durante 1 hora. Se procedió a lavar la membrana 3 veces con TTBS (3x 5 minutos), se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina en dilución 1:1000 durante 1 hora, se lavó la membrana 2 veces con TTBS (15 minutos x 2) y una vez con TBS. Finalmente se procedió a revelar con la solución reveladora del kit para fosfatasa alcalina de Bio-Rad para Western Blot hasta obtener la tonalidad deseada. Para detener la

reacción, la membrana se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente.

5.2.9 Dot-Blot para B1 y B2

Se trazaron círculos de aproximadamente 1 cm de diámetro en membranas de nitrocelulosa y se colocaron 10 μ L de muestra de FCL, PB, ASB (control negativo), los sueros de las conejas (S1, S2, S3, S4 y S5), así como 5 μ L de muestra para B1 y B2. Además, se realizó una curva de titulación para FCL empleando diluciones de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 a partir de una concentración inicial de 0.4697 mgP/mL. Como anticuerpo primario se empleó el suero de las conejas del quinto sangrado disuelto en TTBS/leche 1% en concentraciones 1:200, 1:500 y 1:1000. Como anticuerpo secundario se empleó un anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina en dilución 1:1000. Se siguieron las mismas instrucciones que para el Dot- Blot descrito previamente.

5.2.10 Análisis estadístico

Para la determinación de proteína se realizó una regresión lineal de la absorbancia contra el contenido de proteína.

VI. RESULTADOS

6.1 Cuantificación de proteína

Se cuantificó la proteína en cada fracción de liofilizado mediante el método de Bradford (1976) para lo cual se llevó a cabo una curva patrón de proteína, que permitió determinar la cantidad de proteína en función de la absorbancia que presenta a 595 nm (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración de proteína mediante una curva patrón de proteína, empleando albúmina sérica de bovino (ASB). La concentración de proteína se expresa en unidades microgramo de proteína por microlitros de liofilizado.

Fracción	$\mu\text{gP}/\mu\text{L}$
Pico A	0.4243
Pico B	0.3148
Fracción concentrada de lectina	0.4697

6.2 Geles de electroforesis nativa

Una vez conocida la cantidad de proteína contenida en las fracciones de lectina, se procedió a separar 25 mg de proteína total en geles nativos al 5% (Laemmli, 1970) a 80 Volts (Figura 7). Posterior a la tinción con azul de Coomassie, se observó un barrido general en el gel, así como la acumulación de proteína en los costados de los carriles. Lo anterior puede ser debido a la presencia de azúcares contenidos en la lectina. Adicionalmente, se corrieron geles al 7% y 7.5% y se observó el mismo comportamiento. Por lo anterior, se decidió realizar geles de electroforesis bajo condiciones desnaturizantes puesto que bajo condiciones nativas no es posible separar las proteínas debido al barrido generalizado en las fracciones (PA, PB y FCL).

6.3 Geles de electroforesis desnaturizantes

Debido a una mejor definición de bandas, los geles en condiciones desnaturizantes se corrieron al 12%. Para lo anterior, se colocaron 40 mg de PA, PB y FCL y se observaron varias bandas en la fracción correspondiente a PA en la

región comprendida entre los 30 y 40 kDa que es en donde se encuentran las lectinas de interés, en la fracción de PB se observaron 2 bandas entre dicha región y finalmente en FCL se observan 2 bandas (Figura 8). Al observar una mejor separación de las proteínas y geles bajo condiciones desnaturalizantes se procedió a elegir la mejor opción para la producción del anticuerpo.

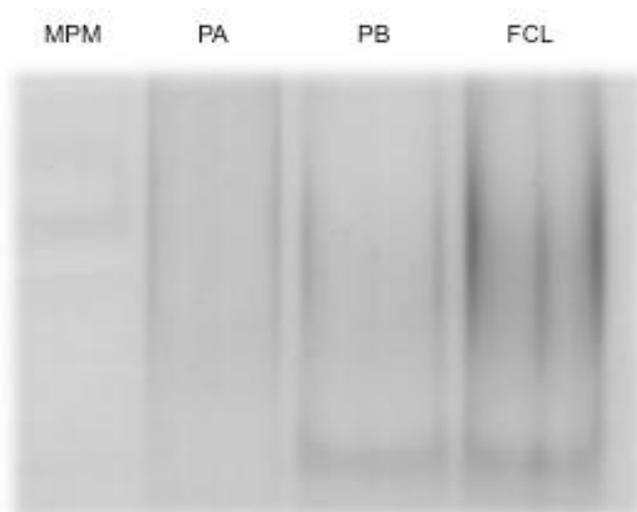


Figura 7. Gel de electroforesis nativo al 5%. Se colocaron 25 mg de proteína (PA, PB y FCL), así como 10 μ L de marcador de peso molecular (MPM) Broad Range.

