

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTO CITOTÓXICO DE UNA FRACCIÓN RICA EN
LECTINAS DE FRIJOL TÉPARI (*Phaseolus acutifolius*) SOBRE
CÉLULAS CANCERÍGENAS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

ELISA HERNÁNDEZ RIVERA

DIRIGIDA POR

Dra. TERESA GARCÍA GASCA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2005.

BIBLIOTECA CENTRAL, U.A.Q.

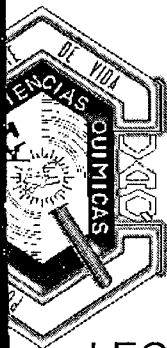
No. Adq. 1720663 - 2

No. Título _____

Clas. TS

571.6592

H557e



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTO CITOTÓXICO DE UNA FRACCIÓN RICA EN
LECTINAS DE FRIJOL TÉPARI (*Phaseolus acutifolius*) SOBRE
CÉLULAS CANCERÍGENAS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

ELISA HERNÁNDEZ RIVERA

DIRIGIDA POR

Dra. TERESA GARCÍA GASCA

SINODALES

Dra. TERESA GARCÍA GASCA
DIRECTOR

Dr. ALEJANDRO BLANCO LABRA
SINODAL

Dra. MINERVA RAMOS GOMEZ
SINODAL

M. en C. MA DE LOS ANGELES MUÑOZ
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, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. TERESA GARCÍA GASCA

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida que me ha dado para poder llegar al final de este camino y que me dio la oportunidad de poder terminas un carrera, por todo su amor y sus cuidados que a tenido para conmigo y por haberme dado una familia que me ama mucho y amigos que han estado a mi lado en los buenos y malos momentos. Por las personas que a puesto en mi camino para poder llegar hasta donde ahora me encuentro.

Le doy gracias a mi papá y mi mama por su apoyo incondicional, por todo su amor que me han brindado, pero sobre todo por ser mis mejores amigos y que siempre han estado conmigo, porque me han enseñado que mientras tengamos papa Dios nada nos faltará.

A mi hermana Gaby, por ser mi hermana mayor, y porque se preocupa por mí, a su manera, pero yo se que me quiere y que yo también la quiero mucho, porque siempre me hace reír con sus ocurrencias, por su alegría que me brinda.

A mi hermana Mariana, por ser como es, alegre, cariñosa, dadivosa, y que la quiero un montón, porque siempre esta en el momento oportuno para levantarte el animo y por ser una persona servicial.

A la Dra. Tere Garcia, directora de esta tèsis, por su apoyo moral e intelectual, por ser una persona de ètica, y que siempre tiene las manos abiertas para ayudar a la persona que lo necesite.

A Judith, especialmente, que es un apoyo incondicional, como amiga y como compañera de trabajo, porque es como mi tercera hermana.

Al padre Fili, al padre Nabor y al padre Rogelio, por ser mis guías espirituales y gracias a las Madres del Dulce nombre de Jesús por sus oraciones.

A mis amigas de la carrera, Tere, Judith, Lupita, Marilu y un amigo, Raül, por su apoyo en los momentos difciles y gratos que compartimos juntos dentro de la escuela.

A mis amigas Tetè, Ana Luisa y Marcela, porque los cinco años de amistad y espero que sean mas.

A Chayito, gracias por su apoyo moral y por los momentos divertidos y agradables que me diò, porque siempre tenia una palabra de aliento y un consejo.

Al Doc. Raül, al Doc Jose Luis, a Richard y a la niñas del racho (Juanita, Sonia, Lorena, Maggy, Blanca, Inès, Gaby y Luci) por los buenos momentos tan agradables e inolvidables que compartimos durante casi un año.

A Celia y Armando, mis vecinos, por ser los mejores amigos de la familia, por su apoyo incondicional y por las atenciones que han tenido para con mi familia.

Gracias a todas las personas que han pasado por estos 24 años de vida y que siempre llevo en mi corazón, son muchas personas a las que quisiera agradecer pero nunca terminaría, pero a todas ellas gracias porque han dejado sembrada una semillita en mí

DEDICATORIA

Este trabajo y esfuerzo se lo dedico a todos los jóvenes, que por alguna u otra razón, no han tenido las mismas oportunidades que yo, ni los beneficios que he recibido. Se lo dedico a todos ellos, para que nunca pierdan la esperanza ni la fe, y que siempre confien en un padre Dios que nos ama, y que nos da siempre cosas buenas, aunque a veces no lo parezca.

SOLO DIOS BASTA

INDICE GENERAL

	Página
Contenido	i
INDICE GENERAL	iii
INDICE DE CUADROS	iv
INDICE DE FIGURAS	
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Lectinas	3
2.1.1. Descripción e Historia	3
2.1.2. Estructura y clasificación	4
2.1.3. Función	8
2.1.4. Aplicaciones	8
2.2. <i>Phaseolus acutifolius</i>	10
2.2.1. Descripción botánica	10
2.2.2. Ecología y fitogeografía	11
2.3. Cáncer	13
2.3.1. Definición	13
2.3.2. Proliferación y ciclo celular	15
2.3.3. Fenotipo de una célula cancerosa	17
2.3.4. Causas del cáncer	18
2.3.5. Genética del cáncer	20
2.3.6. Apoptosis y cáncer	21
2.3.7. Lectinas y cáncer	23
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	27
General	27
Específicos	27

5.METODOLOGÍA	28
5.1. MATERIALES	28
5.1.1. Reactivos	28
5.1.2. Material vegetal	28
5.1.3. Líneas celulares	28
5.2. MÉTODOS	29
5.2.1. Cromatografía de intercambio iónico	29
5.2.2. Actividad aglutinante específica de la lectina	29
5.2.3. Ensayos <i>in vitro</i> de las fracciones de lectina	30
5.2.4. Análisis estadístico	32
6.RESULTADOS	32
6.1. Determinación de proteína en la fracción P-65 de frijol tépari	32
6.2. Fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular	32
6.3. Perfil Electroforético	35
6.4. Ensayos biológicos <i>in vitro</i> de la fracción P1-G75	35
6.5. Determinación de la concentración letal media	40
6.6. Efecto citotóxico	40
7. DISCUSIÓN	42
8. CONCLUSIONES	45
9. BIBLIOGRAFIA	47

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Función de las lectinas	9
2	Efecto del la fracción P1-G75 sobre los porcentajes de proliferación y supervivencia de células normales y cancerígenas.	41

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Planta de frijol tépari.	12
2	Secuencia de etapas de la metástasis	14
3	Puntos de control en el ciclo celular.	16
4	Factores de riesgo de cáncer	19
5	Activación de mecanismos específicos que conducen a la muerte celular	22
6	Cromatografía de intercambio iónico de la fracción proteínica de frijol tépari P-65.	33
7	Cromatografía de exclusión molecular de G-75 a partir de la fracción P- 65 de frijol tépari.	34
8	Perfil electroforético de las proteínas en las fracciones obtenidas de la semilla de frijol tépari.	36
9	Efecto de la fracción P1-G75 sobre la proliferación y sobrevivencia de fibroblastos 3T3 v-mos.	37
10	Efecto de la fracción P1-G75 sobre la proliferación y sobrevivencia de fibroblastos 3T3 normales.	38
11	Efecto de la fracción P1-G75 sobre la proliferación y sobrevivencia de células HeLa.	39

RESUMEN

Las lectinas son proteínas que se unen a carbohidratos de manera no covalente, de manera reversible y con alta especificidad. Cada una contiene dos sitios o más de unión que reaccionan con los azúcares en la superficie de las células causando su entrecruzamiento y precipitación, fenómeno conocido como aglutinación. Las lectinas se encuentran en todos los seres vivos, desde virus y bacterias hasta plantas y animales. Se ha estudiado el efecto de las lectinas sobre otros organismos y sus funciones, se dice que en plantas tienen que ver con la simbiosis de las bacterias que fijan el nitrógeno y las leguminosas, también se piensa que son un sistema de defensa contra depredadores como invertebrados, animales superiores y agentes como hongos fitopatógenos. También se sabe que las lectinas son mayormente afines por los carbohidratos ausentes en las plantas, pero que son importantes en animales, por lo que funcionan como sistemas de defensa. Entre las lectinas más estudiadas se encuentran las pertenecientes a las leguminosas, de donde de cada semilla se pueden aislar diferentes tipos. Las lectinas típicas cuentan de dos a cuatro subunidades idénticas, con un peso molecular entre 25 a 30 kDa cada una con carbohidratos pequeños y un ión (Ca^{+2} o Mn^{+2}) por subunidad. Las subunidades constan de cadenas con aproximadamente 250 restos de aminoácidos. En células cancerosas, la glicosilación se encuentra generalmente alterada y se presume que tal situación contribuye al desarrollo del cáncer. Lectinas como la concanavalina A y la fitohemaglutinina de frijol común (PHA) se han utilizado para realizar estudios de comparación histoquímica entre células normales y cancerosas y entre diferentes etapas del proceso maligno. Se ha observado que, lectinas de diferentes fuentes, inhiben el crecimiento de células cancerosas en función de la concentración y de manera diferencial. Las lectinas son capaces de inducir apoptosis y activar el sistema inmune mediante la estimulación de la proliferación de linfocitos T. Por otro lado, las lectinas de origen alimenticio estimulan la diferenciación de células de cáncer de colon. El objetivo del presente estudio fue determinar los efectos de la lectina del frijol Tépari sobre la proliferación de fibroblastos de ratón transformados con tres líneas celulares de diferentes tipos de cáncer así como determinar la dosis letal, subletal y letal media de fibroblastos de ratón transformados con células v mos

1. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son relativamente tóxicas para el hombre y los animales debido a la presencia de lectinas, proteínas que contienen uniones a carbohidratos. Las lectinas de plantas son usualmente consideradas como un grupo complejo y heterogéneo de proteínas debido a diferencias en su estructura molecular, propiedades bioquímicas y especificidad para ligar carbohidratos. Se conocen cuatro familias de lectinas: las lectinas de leguminosas, lectinas que ligan quitina, proteínas de tipo 2 y las lectinas que ligan manosa. Actualmente se reconocen por separado subgrupos de lectinas: jacalina, la de amaranto y la de *Curcubitaceae phloem*. La primera evidencia de que las lectinas son glicoproteínas que ligan a carbohidratos se debió a la observación de que el azúcar de la caña inhibía la actividad aglutinante de la Concavalina A.

La interacción de las lectinas con células y membranas se ha investigado por mucho tiempo mediante ensayos de aglutinación/precipitación, los cuales revelan parte de los mecanismos de la membrana celular o su topología como consecuencia de la interacción lectina-membrana. La especificidad de las lectinas ha permitido establecer una serie de herramientas para análisis, como la forma de diferenciar los tipos sanguíneos. Lo anterior se basa en que lectinas de semillas de leguminosas, específicamente aglutinan células de ciertos tipos de sangre dentro del sistema ABO, sin afectar células de otros grupos. Este descubrimiento fue el principal motivo para introducir el término de lectina (de latín "legere" que significa "seleccionar"), los términos de aglutinación y hemaglutinación persisten como sinónimos.

Las lectinas son una herramienta importante para la investigación estructural y funcional de carbohidratos complejos, para la evaluación de cambios que ocurren en la superficie celular durante los procesos fisiológicos y patológicos y para la identificación de células de cáncer. Se ha demostrado que las lectinas poseen propiedades citostáticas y citotóxicas en contra de células tumorales y ciertas lectinas reaccionan con células transformadas malignas, pero no con células normales. Los sitios de unión de las lectinas específicas para carbohidratos

permiten una caracterización fenotípica y funcional de las glicoproteínas asociadas a las membranas que se expresan en células de cáncer. Debido a lo anterior, existe gran interés en aislarlas, purificarlas y caracterizarlas para su uso en medicina humana, específicamente contra células tumorales. Por lo anterior, en el presente trabajo se determinó la especificidad de lectinas de frijol tépari para reconocer células transformadas, así como para determinar su efecto sobre la proliferación y la sobrevivencia celular.

