



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

**CARACTERIZACIÓN DE AGLUTININAS
PRESENTES EN FRUTOS DE LA
DIETA REGIONAL**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el título de

Químico Farmacéutico Biólogo

presenta

ADRIANA JHENY RODRÍGUEZ MÉNDEZ

dirigida por

DR. LUIS ANTONIO SALAZAR OLIVO

**CENTRO UNIVERSITARIO
QUERÉTARO, QRO. MÉXICO 1999**

No. Título

Clas. 574.19245

R696C



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Carrera de Químico Farmacéutico Biólogo

**CARACTERIZACIÓN DE AGLUTININAS
PRESENTES EN FRUTOS DE LA
DIETA REGIONAL**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

ADRIANA JHENY RODRÍGUEZ MÉNDEZ

Dirigida por:

DR. LUIS ANTONIO SALAZAR OLIVO

SINODALES

DR. LUIS ANTONIO SALAZAR OLIVO

Director

DRA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA

Sinodal Propietario

Q.B. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ

Sinodal Propietario

DR. MAMADOU MOUSTAPHA BHA

Sinodal Suplente

**MI MÁS SINCERO AGRADECIMIENTO AL DR. LUIS ANTONIO SALZAR OLIVO,
POR HABER APOYADO Y DIRIGIDO EL PRESENTE TRABAJO, POR SU
INVALUABLE APORTE DE CONOCIMIENTOS Y LA CONFIANZA QUE
DEPOSITÓ EN MI.**

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (D.I.P.A.) y a la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, por la oportunidad de haber llevado a cabo el presente estudio dentro de sus instalaciones.

A la Dra. Guadalupe Flavia Loarca Piña, al Q.B. Sergio Pacheco Hernández y al Dr. Mamadou Moustapha Bha, por el tiempo que dedicaron a leer y corregir el presente trabajo.

Al Dr. Edmundo Mercado, miembro del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (D.I.P.A.), por su amabilidad al haberme permitido emplear su equipo, cuando fue requerido.

Al Dr. Alejandro Blanco Labra, del Cinvestav Unidad Irapuato, por las facilidades otorgadas en su laboratorio.

A mi mami, por estar conmigo siempre y ser la mejor amiga que he tenido; a mi papi, por creer en mí siempre y quererme tanto.

A Yola, Ari, Adi, LuzMa (las güeritas), por brindarme su amistad y echarme porras todo el tiempo, por su paciencia y comprensión.

A Yolilla por escucharme siempre y echarme la mano cada vez que lo necesitaba.

A Nuria por todo lo que me enseñó del mundo de las lectinas.

De manera muy especial a mis compañeros de laboratorio, a Vane (la señorina) y Tere por orientarme y ayudarme a ver con optimismo las situaciones difíciles;

a Conchita y a Pablo por su amistad y aliento para seguir adelante.

A mis compañeros Azucena, Erica Belinda, Mariela, Lidia, Beatriz, Jasmith, Erica Garduño, Zoraida, Pedro, Félix, José Antonio y Abraham, por su amistad y el ánimo que me brindaron.

A mis compañeros Liz, Gis, George, Koko, Lalo, Yedid, por ser de los mejores QFB's de la Uni.

A MIS PADRES

***“Con amor, por el gran apoyo, comprensión y dedicación
que me otorgaron en todo momento”***

**A MIS HERMANOS,
HUGO DAVID Y ELÍAS IVÁN**

“Por su paciencia y apoyo incondicional”

A MI TÍA CHEPINA

***“Con admiración y cariño, por haberme alentado
en los momentos más difíciles”***

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Toxicología *In Vitro* de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, de la Universidad Autónoma de Querétaro; bajo la dirección del Dr. Luis Antonio Salazar Olivo.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	4
4. ANTECEDENTES	6
4.1 Clasificación de las Lectinas	6
4.2 Fuentes de Lectinas	6
4.2.1 Lectinas de origen vegetal	6
4.2.2 Lectinas de origen animal	10
4.2.3 Lectinas de origen bacteriano	13
4.2.4 Lectinas de origen fúngico	15
4.3 Función de las lectinas	16
4.3.1 Función en vegetales	16
4.3.2 Función en animales	17
4.3.3 Función en bacterias	17