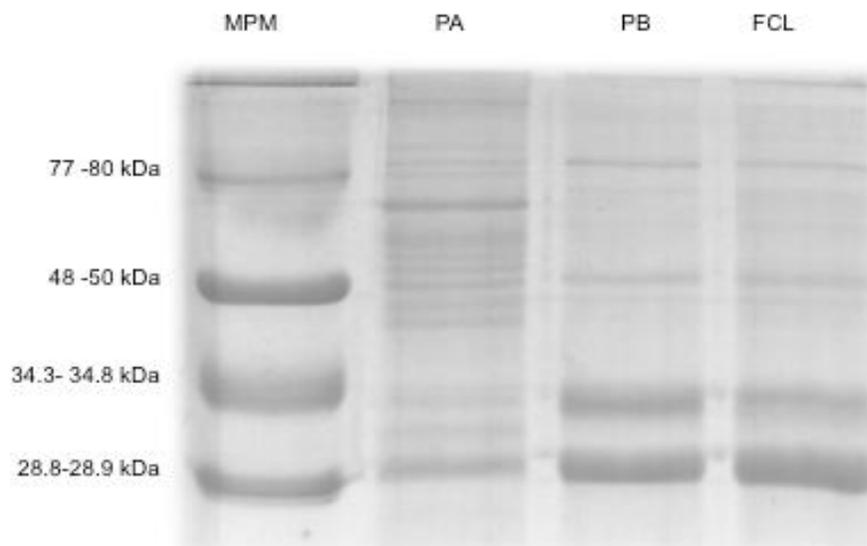


Figura 8. Gel al 12 % corrido bajo condiciones desnaturalizantes. El gel se cargó con 40 mg de proteína correspondiente a PA, PB y FCL, así como 10 μ L de marcador de peso molecular (MPM) Broad Range.

Posterior a la tinción con azul de Coomassie, se encontraron varias bandas en la fracción de PA; mientras que en la fracción correspondiente a PB se visualizaron 2 bandas bien definidas y separadas en la zona correspondiente entre los 30 y 40 kDa, al igual que para la FCL. A la banda de mayor peso molecular (~40 kDa) se le denominó B1 y a la de menor peso molecular (~30 kDa), B2.

6.4 Obtención del extracto proteico de las 2 bandas en PB

Una vez que se determinó que la fracción PB se emplearía para obtener el anticuerpo se procedió a realizar geles desnaturalizantes al 12% con la finalidad de recuperar las bandas denominadas B1 y B2 por separado. Para ello se identificó la ubicación de ambas tiñendo el carril del marcador de peso molecular y la mitad del primer carril conteniendo 150 μ L de muestra de PB de las alícuotas de 1 mg/mL de liofilizado. Los demás carriles no se tiñeron y se cortaron calculando la distancia en donde se podrían encontrar ambas bandas de acuerdo a la muestra teñida. Las fracciones se recolectaron en tubos Falcon estériles por separado, se maceraron y renaturalizaron. Los extractos proteicos correspondientes a B1 y B2 se almacenaron en PBS 1x (pH 7.4) en a 4°C para su posterior análisis de concentración de proteína y actividad aglutinante.

6.5 Dot- Blot para B1 y B2

Para comprobar la presencia de lectinas, se procedió a realizar un Dot- Blot en el cual se colocaron muestras de FCL, PB, B1 y B2. Se utilizó como anticuerpo primario un anti PHA (aglutinina de frijol común) en conejo en concentración 2 μ g/mL y como secundario un anti-conejo de cabra acoplado a una fosfatasa alcalina en dilución 1:1000 (Figura 9).

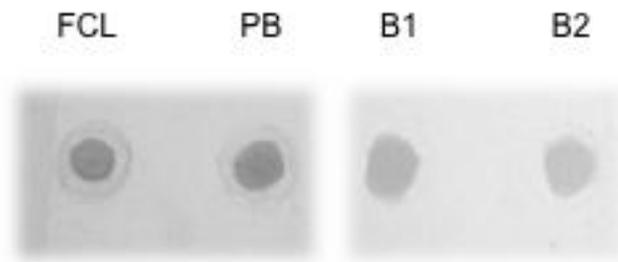


Figura 9. Membrana de nitrocelulosa resultante del Dot-Blot. Se colocaron 4 μ L de muestra de FCL, PB, B1 y B2. Se pudo observar la presencia de lectinas en las 4 muestras al emplear el anticuerpo comercial primario (anti PHA).