2. ANTECEDENTES

2.1. LECTINAS

2.1.1. Descripción e Historia

Las lectinas son un grupo de proteínas de origen no inmune, en su mayoría glicoproteínas, que están presentes en la mayoría de los seres vivos; tanto en el reino animal, vegetal y en microorganismos como bacterias, protozoarios y virus. Son capaces de un reconocimiento específico para un determinado carbohidrato uniéndose reversiblemente, sin alterar la estructura covalente de los ligandos glicosídicos reconocidos. La palabra lectina proviene del latín *legere* que significa "recoger o escoger", ya que ligan ciertos grupos de carbohidratos específicos en la superficie de la célula. Por ejemplo la Concaivalina A liga residuos de D-glucosa y D-manosa, mientras que la lectina de frijol de soya se une a la D-galactosa y a la N-acetil-D-galactosamina. Una de las características más notables y significativas es el hecho de que algunas lectinas aglutinan células de tumores malignos.

El primer estudio sobre lectinas lo reportó Stillmark en 1888, al observar el fenómeno de hemaglutinación con extractos de semilla de *Ricinus communis*, cuya proteína llamada ricina, aglutina eritrocitos. Posteriormente, Hellín estudiando semillas de *Abrus precatorius* encontró otra proteína que también producía aglutinación de eritrocitos llamada abrina. Fue hasta el año de 1919 que se obtuvo la primera lectina en forma cristalina, descubierta por James B. Summer a partir del frijol *Canavalia ensiformes*, llamada Concanavalina A. En la década de los años 40 dos investigadores, Rose M. Reguera y William C. Boyd, reportaron que ciertas semillas contenían aglutininas específicas para antígenos de los grupos sanguíneos humanos. El primero en plantear el término lectina fue Boyd en 1954, al observar que algunas aglutininas obtenidas de semillas de plantas podían reconocer a un grupo sanguíneo específico y aglutinarlo (Van Damme y col., 1998).

La primera lectina bacteriana se encontró entre los años 50 y 60, en los laboratorios Duguid. En la superficie celular de algunas bacterias de la familia Enterobacter hay una lectina específica para residuos de manosa y otras lectinas, como la de la superficie celular de *E. coli*, son específicas para los residuos de galactosa. Los

microorganismos reconocen receptores celulares que corresponden a diferentes familias de proteínas y compuestos en los cuales se encuentran glicolípidos, glicoproteínas y proteínoglicanos que facilitan la colonización y los procesos de invasión. La elevada resistencia de las lectinas a la degradación proteolítica les permite pasar intactas a través del tracto digestivo. Así, las lectinas se unen fuertemente a los receptores del epitelio del tracto gastrointestinal y estimulan el crecimiento del intestino delgado y del páncreas. La afinidad de las lectinas por las células epiteliales difiere en especie y edad del animal. Sin embargo, el efecto de las lectinas puede impactar la capacidad de las células epiteliales para absorber nutrientes de la pared intestinal o bien incrementar la permeabilidad de la barrera de la mucosa a ciertas macromoléculas (Riaño-Sánchez, 1997).

2.1.2. Estructura y Clasificación.

Mediante la secuenciación de genes se ha proporcionado información acerca de la estructura primaria de las lectinas de leguminosas, se han determinado los productos de la traducción primaria que provienen de los RNAm y su conversión en los polipéptidos maduros de lectinas. Estudios de biosíntesis y topogénesis de una variedad de lectinas de leguminosas han demostrado que las proteínas se sintetizan en el retículo endoplasmático (como pre-proteínas) y subsecuentemente entran a la vía de secreción. El proceso postraduccional incluye la remoción del péptido señal y en algunos casos la N-glicosilación. Las lectinas están compuestas por una cadena polipeptídica en la cual pueden estar unidos uno o más residuos de carbohidratos, normalmente de 2 a 15 monosacáridos residuales. Éstos son principalmente D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido salicílico, glucosamina y galactosamina (Peumans y Van Damme, 2002).

Una manera de clasificar a las lectinas es en base a su estructura: a) simples, b) mosaico y c) macromolecular. Cada clase se puede subdividir en diferentes familias con secuencias y propiedades estructurales similares. Las lectinas simples comprenden prácticamente todas las lectinas conocidas de las plantas, presentan un pequeño número de subunidades, no necesariamente idéntica, con peso

molecular debajo de 40 kDa. Éstas se dividen en lectinas de leguminosas, de cereales, las del género *Amaryllidaceae*, las del género *Moraceae*, las del género *Euphorbiaceae*, y las galectinas. En el grupo de mosaico, hay una diversidad de proteínas de diferentes orígenes, por un lado las lectinas de origen viral y por otro las de origen animal (tipos C, P, I). Las lectinas del grupo de macromoléculas están formada por las de bacterias, especialmente en la forma de fimbrias o pilis (organelos filamentosos de superficie) (Lis y Sharon, 1998). Se han encontrado varios tipos de lectinas, en una gran diversidad de seres vivos.

a) Lectinas vegetales. Se encuentran específicamente en los cotiledones y endospermos de las semillas de algunos vegetales como el trigo, frijol, soya, etc. Entre las lectinas de vegetales mejor conocidas se encuentran las siguientes:

- ◆ La Concanavalina A, que es una proteína que se obtiene de *Cannavalia enzyformis* y actúa específicamente uniéndose a restos de α -D-glucosa y α -D-manosa.

- ◆ La aglutinina de germen de trigo, también llamada fitohemaglutinina, cuyo sitio de unión es con los ácidos β -N-acetilneuramínico y α -N-acetilneuramínico.

- ◆ Otra lectina vegetal importante es la que se encuentra en el frijol rojo, *Phaseolus vulgaris*. Se sabe que tiene acción mitogénica (estimuladoras del ciclo celular) y tiene la capacidad de aglutinar específicamente células malignas, lo cual ha desarrollado un gran interés en investigación para utilizarlas como tratamiento para el control de crecimiento de tumores. Todas las lectinas de leguminosas están constituidas por protómeros (productos maduros de la primera traducción del RNAm de la lectina) de aproximadamente 30 kDa. La mayoría de los protómeros consisten de una cadena polipeptídica simple de aproximadamente 250 residuos y, en algunos casos, están separados en dos pequeños polipéptidos que pueden ser, similares o no en su tamaño. Una lectina de leguminosa nativa contiene dos o cuatro protómeros que se mantienen unidos por interacciones no covalentes. La formación de los di o tetrámeros implica que la lectina de la leguminosa puede ocurrir en ocho diferentes formas moleculares.

Las lectinas de leguminosas son el único grupo de lectinas que contienen cationes divalentes con un sitio específico para ligar el metal. Cada subunidad contiene iones calcio o magnesio, los cuales son esenciales para la unión a carbohidratos. Básicamente, los promotores de las lectinas de leguminosas consisten de una o dos cadenas 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 la hoja β , le proporciona una estructura rígida y fuerte que puede explicar la extrema resistencia de las lectinas de leguminosas al ataque proteolítico (Lis y Sharon, 1998). Se ha propuesto que, debido a su amplia distribución en vegetales, las lectinas pueden proteger a la planta de ataques de bacterias, hongos y virus patógenos a lo largo de su desarrollo, en diferentes etapas como: absorción, germinación y desarrollo de las semillas. Además, se les han dado otros usos a las lectinas vegetales como promotoras de adhesión entre diversas células (Machuka y col., 1999).

b) Lectinas animales, que se han encontrado tanto en invertebrados como: caracoles, cangrejos, camarones, moluscos, peces y lombrices, están contenidas en la hemolinfa y órganos sexuales. También se han encontrado en vertebrados como el cerdo.

Se cree que las galectinas de origen animal tienen una función en la adhesión celular. Estas lectinas se encuentran dentro del citoplasma y en el núcleo de las células y ocasionalmente en la superficie y fuera de la célula. Son esenciales para el desarrollo normal y la diferenciación de todas las células del animal. Es por eso que la galectina-1 se expresa en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Altos niveles de galectina-3, presentes en la superficie celular durante la metástasis en células de cáncer, es la responsable de la adhesión de las células a los órganos blanco (Lis y Sharon, 1998).

c) Lectinas microbianas. Existe un tipo de lectinas que se localizan en la superficie de microorganismos tales como bacterias, virus, hongos y parásitos y se les denomina adhesinas. Juegan un papel importante al colonizar mucosas

produciendo lesiones tisulares. Existe otro tipo de lectinas microbianas que se han identificado y se sabe que se unen específicamente con los sialoglicoconjugados de *Bordetella*, y otros microorganismos y se les denomina proteínas Gac-p que significa "proteínas microbianas de unión a glicosaminoglicanos". Estas proteínas Gac-p tienen la capacidad de ligarse a glicosaminoglicanos sulfatados (heparan sulfatos) presentes en la superficie de células eucariotas facilitando la adherencia del agente patógeno a dichas células (Lis y Sharon, 1998).

d) También hay varias familias de virus que presentan moléculas de adhesión, capaces de crear puentes entre eritrocitos de varias especies. Las hemaglutininas virales pueden ser divididas en tres grandes grupos:

- ◆ Las de ortomixovirus (influenza A, B y C) y paramixovirus (PIV, VRS), en la cual la partícula viral y la hemaglutinina no pueden ser separadas porque tiene actividad enzimática que causa elusión y destrucción de receptores de glóbulos rojos, (enzima destructora de los receptores) que ahora se sabe corresponde a una sialidasa.

- ◆ La de los reovirus (rotavirus y similares) y arbovirus (fiebre amarilla, dengue, equinas y similares), en los cuales la partícula viral sólo contiene la hemaglutinina pero posee actividad enzimática (sialidasa).

- ◆ La de los poxvirus (viruela y otros virus similares), en los cuales la hemaglutinina se produce durante la replicación del virus y es diferenciable de la partícula viral.

La hemaglutinación es inhibida específicamente por anticuerpos que se conocen como inhibidores de hemaglutinación (HI), que permiten distinguir diferentes virus como los de influenza, se sabe que es específica de cepa y se puede utilizar con fines de clasificación (Riaño-Sánchez, 1997).

2.1.3. Función

Las lectinas han sido estudiadas ampliamente, su importancia principal radica en sus propiedades biológicas tales como la aglutinación de eritrocitos y otras células, en la inducción de mitosis, efectos citotóxicos sobre los linfocitos y aglutinación de virus (Zarkovic y col., 1998). Han sido utilizadas en:

- a. Estudios químicos de estructuras de sustratos de la superficie celular de grupos sanguíneos y en la tipificación de los mismos.
- b. Para probar azúcares en la superficie celular y en otros procesos de reconocimiento mediados por interacciones específicas de carbohidratos con receptores
- c. Para determinar la patogenicidad de los microorganismos en sus relaciones de adhesión a la célula (Riaño-Sánchez, 1997).

Las lectinas han llamado la atención de numerosas investigaciones debido a las diversas funciones que pueden realizar, incluyendo la inhibición de la proliferación, la antitumorigénesis, como inmunomoduladores, antifúngicos, antivirales e inhibición de la transcriptasa HIV-1 (Wong y Ng, 2002). Tienen efectos potentes sobre la proliferación y diferenciación de diferentes células animales, incluyendo linfocitos, osteoblastos y condrocitos (Nishimura y col., 2004).

La función que realizan las lectinas depende del organismo del que se trate (Cuadro 1) (Riaño-Sánchez, 1997).

2.1.4. Aplicaciones

Para purificar lectinas se utilizan métodos cromatográficos como:

- Cromatografía de afinidad
- Cromatografía de filtración en gel
- Cromatografía de intercambio iónico
- Cromatografía de líquidos
- Electroforesis

Cuadro1. Función de las lectinas

ORGANISMO	FUNCIÓN
Microorganismos (bacterias, virus, hongos, parásitos, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> • Determinantes de la patogenicidad de bacterias y de parásitos. • Reconocimiento de determinantes no inmunes en la fagocitosis. • Reconocimiento de determinantes de la adhesión celular.
Plantas*	<ul style="list-style-type: none"> • Unión de bacterias fijadoras de Nitrógeno en leguminosas • Protección contra fitopatógenos
Animales	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación de migración y adhesión celular. • Endocitosis y traslocación intracelular de glicoproteínas. • Reconocimiento de la adhesión no inmune en la fagocitosis. • Unión de las bacterias a células epiteliales.