4.5 Utilidad de las Lectinas	20
4.6 Estudio de las Lectinas	22
4.7 Ocurrencia de las Lectinas en la Dieta Mexicana	24
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo General	26
5.2 Objetivos Específicos	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1 Materiales	27
6.2 Métodos	27
6.2.1 Análisis Químico	27
6.2.2 Detección de Hemaglutininas	28
6.2.3 Caracterización Parcial	29
6.2.4 Análisis Estadístico	31
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
7.1 Escrutinio de Aglutininas	32
7.2 Caracterización Parcial de las Aglutininas de Xoconostle	37
8. CONCLUSIONES	45
9. BIBLIOGRAFÍA	47
APENDICE A	55

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PAGINA
1.	Lectinas de origen vegetal	9
2.	Lectinas solubles (tipo S)	11
3.	Lectinas de membrana (tipo C)	13
4.	Lectinas en bacterias	14
5.	Lectinas en hongos	15
6.	Lectinas para la tipificación de grupos sanguíneos humanos	20
7.	Aplicaciones de las Lectinas	22
8.	Escrutinio de Actividades Hemaglutinantes en Pepino, Huamiche, Tomate y Xoconostle	33
9.	Diferencias en Actividades Hemaglutinantes ensayadas con distintas suspensiones celulares	33
10.	Actividades Hemaglutinantes en Xoconostle	39
11.	Actividad Hemaglutinante en el Extracto de Xoconostle y sus Fracciones Obtenidos en presencia de PVP	39
12.	Inhibición de Tripsina por Fracciones de Xoconostle	43

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Aglutinación de Eritrocitos por Extractos Crudos de Xoconostle	34
2.	Análisis Electroforético de las Proteínas contenidas en los Extractos Crudos de Pepino (M1), Huamiche (M2), Tomate (M3), Xoconostle dializado y liofilizado (M4L), y Xoconostle (M4).	36
3.	Análisis Electroforético de las Proteínas contenidas en el Xoconostle.	41

2. ABSTRACT

Lectins are proteins that bind carbohydrate residues in a specific manner and are widely distributed in the living organisms. Lectins play many important physiological roles as defense mechanism in plants, or membrane receptors in animals. Also, lectins have been used both in the industry, i.e. for the isolation of human lactoferrin from cow milk, and in the academy, i.e. for the isolation and purification of biologically active glycoconjugate. Since 1900 human blood groups were typified by using lectins. Recently, lectins have been used to monitoring the changes on cell surface associated to malignant transformation and to explore new diagnostic methods for malignancies or alternative therapies for cancer.

Our country possesses an enormous vegetal diversity, and such richness is reflected by the national diet. Fruits such as cucumber (*Cucumis sativus* L.), "huamiche" (*Ferocactus hirtix* [DC.] Lindsay), "tomate verde" (*Physalis philadelphica* Lam.) and "xoconostle" (*Opuntia joconostle* Weber & Diguët), are usual components of the regional diet. However, so far there are neither studies on the presence of lectins in these fruits, nor on the biological effects of such lectins or on their possible applications. To approach these subjects, crude extracts from the seeds of these fruits were screened for the presence of hemagglutinating activities. The crude extracts of the four fruits analyzed exhibited hemagglutinating activities with different titers, such as 905 U/mg in cucumber, 320 U/mg in "huamiche", 640 U/mg in "tomate verde" and 320 U/mg in "xoconostle". Electrophoretic analyses of the extracts showed diverse polypeptide bands present in them. Protein nature of xoconostle agglutinin was analyzed by different parameters such as thermostability, and treatment with insoluble trypsin. Trypsin inhibitors were also determined in xoconostle fractions by a spectrophotometric method.