6.6 Concentración de proteína en B1 y B2.

Para calcular la concentración de proteína contenida en los extractos proteicos se procedió a realizar una curva patrón empleando albúmina sérica de bovino 1:100 disuelta en PBS 1X y se leyó a 220 nm. Se empleó 1 mL de muestra (B1 y B2) diluidas 1:10 en PBS para efectuar la cuantificación. De acuerdo a la curva patrón [$y= 0.0165x -0.0021$ (R^2 0.9949)] se obtuvieron las concentraciones mostradas en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Concentraciones de proteína en B1 y B2 obtenidas de acuerdo a la regresión lineal y a los cálculos realizados al obtener las ecuaciones.

Fracción	μ gP/ μ L
B1	0.27
B2	0.23

6.7 Actividad aglutinante en B1 y B2

Al confirmar la presencia de proteína en el extracto a partir de macerar las bandas por separado, se procedió a evaluar la actividad de las lectinas a través de su capacidad aglutinante. Se empleó una escala arbitraria en la cual se tomó en cuenta hasta qué dilución aglutinaban los eritrocitos tipo A positivo. La banda B1 aglutinó hasta el pozo 7 y B2 hasta el 9. Lo anterior permitió calcular la actividad aglutinante (Cuadro 6).

Cuadro 6. Actividad aglutinante de B1 y B2 una vez renaturalizada la muestra.

Muestra	$\mu\text{gP}/\mu\text{L}$ de muestra	Actividad aglutinante
B1	0.16	8158.24
B2	0.18	7003.77

6.8 Tinción con Azul de Coomassie y Tinción con plata de B1 y B2

Se comprobó la presencia y pureza de cada banda mediante electroforesis desnaturalizante al 12% cargando 40 mg de proteína de B1 y B2. Posteriormente se tiñó con azul de Coomassie (Figura 10) y un segundo gel con plata (Figura 11).

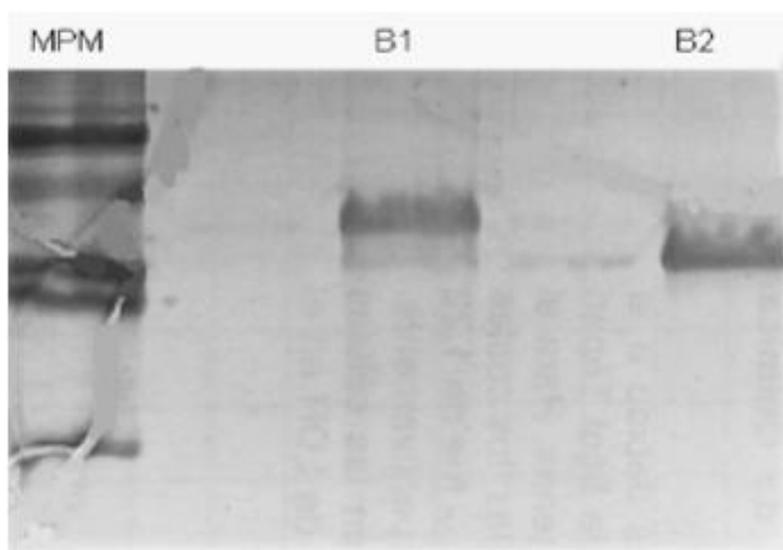


Figura 10. Gel de electroforesis desnaturalizante al 12% teñido con azul de Coomassie. Se colocaron 40 mg de muestra de B1 y B2.

6.9 Obtención del anticuerpo

Al comprobar que las lectinas conservaron su actividad biológica se realizaron las inmunizaciones respectivas en las conejas para producir el anticuerpo policlonal a partir de las 2 bandas encontradas en PB. Para lo anterior se recuperaron las bandas de los geles de electroforesis, se renaturalizaron, maceraron y liofilizaron para poder inocular a conejas Nueva Zelanda. No se observaron efectos secundarios en los animales durante las inmunizaciones al colocarles 100 μg de proteína disuelta en adyuvante, se obtuvieron aproximadamente 200 μL de suero de los sangrados (S1 al S4) y 2 mL de suero para el S5 en ambas conejas.

En la Figura 12 se muestra la respuesta de las 4 inmunizaciones para cada una de las bandas obtenidas. En la Figura 13 se observa la titulación de Anti-B1 en concentraciones 1:200, 1:500 y 1:1000 y, de forma similar, la Figura 14 muestra la titulación para Anti-B2.