*Las lectinas de leguminosas juegan un papel doble. Por un lado bajo condiciones normales, son un almacén genuino de proteínas. Por otra parte actúan como proteínas de defensa contra depredadores (Riaño-Sánchez, 1997).

Las lecitinas tienen gran utilidad en áreas como genética, medicina e inmunología (Albores y col., 1987).

- Propiedades mitogénicas (Sistema Inmune)
 - Evaluación de la producción de citocinas (interferón e interleucinas).
 - Determinación de fenómenos de la respuesta inmune (inmunosupresión).
 - La relación que existen entre virus patógenos y su resistencia a ellos.
 - Evaluación de terapias antirretrovirales.
 - Efectos citotóxicos de algunas drogas en células mononucleares.
 - Efectos de la nutrición en la proliferación de linfocitos.
 - Inducción de genes en linfocitos.
 - La detección de anomalías cromosómicas.
- Caracterización e identificación de grupos sanguíneos.
- Se ha propuesto que podrían en el futuro utilizarse como vacunas:
 - Actúan contra un amplio rango de microorganismos.
 - Capaces de estimular la inmunidad a diferentes niveles del ciclo de los microorganismos patógenos (Riaño-Sánchez, 1997).

2.2. *Phaseolus acutifolius*

2.2.1. Descripción botánica

Nombre botánico: *Phaseolus acutifolius* A. Gray

Familia: Fabaceae

Nombres Comunes: Inglés: tepary bean; maya: xmayum (Campeche, México); español: tépari (Sonora, México), frijol piñuelero (nombre de un híbrido) (Costa Rica), escumite o escumite (Chiapas, México).

Esta especie ha crecido por un largo tiempo en Mesoamérica, principalmente como vegetal en zonas desérticas o áreas con un período largo de sequía (González de Mejía y col., 1989). Se ha encontrado que esta especie creció en tiempos antiguos en el sureste de los Estados Unidos (de donde aparentemente penetró a México 1200 años d. de C.) y Puebla (donde existió 5000 años después). La distribución geográfica se extendió hacia Arizona, Nuevo México, Costa Rica y en el suelo

subtropical seco del Pacífico. La distribución de *P. acutifolius* es esporádica, lo que se ve reflejado en el mercado (García-Cruz, 2004). El producto principal es una semilla seca, la cual es comestible debido a su alto contenido de proteínas (17 a 27%) y de carbohidratos (Albores y col., 1987). Es una hierba, enredadera, anual, con vaina la cual tiene de 5 a 9 variaciones de color (Figura 1). Sus hojas son cercanas al tamaño de las hojas del frijol lima; la vaina es corta, cerca de 6 a 7 cm, peluda y verde. Usualmente hay de 5 a 6 semillas por vaina (García-Cruz, 2004). Al igual que el frijol común, la especie del tépari es relativamente tóxica para el hombre y los animales, posiblemente por la presencia de fitoaglutininas, sin embargo, durante el proceso de cocción las lectinas se desnaturalizan (González de Mejía y col., 1989).

2.2.2. Ecología y Fitogeografía

No se conoce con precisión dónde se empezó a domesticar esta especie. Algunas de las causas del descuido del frijol tepari son la pérdida de consumo tradicional en las comunidades indígenas y la escasez de demanda en los grandes mercados, posiblemente por su mayor tiempo de cocimiento. Sin embargo, su potencial cultivo en áreas desérticas es extenso debido a su resistencia a la sequía y al calor. Su forma de cultivo consiste en un ciclo corto, floreciendo de 27 a 40 días después de su germinación y maduran de 60 a 80 días. Las semillas pueden resistir temperaturas de 35° C (otras especies de *Phaseolus* no resisten esta temperatura), es resistente al pulgón y puede crecer en presencia de hierba. El cultivo se ha encontrado de 50 a 1920 m sobre el nivel del mar, requiere de una precipitación anual de 250 a 300 mm, aunque crece en México en regiones con una precipitación de 150 mm (Sonora) a 750 mm (Campeche). Crece en suelos secos, arenosos, lodosos, y algunas veces en suelos orgánicos con un pH 6.7 a 7.1. Su semilla se presenta en dos formas: una medianamente redonda blanca o negra y la otra rómbica que puede ser blanca, verdosa, gris, amarilla oscura, negro o violeta. El promedio en peso de 100 semillas de tépari cultivados es entre 10 y 20 g y en su forma silvestre, entre 2 y 5 g. Aunque los cultivados y los silvestres no tienen un hábitat definido, es necesario un ambiente desértico (Riaño-Sánchez, 1997).



Figura 1. Planta de frijol tépari (García-Cruz, 2004).

El frijol tépari contiene diferentes lectinas, tanto eritro como linfoaglutininas. Estas proteínas se presentan principalmente como tetrámeros con subunidades de masa molecular relativa entre 28 kDa (Pusztai y col., 1987) y 34 kDa (González de Mejía y col., 1989) Se ha reportado que las lectinas de frijol tépari contienen residuos glicosilados, principalmente manosa y glucosamina (Pusztai y cols., 1987).

2.3. CANCER

2.3.1. Definición

El cáncer es una enfermedad producida por cambios en la conducta de las células debidos a mutaciones. Debido a estas alteraciones, las células cancerosas proliferan sin control, formando tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva. Las células mutadas proliferan a expensas de las células vecinas y al final destruyen toda la masa celular, este proceso ocurre por períodos y puede durar meses o años.

En tanto el crecimiento celular permanezca localizado, la enfermedad se puede tratar y curar por extirpación quirúrgica del tumor y del tejido que lo rodea. Sin embargo, una de las características prominentes de los tumores malignos es su tendencia a formar *metástasis*. En este caso, las células se desprenden de la masa original y entran a la circulación linfática o sanguínea para propagarse a sitios distantes en el cuerpo, donde establecen tumores secundarios que ya no son susceptibles de extirpación quirúrgica (Alberts y col., 1999).

Las células de cáncer se caracterizan por dos propiedades: 1) proliferan en condiciones deficientes a las restricciones normales, 2) invaden y colonizan tejidos reservados para otras células. La combinación de estos puntos es lo que hace al cáncer una enfermedad peligrosa. La invasividad generalmente implica la habilidad de entrar al torrente sanguíneo o a los nódulos linfáticos y formar tumores secundarios en otros sitios del cuerpo; en esta etapa es muy difícil erradicar el tumor (Figura 2) (Avers, 1986).

El cáncer se clasifica de acuerdo al tejido y al tipo de célula de donde proviene. Por ejemplo, los que provienen de células epiteliales se denominan carcinomas, los que

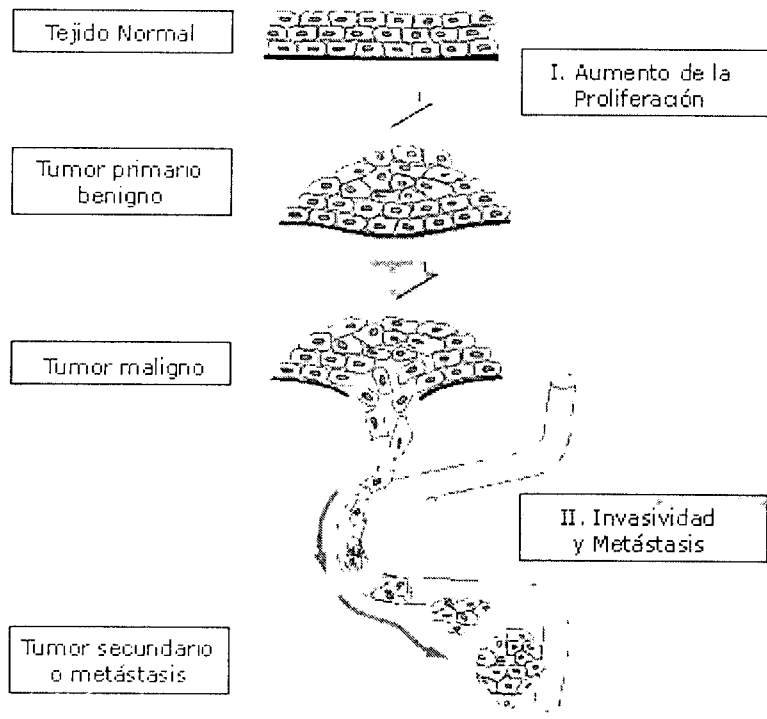


Figura 2. Secuencia de etapas de la metástasis (Avers, 1986).

forman parte del tejido conectivo o células musculares son sarcomas. El cáncer que no entra dentro estas dos categorías incluye a varias leucemias derivadas de las células hematopoyéticas o linfáticas y los del sistema nervioso (Karp, 1996). Los carcinomas representan cerca del 90% del cáncer en humanos, quizá porque la mayor parte de la proliferación celular ocurre en la parte epitelial o puede ser que este tejido está más expuesto a daños físicos o químicos que favorecen el desarrollo del cáncer (Alberts y col., 1999).

2.3.2. Proliferación y ciclo celular

La proliferación celular es la base del desarrollo del organismo humano a partir del cigoto, según un modelo de divisiones celulares en el que cada tipo celular se divide cuanto y cuando debe, pero es también la raíz del primero de los procesos que origina un cáncer. La serie de procesos (a veces también el período que abarcan) por los que una célula da lugar a dos células hijas se denomina ciclo celular, el cual consta de cuatro fases: G_1 , S, G_2 y M. En su conjunto, y aunque hay variaciones, el ciclo completo dura unas 24 horas y la existencia de puntos de control es clave (Figura 3). Existen controles negativos de la proliferación muy importantes para la prevención del cáncer que se activan para detener el ciclo celular o inducir la muerte celular programada, cuando se ha dañado la integridad del genoma, y evitar la aparición de células cancerosas. Entre las alteraciones que pueden provocar cáncer se encuentran muchos carcinógenos químicos y radiaciones que actúan dañando el DNA, así como también causas internas como el reordenamiento genético que tienen lugar durante el desarrollo. La apoptosis o la pérdida de telómeros son procesos críticos para evitar la aparición de células cancerosas sin embargo, en células dañadas dichos sistemas de control están relajados o incluso faltan totalmente (Muñoz, 1997).

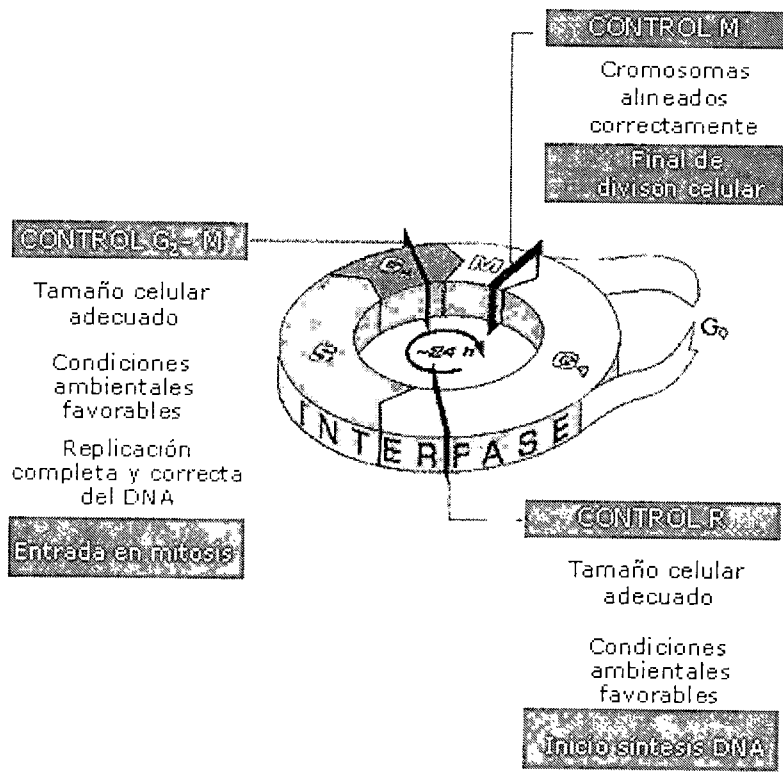


Figura 3. Puntos de control en el ciclo celular (Muñoz, 1997).