3. INTRODUCCIÓN

Las lectinas son proteínas con capacidad de unirse en forma específica a carbohidratos libres, o a residuos de carbohidratos que forman parte de algunas macromoléculas. Esta propiedad permite que las lectinas aglutinen células, al unirse a los residuos de azúcares que se encuentran en los glucolípidos o las glucoproteínas de las membranas plasmáticas. Por ello las lectinas se denominaron inicialmente como "aglutininas" (Liener y cols., 1986; Sharon y Lis, 1989).

Las lectinas se encuentran ampliamente distribuidas en todos los seres vivos y su función en éstos varía de un grupo a otro. Así, por ejemplo, se cree que su función en vegetales es la de un sistema de defensa y como de reservorio de nitrógeno (Jaffé, 1980; Peumans y Van Damme, 1996). En los animales, la función de las lectinas es más compleja, ya que por lo regular se encuentran como receptores en las membranas celulares (Drickramer y Taylor, 1993). Las lectinas en las bacterias sirven como mecanismo de adhesión que les permite fijarse al órgano blanco del huésped (Liener y cols., 1986).

Numerosas investigaciones han abordado la purificación de las lectinas de muy diversas fuentes y explorado las posibles aplicaciones de estas moléculas en la investigación, la clínica o la industria. Gracias a las lectinas se tipificaron los grupos sanguíneos, por medio de reacciones específicas entre lectinas y los azúcares de la membrana celular de los eritrocitos (Sharon y Lis, 1972; Liener y cols., 1986; Peumans y Van Damme, 1996). Recientemente se han estudiado los efectos de las lectinas sobre células transformadas y normales con la finalidad de emplearlas en el estudio y el tratamiento del cáncer. Aún no se conocen perfectamente los mecanismos de acción de las lectinas sobre células transformadas, pero se han propuesto varias hipótesis: 1) activan el mecanismo de apoptosis interactuando con receptores de membrana; 2) inhiben la mitosis de las células transformadas. Además se ha determinado que algunas lectinas son capaces de unirse selectivamente a células transformadas, lo cual permite distinguir entre células normales y células malignas, por lo que se estudia la posibilidad de su empleo en

métodos de diagnóstico (Colin, 1992; Ryder y cols., 1992; Seigel y Notter, 1992; Mody y cols., 1995; Mai y cols., 1996).

Algunos de los principales usos de las lectinas se relacionan con la purificación selectiva de compuestos de interés para el consumo humano, mediante el soporte de lectinas puras en matrices para cromatografía de afinidad (Horejsí y Kocourek, 1978). Además se han utilizado para la investigación de la arquitectura de las superficies celulares, ya que reaccionan con azúcares terminales no reducidos de glucoproteínas y glucolípidos de las membranas (Smith y Goldstein, 1967; Colin, 1992).

La relevancia económica de éstas moléculas queda de manifiesto por el hecho de que la Oficina de Patentes de los Estados Unidos de América asignó, entre Enero de 1998 y Junio de 1999, 135 patentes que reivindican el uso de lectinas en el diagnóstico de infecciones fúngicas (Laine, 1996); en la detección y tratamiento del cáncer (Robbins y Prakash, 1997); en el control de insectos plaga (Garnaat y Meyer, 1996) o en estrategias anticonceptivas en humanos (Tatarintsev y cols., 1996; Benoff, 1996).

La riqueza vegetal que existe en nuestro país se refleja en los diversos productos que integran nuestra dieta. Frutos como el pepino (*Cucumis sativus*), el huamiche (*Ferocactus hirtus*), el tomate verde (*Physalis philadelphica*) y el xoconostle (*Opuntia joconostle*) se consumen habitualmente en la región. Hasta ahora se desconoce si estos frutos presentan lectinas y cuales podrían ser los efectos biológicos de estas moléculas. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue escrutar la presencia de hemaglutininas en los frutos señalados y caracterizar parcialmente al menos una de dichas actividades.