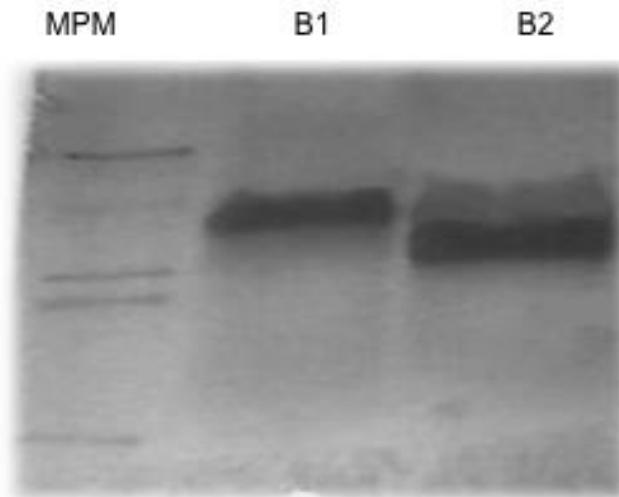


Figura 11. Gel de electroforesis desnaturalizante al 12% teñido con plata. Se colocaron 40 mg de muestra, se pueden apreciar las bandas 1 y 2 bien definidas y separadas.

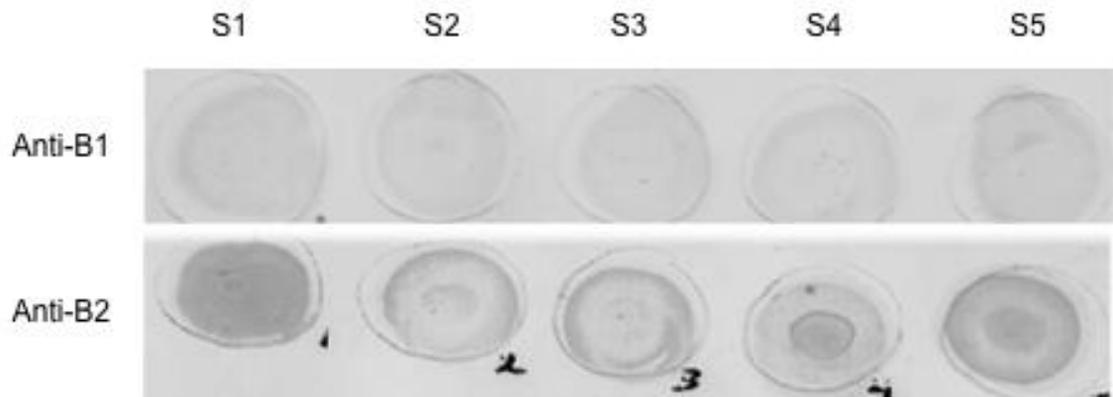


Figura 12. Dot- Blot para Anti-B1 y para Anti-B2 en una concentración 1:500 contra las muestras de los sangrados realizados durante las inmunizaciones (S1, S2, S3, S4 y S5). Se realizaron 4 inmunizaciones en las conejas cada 10 días, se les inyectaron 0.5 mL de inóculo en cada muslo para hacer un total de 1 mL de inóculo por inmunización. Posteriormente se tomó 1 mL de muestra de sangre se recolectó, centrifugó y separó el suero, el cual fue mantenido en congelación a -20°C hasta su empleo en el Dot-Blot, se colocaron 4 μL de muestra de S1, S2, S3, S4 y S5.