2.3.3. Fenotipo de una célula cancerosa

La conducta de las células cancerosas es más fácil de estudiar cuando las células crecen en cultivo. Alternativamente las células normales pueden convertirse en "células cancerosas" mediante tratamientos con carcinógenos químicos, radiaciones o virus tumorales infecciosos. Las alteraciones más notables después de la transformación ocurren en los cromosomas. En general, las células normales conservan su dotación cromosómica diploide normal conforme crecen y se dividen, tanto *in vivo* como *in vitro*. En contraste, las células cancerosas con frecuencia presentan dotación cromosómica aberrante, alteración denominada aneuploidía. Los cambios morfológicos más notables que ocurren en el citoplasma casi siempre afectan al citoesqueleto. En tanto una célula normal por lo general contiene una red bien organizada de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, el citoesqueleto de las células cancerosas a menudo está reducido, desorganizado o ambas cosas. También ocurren numerosos cambios en la superficie celular, incluyendo la aparición (o incremento) y desaparición (o disminución) de componentes particulares. Algunas células cancerosas poseen nuevas proteínas en la superficie celular conocidas como antígenos asociados al tumor porque pueden inducir la formación de anticuerpos dirigidos contra dichas células. Típicamente las células cancerosas son menos adherentes, tanto entre sí como a los sustratos no celulares. Se cree que esta pérdida de adhesividad se correlaciona con la capacidad de las células cancerosas para abandonar la masa tumoral y emigrar a otros sitios dentro del cuerpo. La disminución de las interacciones adhesivas entre células tumorales, también refleja una reducción de su tendencia a formar uniones entre sí (Karp, 1996).

Se pueden distinguir las células cancerosas de las normales por su movilidad en cultivo. Cuando una célula normal está en contacto con otra célula cesa su proliferación y movimiento, ya que no pueden desplazarse unas sobre otras, y forman una capa en el fondo del plato de cultivo. Las células cancerosas, por lo general, ignoran las señales transmitidas por las células vecinas y continúan sus actividades locomotoras acostumbradas; proliferan en cultivo hasta alcanzar una densidad celular muy alta en comparación con sus contrapartes normales. Las

células cancerosas en cultivo también dependen mucho menos de la presencia de suero, el cual les suministra factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico o insulina. Además, a diferencia de las células normales que requieren un sustrato sólido sobre el cual crecer, las células cancerosas generalmente pueden crecer suspendidas en un medio formado por agar suave o metilcelulosa viscosa. Por esta característica, se dice que las células cancerosas han perdido su dependencia a la fijación, indispensable para el crecimiento de células normales. Más importante aún, las células normales en cultivo muestran capacidad limitada para la división celular; luego de que un número finito de divisiones mitóticas sufren un proceso de envejecimiento que las incapacita para continuar creciendo y dividiéndose. Las células cancerosas aparentemente son inmortales en el sentido de que continúan dividiéndose de manera indefinida (Avers, 1986).

2.3.4. Causas del cáncer

En 1775, el cirujano británico Percival Pott estableció la primera correlación conocida entre un agente ambiental y el desarrollo de cáncer, cuando concluyó que, la elevada incidencia de cáncer en la cavidad nasal y en la piel del escroto observada en limpiadores de chimeneas, se debía a su exposición crónica al hollín (Avers, 1986). Se han aislado sustancias químicas carcinógenas del hollín junto con cientos de compuestos que han demostrado capacidad para causar cáncer en animales de laboratorio. Además de varias sustancias químicas, se han encontrado un gran número de otros tipos de agentes carcinógenos, incluyendo varios tipos de radiación ionizante y algunos virus que contienen DNA y RNA. Todos estos agentes muestran una propiedad en común: pueden provocar cambios en el genoma. Las sustancias químicas carcinógenas, como las presentes en el hollín o en el humo de cigarro, son mutágenos directos o se pueden convertir en compuestos mutagénicos por acción de enzimas celulares (Figura 4). De igual manera la radiación ultravioleta, causa principal del cáncer de piel, también es un potente mutágeno (Karp, 1996).

Por su parte, algunos virus son capaces de infectar células de vertebrados y transformarlas en células cancerosas. Estos virus se dividen en dos grupos: virus



Figura 4. Factores de riesgo de cáncer (Karp, 1996).

DNA tumorales y virus RNA tumorales, según el tipo de ácido nucleico encontrado en la partícula viral madura. Entre los virus DNA capaces de transformar células se encuentran el virus polio, el virus del simio 40 (SV40), el adenovirus y virus parecidos al herpes. Los virus RNA tumorales o retrovirus tienen una estructura similar al VIH. Los virus tumorales pueden transformar células debido a que contienen genes cuyos productos interfieren con las actividades normales de regulación del crecimiento de la célula (Alberts y col., 1999).

Entre los factores que incrementan el riesgo de cáncer se encuentran el estilo de vida, la exposición ocupacional y la susceptibilidad genética. Por ejemplo, el cáncer de la cavidad oral se ha relacionado al tabaco o al uso de la pipa, al consumo de carne y grasa animal, el alcohol actúa como sinergista. Otro factor que puede contribuir es el consumo de chile rojo picante (Tanaka, 1995).

2.3.5. Genética del cáncer

El desarrollo de un tumor maligno (tumorigénesis) es un proceso de múltiples etapas, caracterizado por la progresión de alteraciones genéticas que reducen cada vez más la capacidad de respuesta de las células al mecanismo regulador normal del cuerpo y las vuelve más capaces de invadir tejidos normales. En muchos casos, la primera etapa en el desarrollo de un tumor maligno es la formación de un tumor benigno compuesto de células que ya no responden al control de crecimiento normal, pero que carecen de la capacidad para invadir tejidos normales, o provocar metástasis. Se pueden distinguir tres fases distintas, éstas se conocen como inicio, promoción y progresión.

En la etapa de iniciación se presenta un daño químico y permanente al ADN que no es reparado. Para que se inicie la carcinogénesis se deben presentar por lo menos 5 mutaciones en genes claves conocidos como oncogenes y/o genes supresores de tumores.

En la segunda etapa, la célula iniciada libera al medio ciertas proteínas que incrementan la proliferación celular generando un tumor. En caso de encontrarse encapsulado se denomina tumor benigno y puede ser extirpado quirúrgicamente sin presentar mayor problema para el paciente; pero de no ser así, el tumor pasa a la siguiente etapa del proceso cancerígeno llamada progresión (Karp, 1996).

En la última etapa del proceso maligno, las mutaciones adquiridas por la clona tumoral le confieren a las células diversas capacidades, principalmente la degradación de la matriz extracelular (García-Cruz, 2004).

2.3.6. Apoptosis y cáncer

El fenómeno de apoptosis o muerte celular programada es mucho más común de lo que puede pensarse (Figura 5), se produce de modo natural durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano en múltiples tejidos. Durante el ciclo celular, se produce apoptosis mediada por el gen supresor p53 u otros mecanismos cuando el DNA que va a ser o está siendo replicado presenta alteraciones, evitándose así la generación de células anormales.

La mayor parte de los agentes empleados en quimioterapia anticancerosa basan su acción en la producción de roturas y/o alteraciones en el DNA de las células. Una droga llamada Abrina-a, obtenida de la semilla de *Abrus precatorius*, consiste de una cadena polipeptídica A con actividad N-glicosídica, que inhibe la síntesis de proteínas y una cadena B, una lectina, responsable de la unión a los receptores de la superficie celular y la penetración de la molécula de Abrina-a al interior de la célula. Se ha encontrado que esta droga distingue entre células normales y cancerosas. Esta droga ha atraído un gran interés por su efecto y citotóxico, acompañado de la inducción de apoptosis (Ohba y col., 2004).

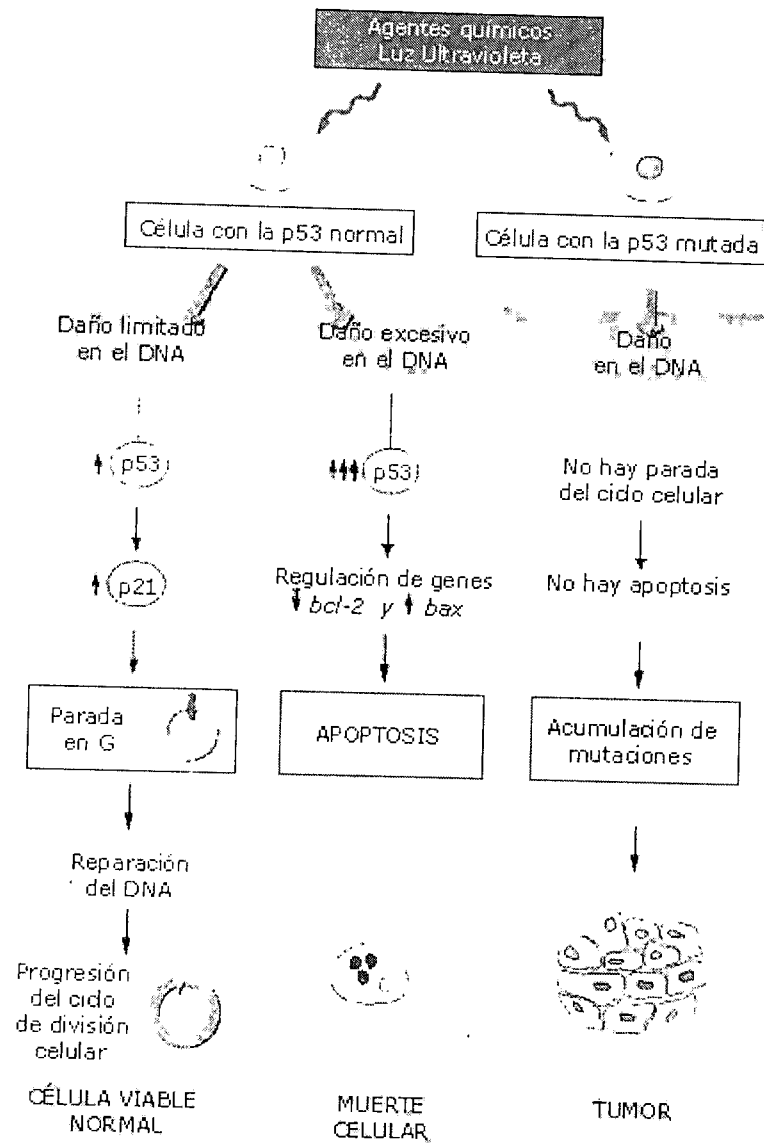


Figura 5. Activación de mecanismos específicos que conducen a la muerte celular (Muñoz, 1997).

Desgraciadamente, una de las causas de fallo de los tratamientos quimioterapéuticos es la resistencia a la muerte apoptótica de las células tumorales, como consecuencia de la mutación de genes como p53. Por ello, el estudio de los agentes, genes y mecanismos implicados en la apoptosis y su regulación es una de las líneas de investigación prioritarias. Cabe pensar que la activación específica de las rutas de inducción de apoptosis (sin necesidad de utilizar compuestos que dañen el DNA, o que actúen en etapas del proceso posteriores a la intervención de p53) tendrían la ventaja de ser eficaces en células con el gen p53 mutado, como son la mayoría de las células cancerosas (Muñoz, 1997).

2.3.7. Lectinas y Cáncer.

Debido a que no es siempre posible reducir la exposición del ser humano a la mutagénesis, actualmente se presta gran atención a pruebas para identificar el potencial antimutagénico y anticarcinogénico de diversos compuestos para protección de la población (Ribeiro y Salvadori, 2003).