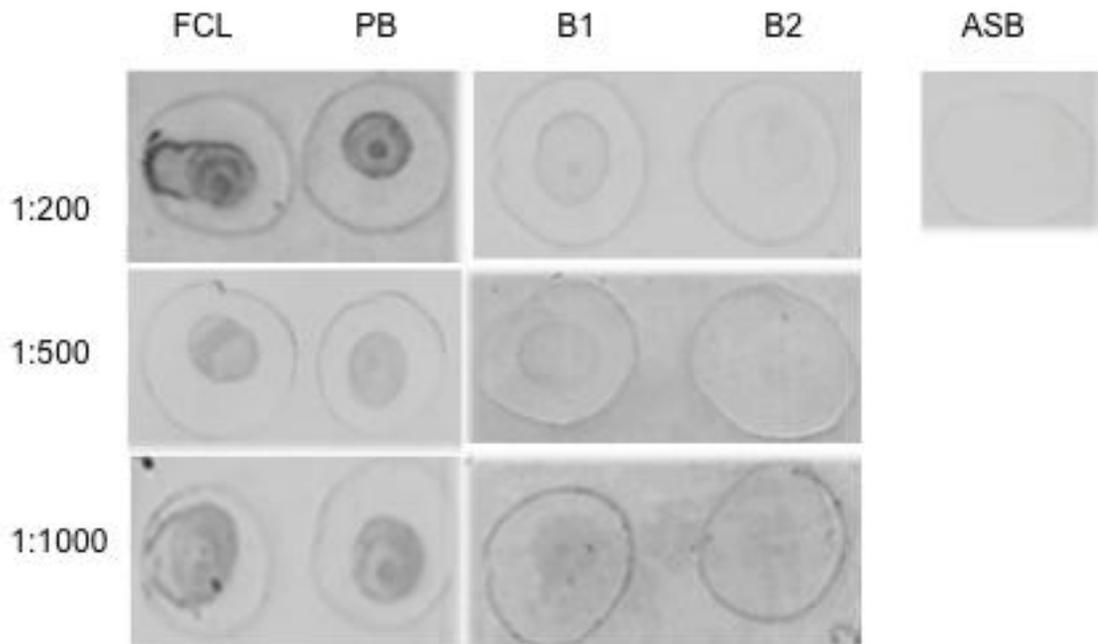


Figura 13. Dot-Blot para Anti-B1 en una concentración 1:200, 1:500 y 1:1000 contra FCL, PB, ASB, B1 y B2. Se colocaron 10 μ L de muestra para FCL, PB y ASB (control negativo), así como 5 μ L de muestra de B1 y B2.

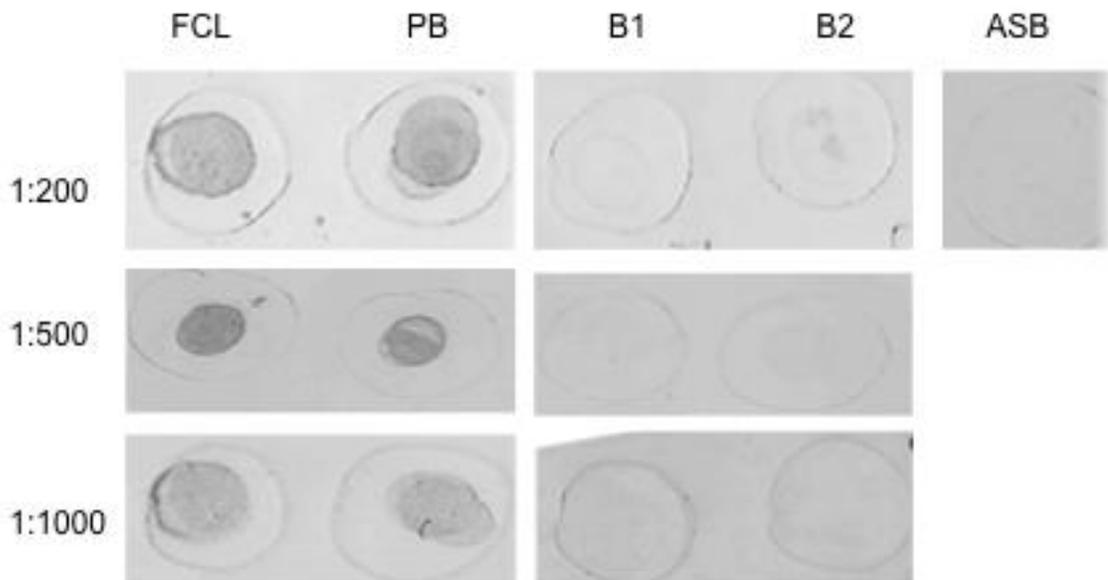


Figura 14. Dot-Blot para Anti-B2 en una concentración 1:200, 1:500 y 1:1000 contra FCL, PB, ASB, B1 y B2. Se colocaron 10 μ L de muestra para FCL, PB y ASB (control negativo), así como 5 μ L de muestra de B1 y B2.

Las Figuras 15 y 16 muestran la titulación para FCL con Anti-B1 y Anti-B2, respectivamente.