Ciertos compuestos dentro de la dieta pueden ser agentes de ayuda para la prevención de enfermedades (Glinsky y col., 2004). El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es un importante alimento en África y América Latina. Existe evidencia de la relación inversa entre el consumo de frijol y el cáncer de colon; se ha observado reducción del 44 al 75% de la carcinogénesis de colon en ratas alimentadas con frijol negro y frijol navy. Lo anterior se atribuyó a 1) mayor control en su apetito, acompañado con una disminución de grasa en su cuerpo y 2) mayor concentración de butirato en el colon (Hangen y Bennink, 2002).

Una de las atribuciones a la reducción de cáncer, en algunos alimentos, se debe a la presencia de las lectinas. Algunas lectinas de plantas han sido utilizadas en pruebas para estudiar la arquitectura de la superficie de las células transformadas y evaluar alteraciones inducidas por la radiación. Así mismo, se han utilizado como marcadores para predecir la relación dosis–efecto de radiosensibilidad en células de cáncer oral (Remani y col., 2002).

Por otro lado, la adhesión celular intravascular juega un papel significativo en el proceso de metástasis. Algunos estudios indican que la galectina 3, miembro de la familia de galectinas, está involucrada en la mediación de la adhesión celular heterotípica (entre las células del carcinoma y el endotelio) y homotípica (entre células del carcinoma) vía la interacción con el glicoantígeno tumor específico Thomsen-Friedenreich (Zou y col., 2005). La galectina 3 es un efector multifuncional, es el único miembro de tipo quimérico de la familia de las galectinas endógenas. El uso de lectinas endógenas como marcadores en la detección de células cancerosas de cabeza y cuello es técnicamente factible, de rápida detección de los ligandos específicos de la galectina 3 y con potencial terapéutico (Plizák y col., 2004). Debido a la propiedad de los carbohidratos para ser reconocidos como marcadores diferenciales y como determinantes antigénicos, se han utilizado carbohidratos modificados y oligosacáridos que tienen la habilidad de interferir en la interacción proteína-carbohidrato e inhibir el reconocimiento célula-célula y el proceso de adhesión. Los ligandos de carbohidratos son candidatos importantes en terapias contra el cáncer (Nangia y col., 2002).

La llamada terapia LEAPT (Lectin-directed enzyme-activated prodrug therapy, por sus siglas en inglés) ha sido diseñada para explotar la presencia de carbohidratos endógenos que ligan lectinas, combinándola con biocatálisis a través de la construcción de enzimas glicosiladas y prodrogas. El sistema LEAPT podría ser aplicable a diferentes tipos de células, con la posibilidad de que carbohidratos específicos permitan el reconocimiento de células específicas, como es el caso de las tumorales (Robinson y col., 2004).

Las lectinas se han estudiado como agentes inhibidores de la proliferación e inductores de la diferenciación celular (Seigel y Notter, 1992), las cuales estimulan la apoptosis y la proliferación de linfocitos T citotóxicos (Kim y col., 2000). En un estudio realizado en el laboratorio de la Dra. Teresa García Gasca se encontró que una fracción proteínica rica en inhibidores de proteasas de frijol tépari, presentó actividad aglutinante sobre los fibroblastos transformados de ratón, lo que sugirió la presencia de lectinas contaminantes. Lo anterior se confirmó mediante la prueba de aglutinación con eritrocitos de conejo y se determinó el efecto de la fracción sobre

la proliferación celular. Se observó efecto citotóxico sobre células cancerígenas en función de la concentración y de manera diferencial, ya que no afectó de igual forma a células normales. Debido a lo anterior, resulta importante caracterizar el efecto de la lectina de frijol tépari sobre la sobrevivencia de células cancerígenas con la finalidad de considerar su potencial como agente terapéutico.

3. HIPÓTESIS

La lectina de frijol tépari afecta de manera diferencial la sobrevivencia y proliferación de células transformadas, respecto a su contraparte normal.

4. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto de la lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre la proliferación y sobrevivencia de células cancerígenas

ESPECÍFICOS

- Purificar parcialmente la lectina de frijol tépari
- Cuantificar la actividad específica de la lectina en las fracciones obtenidas.
- Evaluar el efecto de la lectina semipura sobre la proliferación de células cancerígenas y normales.
- Evaluar el efecto de la lectina semipura sobre la sobrevivencia de células cancerígenas y normales.
- Determinar el efecto citotóxico de la lectina semipura sobre las células cancerígenas.

5. METODOLOGÍA

5.1. MATERIALES

5.1.1. Reactivos

El medio de Eagle alto en glucosa modificado por Dulbecco (DMEM) , se obtuvo de GIBCO BRL (Grand Island, NY, EUA), el suero de ternera (ST) de HyClone (Logan UT, EUA); el resto de los reactivos empleados en el cultivo celular fueron de Sigma (Sigma Chem; St. Louis MO, EUA). Los reactivos para electroforesis se adquirieron de Bio-Rad (Hercules, CA, EUA) y la matriz para cromatografía de intercambio iónico fue de Pharmacia (Pharmacia Biotech; Upsala, Suiza). Los reactivos y solventes de uso general fueron de J.T. Baker (J.T. Baker; Xalostoc, Estado de México, México); las cajas de cultivo y las placas de 24 pozos fueron de Corning (Corning Costar; Corning, NY, EUA).

5.1.2. Material vegetal

Se inició el estudio a partir de una fracción proteínica de frijol tépari precipitada con sulfato de amonio al 65% de saturación (P-65). Adicionalmente se contó con una fracción semipura de la lectina, obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-75. Esta fracción fue proporcionada por el laboratorio del Dr. Alejandro Blanco Labra del CINVESTAV-Irapuato.

5.1.3. Líneas celulares

Se utilizaron 3 líneas celulares de dos linajes diferentes: 1) células mesodérmicas: fibroblastos NIH 3T3 de ratón, transformados con el oncogen v-mos y fibroblastos 3T3 normales de ratón y 2) células epiteliales: células HeLa de cáncer cérvico-uterino humano. Los fibroblastos 3T3 normales y transformados se cultivaron en DMEM suplementado con 5% ST. Las células HeLa se cultivaron en DMEM conteniendo 5% de ST e insulina (5 µg/mL). Los cultivos celulares se incubaron a 37° C en una incubadora FELISA con cámaras de gasificación manual, en atmósfera humidificada al 90% aire y 10% CO₂.

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Cromatografía de intercambio iónico

Se determinó la cantidad proteínica en la fracción proteínica precipitada al 65% de saturación con sulfato de amonio (P-65) por el método de Bradford (1976). Para la cromatografía de intercambio iónico se empleó una columna empacada con DEAE-Sepharosa de 1 cm X 15 cm. La proteína adsorbida por la resina fue eluída con un gradiente lineal de 0 a 0.7 M de NaCl, en TRIS 0.02 M pH 8.0, el volumen total del gradiente fue de 80 mL, la velocidad de flujo fue de 0.3 mL/min y el volumen de cada fracción fue de 3.0 mL. Se realizó el cromatograma determinando la concentración de proteína a 280 nm y la actividad específica de la lectina en una placa de ELISA de 24 pozos (Jaffé, 1980). Las fracciones que presentaron actividad se mezclaron de acuerdo al patrón de proteína, se dializaron, se liofilizaron y se almacenaron a -20°C. El perfil electroforético de la fracción obtenida se obtuvo mediante electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) de acuerdo a Laemmli (1970), en geles de 0.75 mm al 12.5% de poliacrilamida.

Adicionalmente se determinó la actividad aglutinante de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión molecular G75. Dichas fracciones fueron proporcionadas por el laboratorio del Dr. Alejandro Blanco del CINVESTAV-Irapuato, en la que se utilizó una columna de Sephadex G75 de 167 cm x 2.25 cm. La columna se equilibró con bicarbonato de amonio 0.02 M a 4° C y se le adicionaron 300 mg de muestra disuelta en 4 mL de la misma solución amortiguadora. La muestra eluyó con un flujo de 15 mL/h, utilizando la misma solución amortiguadora y el volumen de cada fracción fue de 5.7 mL. Se realizó el cromatograma de la forma anteriormente descrita. En todos los casos se verificó la ausencia de inhibidores de proteasas del frijol (Schwartz y Takenaka, 1955).

5.2.2. Actividad aglutinante específica de la lectina

Se determinó la actividad aglutinante específica de la lectina en las fracciones P-65, intercambio iónico (F-II) y las obtenidas por cromatografía de exclusión molecular G-75 (picos 1 y 3). Se utilizaron placas de ELISA de 96 pozos de acuerdo al

método modificado de Lis y Sharon (Jaffé, 1980). Brevemente, se colocaron 50 μ L de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) en cada pozo de la placa. En los primeros pozos de cada línea (1A, 2A, 3A,..., 8A) se agregaron, por duplicado, 50 μ L de la fracción a probar en una concentración de 1 mg/mL de proteína. A partir de los pozos iniciales se realizaron diluciones dobles seriadas en los pozos siguientes (1A, 1B, 1C,...,1L). Se incluyó un control positivo utilizando Concanavalina A (1 mg/mL) y un control negativo con PBS. Finalmente, a cada pozo se le agregaron 50 μ L de suspensión de eritrocitos de conejo al 2%, 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: alta actividad (+++), media (++) , baja (+) y nula (-). La actividad específica se cuantificó mediante la ecuación:

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

Donde AE es la actividad específica aglutinante expresada en unidades por mg de proteína (U/mg), n es la última dilución con aglutinación apreciable al microscopio y P es la cantidad de proteína inicial en miligramos. La fracción con mayor actividad aglutinante fue el pico1 de la cromatografía G75 (P1-G75), el cual se utilizó para realizar los ensayos biológicos posteriores.

5.2.3. Ensayos *in vitro* de las fracciones de lectina

Se realizó una curva dosis-respuesta con la fracción P1-G75 utilizando fibroblastos transformados 3T3/v-mos mediante el protocolo establecido por García-Gasca y col (2002). Brevemente, las células se sembraron (1.0×10^4 células por pozo) en placas de 24 pozos con DMEM al 5% ST. Después de 48 h se contaron dos pozos (control inicial) y el medio de cultivo del resto se cambió por DMEM adicionado con 1% de albúmina sérica de bovino (ASB) y diferentes concentraciones de la fracción rica en lectina (entre 15 y 0.01 μ g de proteína/mL). Las tasas de proliferación mínima y máxima se estimaron mediante la comparación con dos tratamientos control: DMEM adicionado con 1% de ASB y DMEM al 5% ST respectivamente. Después de 72 h, el número celular se determinó cosechando las células con

tripsina al 0.15% y contándolas con un hemocitómetro. Todos los experimentos se realizaron por duplicado en por lo menos dos experimentos independientes. El número de células se determinó en base a los siguientes cálculos:

$$\frac{\text{Número de células total}}{\text{pozo}} = \frac{N}{C} [1 \times 10^4] [V]$$

En donde:

- N Es el número de células contadas
- C Número de campos contados en el hemocitómetro
- 1×10^4 Factor de dilución del hemocitómetro
- V Volumen en mL de la suspensión celular.

El índice de proliferación se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%P = \frac{\text{Número de células en el tratamiento}}{\text{Número de células del control en ASB 1\%}} \times 100$$

El índice de sobrevivencia se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%S = \frac{\text{Número de células en el tratamiento}}{\text{Número de células del control inicial}} \times 100$$

El efecto citotóxico de la fracción P1-G75 se determinó de acuerdo al kit LDH-Cytotoxicity Assay (Biovision, catálogo # K311-400). El porcentaje de citotoxicidad se calculó en base a la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{\text{Tratamiento} - \text{Control en 1\% ASB}}{\text{Control alto} - \text{Control en 1\% ASB}} \times 100$$

En donde el control alto fue el tratamiento con Tritón X-100 al 1%. Una vez que se determinaron las concentraciones letal, letal₅₀, subletal e inocua de la fracción P1-G75 se determinó el efecto sobre la proliferación y sobrevivencia de fibroblastos normales 3T3 y células HeLa siguiendo el mismo procedimiento.

5.2.4. Análisis Estadístico

La curva patrón de proteína y la curva dosis-respuesta se realizaron mediante regresión lineal simple. Los datos experimentales se analizaron mediante ANOVA para la comparación de medias según el método de Tuckey ($p \leq 0.05$).