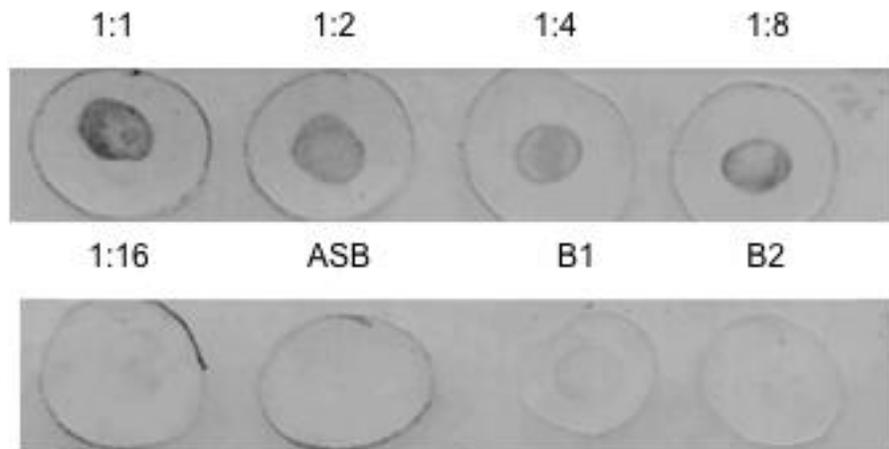


Figura 15. Membrana resultante del Dot Blot para Anti-B1 en una concentración 1:500 contra diluciones de FCL (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16), ASB, B1 y B2.

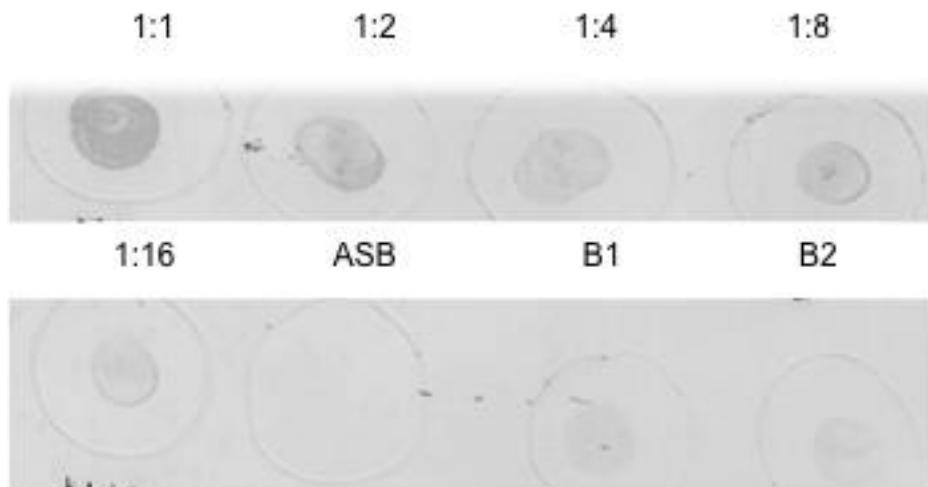


Figura 16. Membrana resultante del Dot-Blot para Anti-B2 en una concentración 1:500 contra diluciones de FCL (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16), así como ASB, B1 y B2.

VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se obtuvieron anticuerpos policlonales contra una lectina de frijol tépari bioactiva, a partir de una fracción concentrada de lectina en donde, partiendo del perfil electroforético obtenido de geles nativos y desnaturalizantes, se determinó emplear a PB para obtener los anticuerpos debido a la buena separación entre las bandas y teniendo como antecedente que Ángeles en el 2010, concluyó que las lectinas citotóxicas se encuentran en PB. Además se demostró que la actividad de las lectinas no se perdió, aunque disminuyó la actividad aglutinante, se determinó que la lectina se encontraba lo suficientemente activa como para seguir con los experimentos.

Contrario a algunos protocolos de inmunización en donde se aplican dosis menores a partir de la primera inmunización (Peña y col., 2005). Se decidió emplear una misma cantidad de inóculo (100 μ g de proteína de las fracciones recolectadas) durante las 4 inmunizaciones, debido a que se desconocía si la lectina podría provocar una reacción antigénica en donde se obtuvieran anticuerpos policlonales contra las 2 bandas y, así de esta manera asegurar una reacción antigénica.

Se obtuvieron anticuerpos policlonales capaces de reconocer proteínas en el Dot-Blot, sin embargo faltó realizar un Western Blot confirmatorio que nos indicara que los anticuerpos reconocían a las proteínas localizadas en la zona de interés (entre los 30 y 40 kDa), tal como lo realizó Oliveira y col. en el 2009 al obtener anticuerpos policlonales contra frutalina. Además dicho ensayo podría determinar la especificidad de los anticuerpos (Peña y col., 2005).

Por otro lado, en los sangrados realizados durante las inmunizaciones se observa señal en todas las muestras, incluso en S1 (sangrado previo a la inoculación) evidenciando una mayor producción de anticuerpos y un incremento en la afinidad. La presencia de señal en S1 puede deberse a que las lectinas son capaces de estimular linfocitos e interactuar con glicoconjugados (Valadez-Vega y col., 2007).

Faltó un ensayo en el cual se emplearan las diluciones 1:200 y 1:1000, para demostrar el incremento en la afinidad durante las inmunizaciones.