6. RESULTADOS

6.1. Determinación de proteína en la fracción P-65 de frijol tépari

La concentración de proteína de la fracción P-65 fue de 0.5828 mg/mL, de acuerdo a la curva patrón obtenida: $y = 0.0096x + 0.0273$, $R = 0.9938$, donde:

y = Absorbancia a 595 nm

x = Concentración de proteína en mg/mL

R = Coeficiente de correlación lineal

La actividad aglutinante específica de la fracción P-65 fue de 1810.19 U/mg de proteína.

6.2. Fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular

La Figura 6 corresponde a la cromatografía de intercambio iónico de la fracción P-65. Se observa que el pico de proteína con mayor actividad fue el colectado entre las fracciones 12 a 24. La actividad aglutinante específica para la fracción obtenida por cromatografía de intercambio iónico (F-II) fue de 1280 U/mg de proteína. En la Figura 7 se muestra la cromatografía por exclusión molecular G75 a partir de la fracción P-65 del frijol tépari, proporcionada por el laboratorio del Dr. Blanco del CINVESTAV. Después de determinar la actividad aglutinante, se encontró que el pico 1 corresponde a la fracción rica en lectinas (P1-G75) con 5565.2 U/mg de

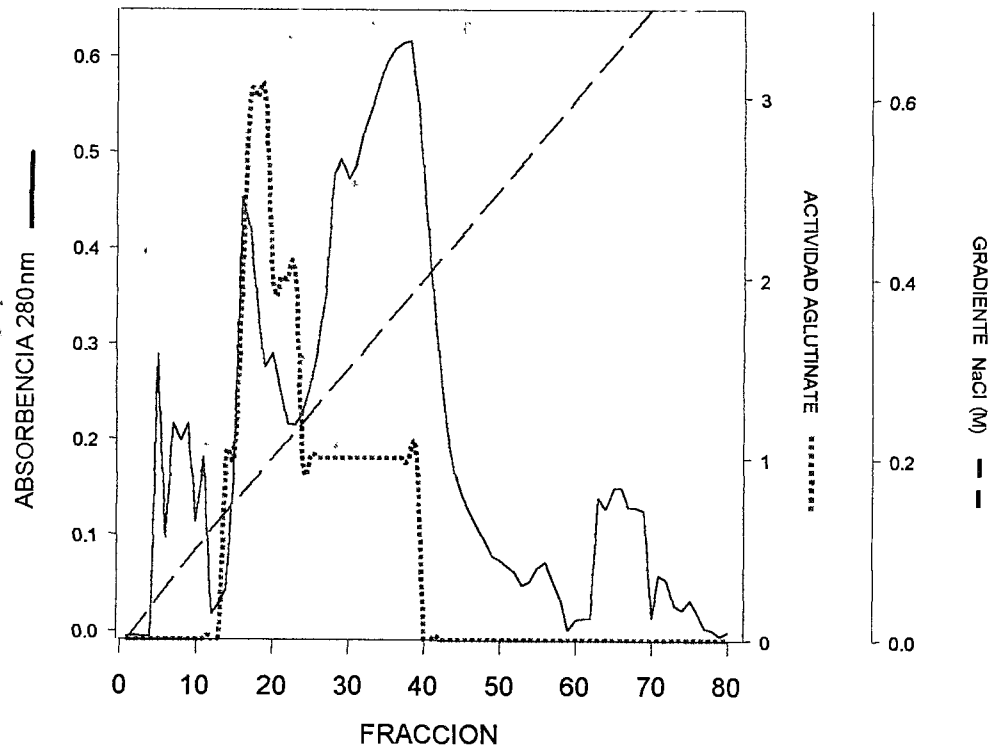


Figura 6. Cromatografía de intercambio iónico de la fracción proteínica de frijol tépari P-65. La fracción de P-65, se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en una columna de Q-Sepharosa, con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0.7M en Tris 0.02M pH 8 y un flujo de 0.3 mL/min. Se determinó la proteína a 280 nm (.....), así como la actividad aglutinante (—).

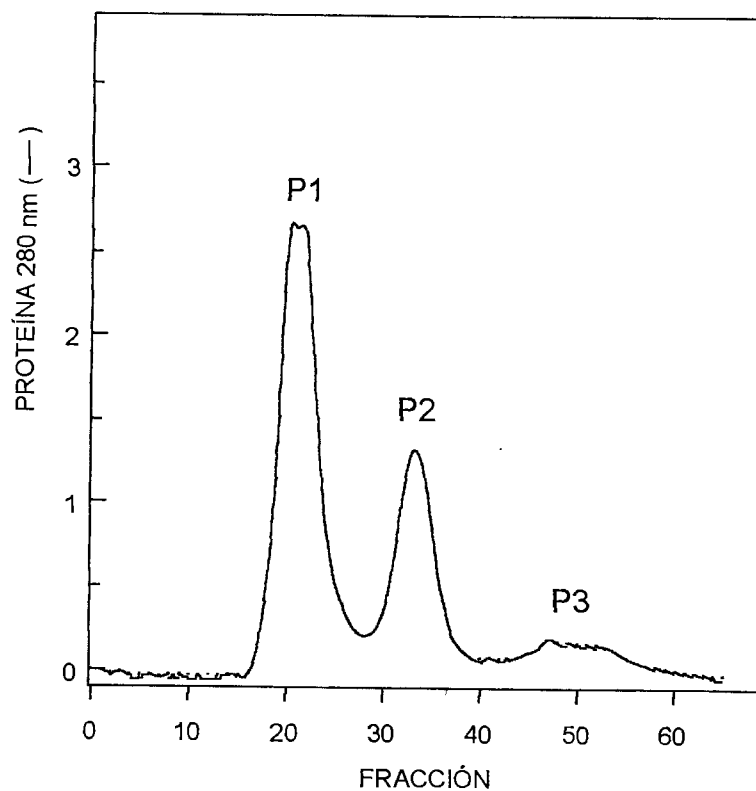


Figura 7. Cromatografía de exclusión molecular de G-75 a partir de la fracción P-65 de frijol tépari. La fracción P-65 obtenida a partir de la semilla de frijol tépari se sometió a filtración en gel utilizando una columna de Sephadex G-75 (167 x 2.25 cm) equilibrada con bicarbonato de amonio 0.02 M. Se determinó la proteína a 280 nm y se colectaron los picos según el perfil obtenido.

proteína, el pico 2 es una fracción en la que se encuentran inhibidores de proteasa del frijol tépari con baja actividad aglutinante (1024 U/mg de proteína) (García-Gasca, 2002) y el pico 3 es una fracción sin actividad.

6.3. Perfil Electroforético

En la Figura 8 se muestra el perfil electroforético de las diferentes fracciones obtenidas de la semilla del frijol. El pico 2 de la cromatografía de exclusión molecular no se analizó debido a que en dicho pico se encuentra el inhibidor de proteasas de frijol tépari y se colectó para otros estudios. Se observa que los perfiles para P-65 antes y después de la cromatografía del intercambio iónico no fueron muy diferentes y presentaron tanto proteínas de alto como de bajo peso molecular. La fracción P1-G75 presentó un perfil de proteínas en el que se observa principalmente una banda enriquecida alrededor de 31 kDa, mientras que el perfil del P3-G75 presentó bandas superiores. Debido a lo anterior, y a la actividad aglutinante, se seleccionó el P1-G75 para realizar los ensayos biológicos.

6.4. Ensayos biológicos *in vitro* de la fracción P1-G75

Se probaron diferentes concentraciones de la fracción P1-G75 de frijol tépari en función al contenido de proteína. En la Figura 9 se observa el efecto de la fracción sobre la proliferación y sobrevivencia de fibroblastos 3T3 transformados con el oncogen v-mos. Al tratar a las células con 1.3 μg proteína/mL se observó efecto citostático mientras que la concentración de 3.5 μg proteína/mL provocó más del 80% de muerte celular respecto al control ($p \leq 0.05$). En cuanto al efecto sobre la proliferación, la única concentración que no mostró un efecto negativo fue la de 10 ng proteína/mL. En la Figura 10 se muestra el efecto de la fracción P1-G75 sobre fibroblastos 3T3 normales; el efecto citostático se presentó alrededor de 3.5 μg proteína/mL y aproximadamente un 65% de muerte celular con 15 μg proteína/mL. En el caso de células de carcinoma humano, HeLa, (Figura 11), la concentración citostática fue alrededor de 1.5 μg proteína/mL y con la concentración mas alta probada (15 μg proteína/mL) se obtuvo casi el 90% de muerte celular. El efecto de

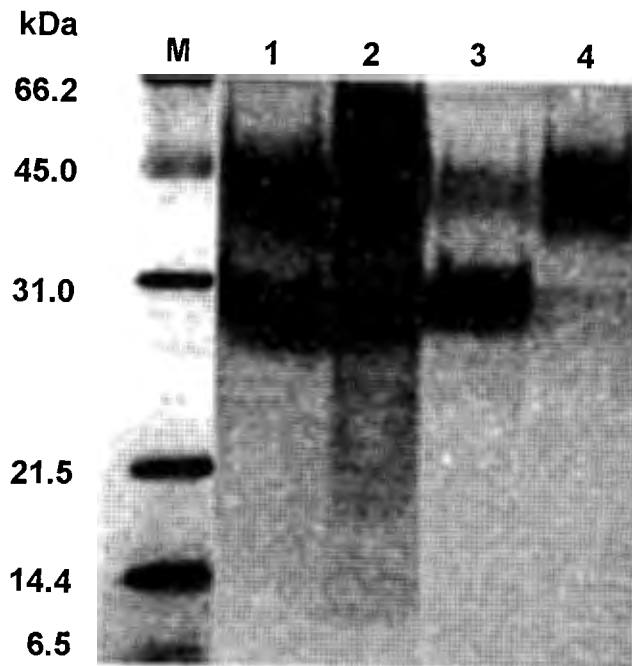


Figura 8. Perfil electroforético de las proteínas en las fracciones obtenidas de la semilla de frijol tépari. Se realizó una electroforesis desnaturalizante en geles al 12.5% de poliacrilamida. En el carril M se muestran los marcadores de peso molecular, (1) P-65, (2) F-II, (3) P1-G75 y (4) P3G-75.

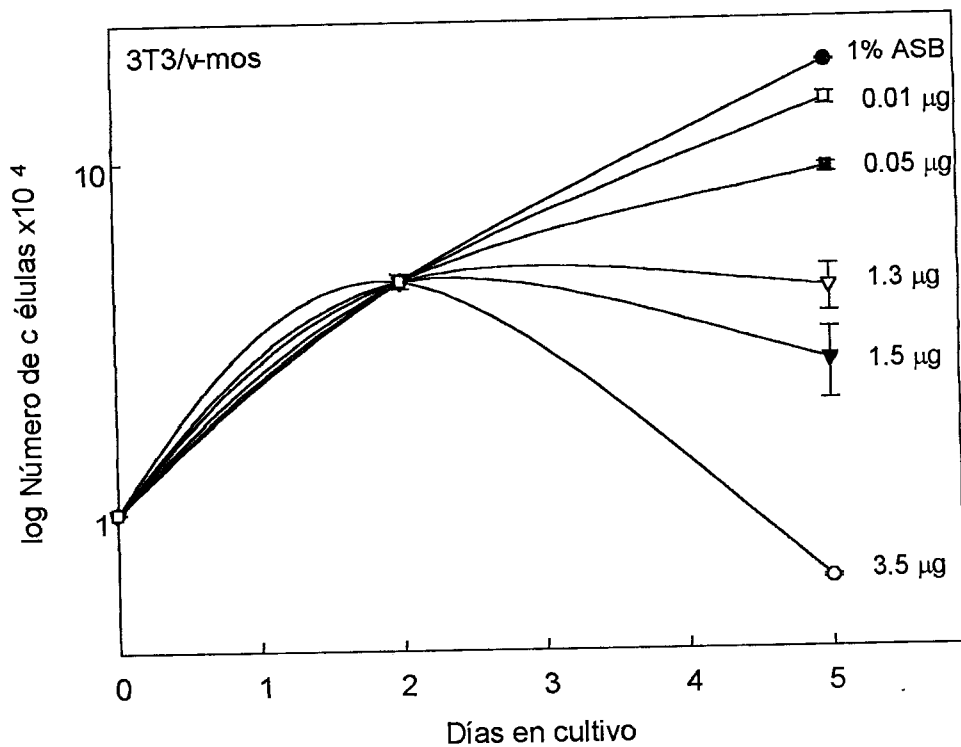


Figura 9. Efecto de la fracción P1-G75 sobre la proliferación y sobrevivencia de fibroblastos 3T3 v-mos. Células 3T3/v-mos fueron sembradas a razón de 1×10^4 células por pozo en placas de 24 pozos en DMEM 5% ST. Luego de 48 h, se cambiaron condiciones con DMEM libre de suero, adicionado con 1% ASB y diferentes concentraciones de la fracción rica en lectina en μg de proteína/mL. Después de 72 h bajo dichas condiciones, las células se cosecharon y se contaron al microscopio. Los experimentos se realizaron al menos cuatro veces de manera independiente.