Al final se obtuvieron anticuerpos capaces de reconocer a las proteínas encontradas en las fracciones de B1 y B2, lo cual no se ha realizado aún para la lectina de frijol tépari, permitiendo así emplear un anticuerpo contra frijol tépari en vez de uno contra frijol común en estudios posteriores. Sin embargo no se puede afirmar que todos los anticuerpos producidos sean en contra de las lectinas, debido a que la muestra no es pura, sino una fracción concentrada a partir de la cual se han aislado proteínas encontradas en la región comprendida entre los 30 y 40 kDa, en donde presumiblemente se encuentran las lectinas citotóxicas (Ángeles, 2010).

IX. CONCLUSIONES

Mediante la metodología empleada fue posible obtener dos anticuerpos, Anti-B1 y Anti-B2, en los sueros de las conejas inmunizadas. En ambos casos las concentraciones que mejores resultados arrojaron fueron 1:200 y 1:500 y al emplear los anticuerpos en una concentración 1:1000 se logran resultados casi imperceptibles. Los anticuerpos pudieron evidenciar la presencia de proteínas en las fracciones usadas, en diluciones que van de 1:1 hasta 1:16 al ser empleados en una concentración 1:500.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

- Abbas**, AK., Lichtman AH. **2003**. Cellular and Molecular Immunology. Fifth Edition. Saunders, Elsevier Sciences. Philadelphia, PA, EUA:43-44, 64-65.
- Abdullaev**, FI., González de Mejía, E. **1997**. Antitumor effect of plant lectins. Natural Toxins. Vol. 5:157–163.
- Arason**, GJ. **1996**. Lectins as molecules in vertebrates and invertebrates. Fish Shellfish Immunol. Vol. 6:277-289.
- Bloom**, H., Beber, H., Gross, HS. **1987**. Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis. Vol. 8:93-99.
- Bradford**, MM. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal Biochem. Vol. 72:248-252.
- Castañeda-Cuevas**, AL, 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**, N. **2007**. <http://www.oncoimmun.cl/docencia/inmuno/clase12.pdf>
- DeClerck**, YA., Mercurio, AM., Snack, MS., Chapman, HA., Zutter, MM., Muschel, RJ., Raz, A., Matrisian, LM., Sloane, BF., Noel, A., Hendrix, MJ., Coussens, L., Padarathsingh, M. **2004**. Proteases, Extracellular Matrix, and Cancer. Am. J. Path. Vol.164:1131-1139.
- Debouk**, D.G. **1994**. http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap2_2.htm#23.
- De Hoff**, LP., Brill, ML., Hirsch, MA. **2009**. Plants lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. Molecular Genetics and Genomics. Vol. 282:1- 15.
- Eisenbeis**, AM., Grau, SJ. **2012**. Monoclonal antibodies and Fc fragments for treating solid tumors. Biologics: Targets and Therapy. Vol. 6:13-20.
- Ferriz-Martínez**, RA., Torres-Arteaga, I.C., Blanco-Labra, A., García-Gasca, T. **2010**. The Role of plant lectins in cancer treatment. En: New approaches in the

treatment of cáncer. Ed. Carmen Mejia and Samuel Navarro. Nova Sciences publishers Inc. pp 1-19.

Froude, JW., Stiles, B., Pelat, T., Thullier, P. **2011**. Antibodies for biodefense. *Landes Bioscience*. 3(6):517-527.

Gabius, HJ. **2001**. Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: cases studies for the mistletoe lectin and galectin-1. *Biochimie*. Vol. 83(7):659-666.

Gallego del Sol, F., Nagano, SC., Cavada, SB., Sampaio, HA., Sanz, L., Calvete, JJ. **2006**. Lectinas. *Investigación y Ciencia*. Vol. 1:1-10.

González de Mejía, E. y Prisecaru, VI. **2005**. Lectins as bioactive plant proteins: A potencial In cancer treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 45:425-445.

Heinrich, EL., Welty, AY., Banner, LR., Oppenheimer, SB. **2005**. Direct targeting of cancer cells: A multiparameter approach. *National Institutes of Health*. Vol. 107(5):335-344.

Hernández, CP., Pérez, CE., Martínez, ML., Ortiz, B., Martínez G. **2005**. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *REB*. Vol. 24(1): 21-27.

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>.

Kannagi, R., Izawa, M., Koite, T., Miyazaki, K., Kimura, N. **2004**. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci*. Vol. 95(5): 377-384.

Karp, G. **1996**. *Biología Celular y Molecular*. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Primera Edición. México D.F. pp 746.

Kiss, R., Camby, I., Duckworth, D., De-Decker, R., Salmon, I. **1997**. *In vitro* influence of *Phaseolus vulgaris*, *Griffonia simplicifolia*, Conavalin A, wheat germ and peanut agglutinins on HCT-15, LoVo and SW 837 human colorectal cancer cell growth. *Gut*. Vol. 40: 253-261.

- Kobata, A. 1998.** A retrospective and prospective view of glycopathology. *Glycoconjugates J.* Vol. 15: 323-331.
- Komath, SS., Kavitha, M., Swamy, JM. 2005.** Beyond carbohydrate binding: news directions in plant lectin research. *Organic and Biomolecular Chemistry.* Vol. 4: 973-988.
- Laemmli, UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* Vol. 227: 680-685.
- Lajolo, MF., Genovese, MI. 2002.** Nutricional Significanse of lectins and Enzyme Inhibitors from Legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol. 50(22):6892-6598.
- Lipman, NS., Jackson, LR., Trudel, LJ., Weis-García, F. 2005.** Monoclonal versus policlonal antibodies: distinguishing characteristics, applicatiосn, and información resourses. *ILAR Journal.* Vol. 46(3):258-268.
- Lis, H., Sharon, N. 1998.** Lectins: Carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews.* Vol. 98:637-674.
- Malagolini, N., Chiricolo, M., Marini, M., Dall'Olio, F. 2008.** Exposure of α -2,6-sialylated lactosaminic chains marks apoptotic and necrotic death in different cell types. *Glycobiology.* Vol. 19(2):172-181.
- Nishimura, H., Nishimura, M., Oda, R., Yamanaka, K., Matsubara, T., Ozaki, Y., Sekiya, L., Jamada, T., Kato, Y. 2004.** Lectins induce resistance to proteases and/or mechanical stimulus in all examined cells-including bone narrow mesenchymal stem cells- on various scaffolds. *Experimental Cell Research.* Vol. 295:119-127.
- Oliveira, C., Teixeira, JA.,Schimitt, F., Domingues, L. 2009.** A comparative study of recombinant and native frutain binding to human prostate tissues” .*MBC Biotechnology.* Vol. 9: 78-85.
- Peña. O., Sosa, A., Echeverri, O., Sáenz, H., Barrera, LA. 2005.** Producción de anticuerpos policlonales IgG contra la proteína iduronato-2-sulfato sulfatasa y desarrollo de un sistema de detección para IDS humana recombinante. *Biomédica.* Vol. 25: 181-188.

Reynoso, CR., González de Mejía, E., Loarca, PG. **2003.** Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). Food and Chemical Toxicology. Vol. 41(1): 21-27.

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

Rozwarski, DA., Swami, BM., Brewer, CF., sacchettini, JC. **1998.** Crystal structure of the lectin from *Dioclea grandiflora* complex with core trimannoside of asparagines-linked carbohydrates. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 273(49):32818-25.

Schwarz, RE., Wojciechowicz, DC., Picon, AI., Schwarz, MA., Paty, PB. **1999.** Wheatgerm agglutinin-mediated toxicity in pancreatic cancer cells. British Journal of Cancer. Vol. 80(11):1754-1762.

Sharma, A., Bun Ng, T., Ho Wong, J., Lin, P. **2008.** Purification and characterization of lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. (Anasazi Beans). Journal of Biomedicine and Biotechnology. Vol 2009 (929598):1-9.

Sharon, N., Lis, H. **1998.** How lectins bind carbohydrates: Lessons from legume lectins. Journal of Agricultural Food Chemistry. Vol. 50(22):6586-6591.

Siegel, R., Naishadham, D., Ahmedin, J. **2012.** Cancer Journal of Clinicians. Vol 62(1):10-29.

Torres Arteaga, IC. 2010. Purificación y caracterización parcial de una lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) con actividad citotóxica sobre células cancerígenas. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Nutrición Humana. Facultad de Ciencias Naturales.

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

Valadez-Vega, M., Riverón, L., Abdullaev, F., Alvarez, G., 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>

Van Damme, EJM., Barre, A., Rougé, P., Peumans, WJ. **2004.** Cytoplasmatic/nuclear plant lectins: a new story. Trends Plant Sci. Vol. 9: 484-489.

Wah, DA., Romero, A., Gallego, F., Cavada, BS., Ramos, MV., Grangeiro, TB., Sampaio, AH., Calvete, JJ. 2001. Crystal structure of native and cd/cd-substituted dioclea guianenesis seed lectin. A novel manganese-binding site and structural basis of dimer-tetramer association. Journal of molecular biology. Vol. 310 (4):885-894.