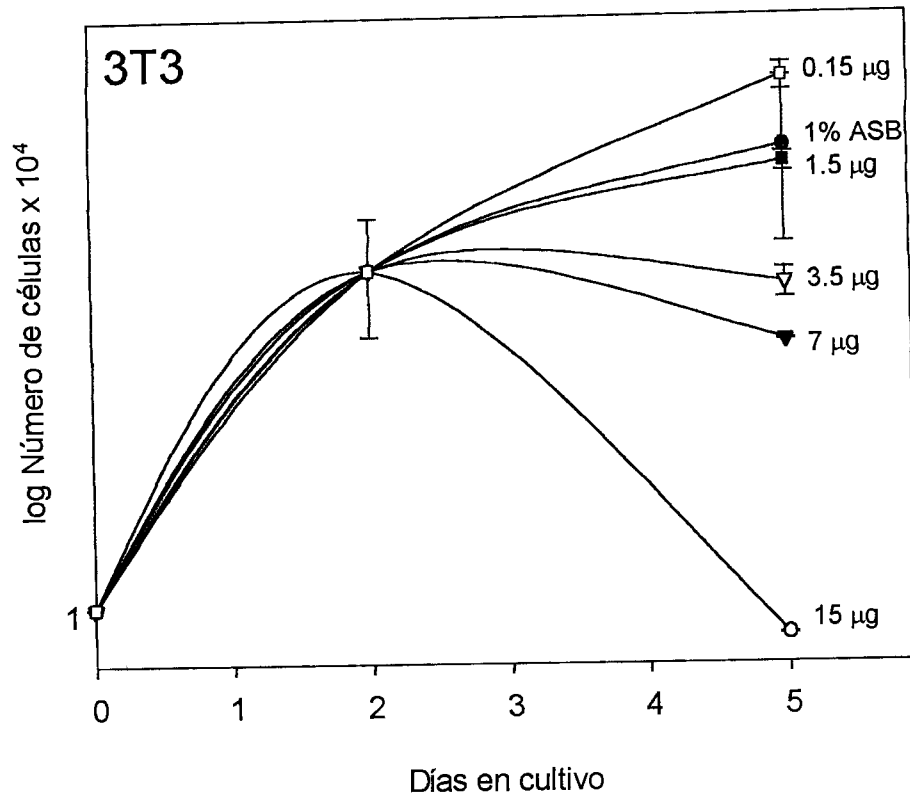


Figura 10. Efecto de la fracción P1-G75 sobre la proliferación y sobrevivencia de fibroblastos 3T3 normales. Células 3T3 fueron sembradas a razón de 1×10^4 células por pozo en placas de 24 pozos en DMEM 5% ST. Luego de 48 h, se cambiaron condiciones con DMEM libre de suero, adicionado con 1% ASB y diferentes concentraciones de la fracción rica en lectina en μg de proteína/mL. Después de 72 h bajo dichas condiciones, las células se cosecharon y se contaron al microscopio. Los experimentos se realizaron al menos cuatro veces de manera independiente.

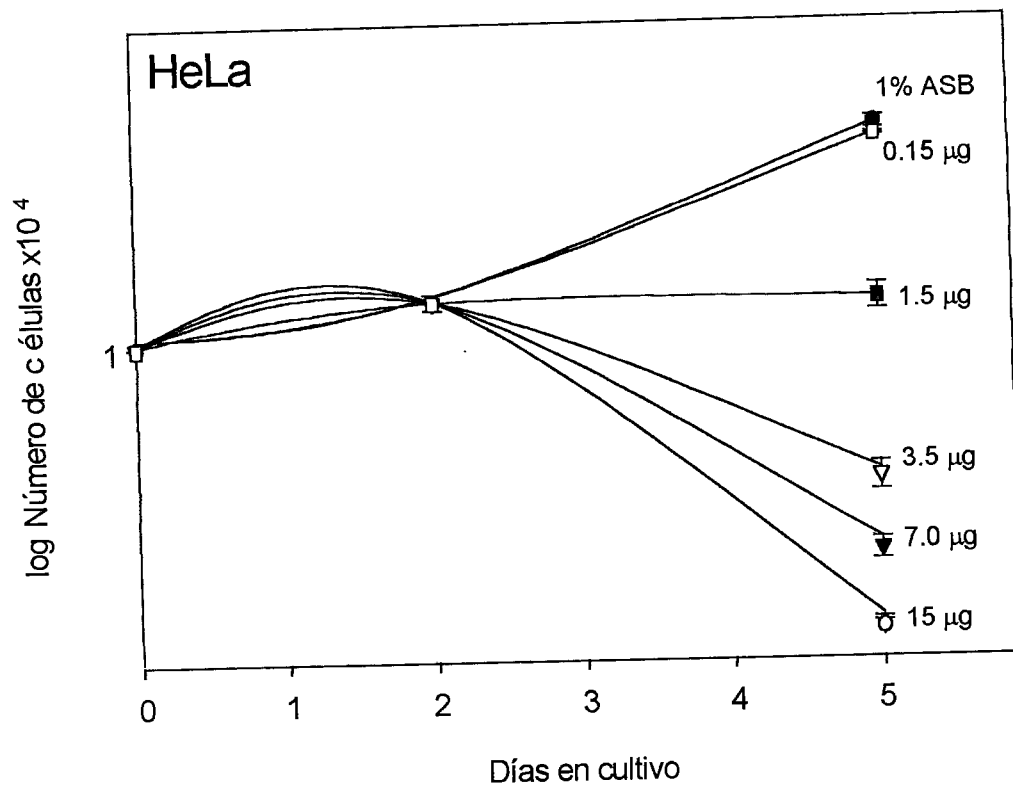


Figura 11. Efecto de la fracción P1-G75 sobre la proliferación y sobrevivencia de células HeLa. Las células HeLa fueron sembradas a razón de 1×10^4 células por pozo en placas de 24 pozos en DMEM 5% ST. Luego de 48 h, se cambiaron condiciones con DMEM libre de suero, adicionado con 1% ASB y diferentes concentraciones de la fracción rica en lectina en μg de proteína/mL. Después de 72 h bajo dichas condiciones, las células se cosecharon y se contaron al microscopio. Los experimentos se realizaron al menos cuatro veces de manera independiente.

la fracción estudiada se expresa como porcentaje de proliferación o porcentaje de supervivencia celular, tal como se resume en el Cuadro 2.

6.5. Determinación de la concentración letal media (CL₅₀)

Se realizó una curva dosis-respuesta en la que se graficó el porcentaje de muerte celular contra el logaritmo de la concentración de la fracción P1-G75 como variable independiente. La ecuación de regresión lineal para la determinación de la CL₅₀ para cada línea celular fue:

A) $y = -133.44 x + 61.822$ para la línea celular 3T3 v-mos, con un coeficiente de correlación de 0.9184,

B) $y = -85.418 x + 135.04$ para la línea celular 3T3 normales, con un coeficiente de correlación de 0.9998 y,

C) $y = -185.6 x + 183.26$ para la línea celular HeLa, con un coeficiente de correlación de 0.9351.

La CL₅₀ se calculó para una supervivencia (y) del 50%. Esta concentración correspondió a 1.22, 9.89 y 5.22 μg de proteína/mL para células mos, 3T3 normales y HeLa, respectivamente.

6.6. Efecto citotóxico

El porcentaje de citotoxicidad se calculó mediante un kit comercial para la determinación espectrofotométrica de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) a 492 nm y 620 nm de referencia. Para determinar el efecto citotóxico en células v-mos se utilizó la concentración de 1.5 μg proteína/mL (la más cercana a la CL₅₀). Se encontró que la fracción estudiada provocó casi un 23% de citotoxicidad respecto a las células control con 1% ASB.

Cuadro 2. Efecto del la fracción P1-G75 sobre los porcentajes de proliferación y sobrevivencia de células normales y cancerígenas.

Tratamiento	3T3 Normales		3T3 v - mos		HeLa	
	P (%)	S (%)	P (%)	S (%)	P (%)	S (%)
Control inicial	NA	100 c	NA	100 a, b, c	NA	100 a
Control 1% ASB	100 d	150.98 d	100 b, c	403.67 e	100 d	527.55 c
15	16.90 a	34.12 a	NA	NA	1.70 a	12.21 a
7.0	42.86 a, b	64.28 a, b	NA	NA	3.55 a	21.53 a
3.5	59.08 b, c	88.22 b, c	8.55 a	17.0 a	5.69 a, b	35.32 a
1.8	NA	NA	14.45 a	31.31 a	NA	NA
1.5	85.9 c, d	119.06 c, d	16.84 a	43.64 a	15.08 b	128.56 a, b
1.3	NA	NA	25.11 a	98.71 a, b, c	NA	NA
0.9	NA	NA	31.06 a	139.32 a, b, c, d	NA	NA
0.45	NA	NA	27.62 a	80.44 a	NA	NA
0.225	NA	NA	28.34 a	97.3 a, b	NA	NA
0.15	118.47 d	205.69 e	NA	NA	59.06 c	362.69 b, c
0.11	NA	NA	38.01 a	139.17 a, b, c, d	NA	NA
0.05	NA	NA	79.99 b, c	279.55 b, d, e	NA	NA
0.01	NA	NA	110.92 c	348.55 e	NA	NA

P indica el porcentaje de proliferación respecto al control con 1% ASB.

S indica el porcentaje de sobrevivencia respecto al control inicial al cambio de condiciones.

Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos para la proliferación o la sobrevivencia y para cada línea celular por separado ($p \leq 0.05$).

NA: No aplica en el experimento.

7. DISCUSIÓN

El mayor atributo de las lectinas es la capacidad de aglutinación, distinguiéndose si aglutinan eritrocitos o linfocitos. El frijol tépari presenta ambos tipos y la lectina estudiada es hemoaglutinante (González de Mejía y col., 1989). Dicha glicoproteína presenta afinidad por la fetuína y posee baja toxicidad (Reynoso-Camacho y col., 2003).

La actividad aglutinante cambió dependiendo del método de purificación utilizado; disminuyó al ser sometida a cromatografía de intercambio iónico ya que la actividad específica fue menor que la de la fracción P-65, posiblemente debido a que este procedimiento pudo atrapar metales necesarios para la lectina (Machuka y col., 1999). La fracción P1-G75, separada por filtración en gel, tuvo la mayor actividad aglutinante (5565 unidades de aglutinación/mg proteína), lo que sugiere que la separación por tamizaje molecular es adecuada para la purificación parcial de la proteína. El perfil electroforético de dicha fracción presentó una banda con peso molecular aproximado de 31 k Da, similar al que obtuvo González de Mejía y col. (1989) y que corresponde a la glicoproteína (García-Gasca, 2002).

El efecto de la fracción semipura de lectina sobre células normales y cancerígenas fue diferencial, ya que la lectina reconoció de manera selectiva a células normales y cancerígenas y a células de diferentes linajes. El efecto citostático se observó con 1.3 µg proteína/mL en fibroblastos v-mos, mientras que para su contraparte normal fue de 3.5 µg proteína/mL y en el caso de carcinoma epiteliales (HeLa) fue alrededor de 1.5 µg proteína/mL. Este resultado sugiere que la lectina de frijol tépari detiene el crecimiento de células cancerígenas con concentraciones similares, independientemente del linaje del que provengan; siendo más de dos veces mayor la concentración requerida para provocar el mismo efecto sobre células normales.

La concentración de 3.5 µg de proteína/mL provocó el mayor efecto citotóxico para las células v-mos, con el 83% de muerte celular. Para el caso de las células 3T3 normales la concentración más alta probada (15 µg de proteína/mL) resultó en un 65% de muerte celular y esa misma concentración afectó la sobrevivencia de células HeLa en un 88%. En este caso se observa que la concentración de lectina para causar la muerte de células cancerígenas epiteliales fue 4 veces mayor que la

que se requirió para células fibroblásticas. También es posible observar que los fibroblastos normales presentaron menor índice de muerte celular, aún con la mayor concentración.

La proliferación celular también se afectó en función de la concentración, en el caso de los fibroblastos transformados la única concentración que no afectó negativamente la capacidad de proliferación celular fue de 10 ng de proteína/mL, mientras que para su contraparte normal fue de 150 ng de proteína/mL. En este caso, la sensibilidad de las células cancerígenas fue de un orden de magnitud.

La concentración letal media para cada línea celular fue de 1.22, 9.89 y 5.22 μ g proteína/ mL para las células 3T3 vmos, 3T3 normales y HeLa respectivamente. Se observa que los fibroblastos normales requirieron 8 veces más proteína que la necesaria en el caso de los fibroblastos transformados v-mos para provocar el 50% de muerte celular. Al comparar las dos líneas celulares cancerígenas se observa que las células de origen epitelial, HeLa, requirieron casi 4 veces más proteína que las células fibroblásticas. En términos de actividad aglutinante de la fracción estudiada, lo anterior corresponde a 0.0067, 0.0550 y 0.0290 unidades de aglutinación/mL para provocar el 50% de muerte de cada línea celular respectivamente.

Los resultados anteriores sugieren que la lectina estudiada afecta principalmente la sobrevivencia de células cancerígenas independientemente del tejido del que provengan sin embargo, se observa que el linaje celular sí es un factor ya que las células fibroblásticas v-mos fueron más sensibles que las epiteliales. La fracción de lectina estudiada presentó capacidad para reconocer células cancerígenas de células normales, lo anterior puede ser resultado de la alteración de los patrones de glicosilación típicos en células cancerígenas (Nangia y col., 2002).

Para determinar el efecto citotóxico en células v-mos se utilizó la concentración de 1.5 μ g proteína/mL (la más cercana a la CL_{50}). Se observó un 23% de muerte celular en función de la concentración de LDH en el medio de cultivo. La enzima LDH, necesaria para la transformación de lactato a piruvato, se considera un marcador de muerte celular por ruptura de membrana. Este tipo de daño se observa

cuando las células son expuestas a compuestos tóxicos, y se considera como daño celular general e inespecífico. Al comparar el 23% de muerte celular mediante la actividad de LDH y el 50% de muerte celular determinada por recuento al microscopio, se observa que no todas las células mueren debido a daño inespecífico. Lo anterior sugiere que la fracción P1-G75 induce la muerte de células cancerígenas de forma diferencial mediante algún mecanismo distinto, probablemente inducción de apoptosis (Zarkovic y col., 1998; Kim y col., 2000).

8. CONCLUSIONES

- Se logró avanzar en la purificación de la lectina de interés de frijol tépari.
- Se determinó que mediante cromatografía de intercambio iónico disminuye la actividad aglutinante, por lo que no es un buen método para purificar la lectina.
- La fracción obtenida por cromatografía de exclusión molecular presentó una actividad de 5565 unidades de aglutinación/mg de proteína. Se observó que mediante este método es posible recuperar adecuadamente a la proteína activa.
- Las concentraciones para provocar efecto citostático sobre células cancerígenas v-mos y HeLa fueron similares siendo de 1.3 y 1.5 μg de proteína/mL, respectivamente; mientras que para 3T3 normales fue dos veces mayor.
- Fue necesaria una concentración 4 veces mayor para provocar el mismo efecto de muerte en células HeLa que en fibroblastos v-mos. Lo anterior sugiere un efecto diferencial en función del linaje celular.
- La fracción estudiada presentó un efecto diferencial entre células normales y cancerígenas del mismo linaje ya que la concentración citostática para los fibroblastos 3T3 fue de 3.5 μg de proteína/mL, mientras que sobre fibroblastos v-mos dicha concentración provocó el 83% de muerte celular.
- Las CL_{50} fueron de 1.22, 9.89 y 5.22 μg de proteína/mL para las líneas 3T3/v-mos, 3T3 normales y HeLa, respectivamente. Se observa que se requirieron 8 veces más proteína para provocar el mismo efecto en células normales que en cancerígenas.
- La proliferación celular también se afectó en función de la concentración y de manera diferencial, siendo las células v-mos las más sensibles.
- El efecto citotóxico de la fracción de lectina sobre células v-mos en una concentración de 1.5 μg de proteína/mL fue de 23%, menor al obtenido para muerte celular por recuento al microscopio (56%). Este resultado sugiere que la fracción estudiada provoca la muerte de las células por mecanismos adicionales.

9. BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 1999.** Biología Molecular de la Célula. 3ª Ed., Ediciones Omega, Barcelona: 1258-1270
- Albores, V. F., de la Fuente, G., Agundis, C. y Cordoba, F. 1987.** Purification and characterization of a lectin from *Phaseolus acutifolius* var. *latifolius*. *Preparat Biochem*: 17: 379-396.
- Avers, J. C. 1986.** Molecular cell biology. 1ª Ed., Benjamin Cummins, Estados Unidos de Norteamérica: 158-163
- Bradford, M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*: 72:248-254.
- García-Cruz, R. M. 2004.** Efecto del inhibidor de proteasas tipo Bowman-Birk del frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre la adhesión de fibroblastos transformados *in vitro*. Irapuato. CINVESTAV-Irapuato. Tesis para obtener el título de Maestría en Ciencias en la Especialidad de Biotecnología de Plantas: 20, 23.
- García-Gasca, T., Salazar Olivo L. A., Mendiola-Olaya E. and Blanco-Labra A. 2002.** The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on *in vitro* cell proliferation and cell adhesion of transformed cells. *Toxicol. In Vitro*: 16:229-233.
- González de Mejía, E., Hankins, C.N. Paredes-López, O. and Shannon, M.L. 1989.** The lectins and lectin – like proteins of tepary beans (*Phaseolus acutifolius*) and tepary – common bean (*Phaseolus vulgaris*) hybrids. *J. Food Biochem*: 14: 117-126.
- Glinsky, G.V., Glinskii, A.B., Stephenson, A.J., Hoffman, R.M., Gerald, W.L. 2004.** Gene expression profiling predicts clinical outcome of prostate cancer. *J Clin. Invest*: 113: 913-923.
- Hangen L., and Bennink, M. R. 2002.** Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane induced colon cancer in rats. *Nutr. Cancer*: 44: 5-60.
- Jaffé, W. 1980.** Hemagglutinins (lectins). In: Toxic constituents of plant foodstuffs. Academic Press. New York, N. Y: 73-102.
- Karp, G. 1996.** Biología celular y molecular. 1ª Ed., McGraw Hill Interamericana. Madrid: 671-683, 688, 698.

Kim, M. S., So, H. S., Lee, K. M., Park, J. S., Lee, J. H., Moon, S. K., Ryu, D. G., Chung, S. Y., Jung, B. H., Kim, Y. K., Moon, G., and Park, R. 2000. Activation of caspase cascades in Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) lectin-II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Gen. Pharmacol.* 34(5):349-355.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* :227:680-685.

Lis, H. y Sharon, N. 1998. Lectins: Carbohydrate – Specific Proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev*: 98: 670–674

Machuka, S. J., Okeola, G.O., Van Damme, J.M., Chrispeels, J.M., Leuven, V.F., Peumans, J.W. 1999. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochem*: 51: 721–728

Muñoz, A. 1997. Cáncer. Genes y nuevas terapias 1ª Edición. Editorial Hélice. Madrid. 495–507.

Nangia, P.M., Conklin, J., Hogan, V. and Raz, A. 2002. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligand as therapeutic agentes. Elseiver Science Ltd: 8: 187-192

Nishimura, H., Nishimura, M., Oda, R., Yamanaka, K., Matsubara, T., Ozaki, Y., Sekiya, L., JaMada, T. and Kato, Y. 2004. Lectins induce resistanse to proteases and/or mechanical stimulus in all examined cells – including bone marrow mesenchymal stem cells – on various scaffolds. *Exp. Cell Res*: 295: 119-127.

Ohba, H., Moriwki, S., Bakalova, R., Yasuda, S. and Yamasaki, N. 2004. Plant derived abrina-a induces apoptosis in cultures leukemic cell lines by different mechanisms. *Toxicol. Applied Pharmacol*: 195: 182–193

Peumans, J. W. and Van Damme, J.M. 2002. Seed Lectins. *Seed Proteins*: 42: 657-683

Plizák, J., Betka, J., Smetana, K., Jr., Chovanec, M., Kaltner, H., Andrè, S., Kodet, R and Gabius, H.J. 2004. Galectin-3 an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. Elseiver Ltd: 40: 2324-2330

Puztai, A., Watt, W, B. and Stewart, J. C. 1987. Erithro- and lymphoagglutinins of *Phaseolus acutifolius*. *Phytochem*: 26: 1009-1013.

Remani, P., Bhattathiri, V.N., Bindur. L., and Krishnana, M.N. 2002. Lectin staining as a predictive test for radiosensitivity of oral cancer. Elseiver Science B.V:1236: 463-466

Reynoso-Camacho, R., González de Mejia, E., Loarca-Piña, G., 2003. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). Food Chem Toxicol: 41: 7-21

Riaño-Sánchez, R. Ma. E. 1997. Importancia y aplicaciones de las lectinas. Facultad de Química Farmacéutica Biológica. Universidad Veracruzana. <http://www.monografias.com/trabajos11/lecti/lecti.shtml>

Ribeiro, L.R. and Salvadori, D.M. 2003. Dietary component may prevent mutation-related disease in humans. Mutat. Res: 544: 195-201

Robinson, M.A., Charlton, S.T., Garnier, P., Wang, X., Davis, S.S., Perkins, A.C., Frier, M., Duncan, R., Savage, T.J., Wyatt, D.A., Watson, S.A. and Davis, B.G., 2004. LEAPT: Lectin-directed enzyme-activated prodrug therapy. Pharm: 40: 14527-14532

Seigel, G.M. and Notter, M.F.D. 1992. Lectin-induced differentiation of transformed neuroretinal cells *in vitro*. Exp. Cell Res:199:240-247.

Schwartz, G., and Takenaka, Y. 1955. Spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin activity. Biochim. Biophys. Acta : 16:571-575.

Tanaka, T. 1995. Chemoprevention of oral carcinogenesis. Oral Oncol: 31B: 3-15

Turner, R. H. and Liener, I. E. 1975. The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. Anal. Biochem : 68:651-653

Van Damme, J.M., Peumans, W.J., Barre, A. and Rouge, P. 1998. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. Crit. Rev. Plant Science: 17: 575-692

Wong, H.J., Ng, G T.B. 2002. Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. BBRC: 301: 545-550.

Zarkovic, N., Kalisnik, T., Loncaric, I., Borovic, S., Mang, S., Kissel, D., Konitzer, M., Jurin, M. and Grainza S. 1998. Comparison of the effects of *Viscum album* lectin ML-1 and fresh plant extract (Isorel) on the cell growth *in vitro* and tumorigenicity of melanoma B16F10. Cancer Biother. Radiopharm: 13:121-131.

Zou, J., Glinsky, V. V., Landon, L. A., Matthews, L. and Deutscher, S. L. 2005. Peptide specific to the galectin 3 carbohydrate recognition domain inhibits metastasis-associated cancer cell adhesion. Carcinogenesis: 26:309-318.