4. ANTECEDENTES

4.1 CLASIFICACIÓN DE LAS LECTINAS

Las lectinas se han clasificado de varias formas, una de ellas es de acuerdo a los azúcares a los que se unen selectivamente. También se han clasificado de manera general en tres clases: **merolectinas**, **hololectinas** y **quimerolectinas**, de acuerdo a las moléculas que las componen (Peumans y Van Damme, 1995; 1996). Las **merolectinas** son proteínas que contienen exclusivamente un dominio de unión a carbohidratos, son polipéptidos pequeños incapaces de aglutinar células por su naturaleza monovalente. Las **hololectinas** presentan al menos dos dominios de unión a carbohidratos, se comportan como verdaderas aglutininas y comprenden la mayoría de las lectinas de plantas. Las **quimerolectinas** son una fusión de proteínas compuestas de uno o más dominios que se unen a carbohidratos y un epítipo en otro sitio de la molécula con una actividad catalítica bien definida. Dependiendo del número de sitios de unión a azúcares, las quimerolectinas se pueden comportar como merolectinas o como hololectinas (Peumans y Van Damme, 1995; 1996).

4.2 FUENTES DE LECTINAS

La distribución de las lectinas es muy amplia, ya que se encuentran en todos los seres vivos, vegetales, animales, hongos y bacterias.

4.2.1 Lectinas de origen vegetal.

Las semillas de las plantas son especialmente ricas en lectinas, por tal motivo se han purificado en mayor proporción que de otras fuentes. Muchas hemaglutininas de plantas superiores se encuentran en sus semillas, pero sus tubérculos y su savia también son fuentes de lectinas, en menor proporción que las semillas. En algunos casos, las lectinas se presentan en menor concentración en hojas, tallos y cortezas (Jaffé, 1980).

Se realizaron estudios en los que se determinó que algunas semillas inmaduras contienen lectinas que pueden estar parcialmente o completamente unidas a inhibidores, que impiden que las aglutininas se unan a células y se observe la aglutinación. Estos inhibidores de la hemaglutinación son termoestables y no se precipitan con acetona. Durante la maduración de los frutos, los títulos de hemaglutininas tienden a elevarse muy rápidamente. Esto se puede atribuir a la liberación de las lectinas de sus inhibidores (Jaffé, 1980).

Las lectinas del frijol se detectaron en su cotiledón y embrión por métodos inmunológicos. Con estos estudios observaron que las lectinas aparecían durante la maduración del frijol y desaparecían durante su germinación. Durante la germinación del frijol también se detectaron pequeñas cantidades de lectinas en varias partes de la planta (Jaffé, 1980).

Las lectinas de las plantas se han clasificado en cuatro subgrupos de acuerdo a su estructura y función (Peumans y Van Damme, 1996).

Lectinas de leguminosas. Estas lectinas se relacionan estructuralmente y sólo se encuentran en leguminosas. Exhiben un amplio intervalo de especificidad en la unión a carbohidratos. En general, consisten de 2 a 4 subunidades de 25-30 kDa, cada subunidad cuenta con un sólo sitio de unión a carbohidratos y requiere de la presencia de Ca^{2+} y Mn^{2+} (u otro ión metálico), para combinarse con carbohidratos. Las estructuras primarias de algunas lectinas se determinaron por medio de técnicas químicas o técnicas de genética molecular. Hasta el 20% de sus secuencias aminoacídicas son altamente conservadas, y tales regiones se encuentran en los sitios activos de las lectinas, la mayoría coordinadas con metales iónicos (Sharon y Lis, 1990).

Lectinas de monocotiledoneas que unen manosa. Se encuentran distribuidas en al menos cinco diferentes familias (*Amaryllidaceae*, *Alliaceae*, *Araceae*, *Liliaceae* y *Orchidaceae*). Todas ellas tienen estructura molecular similar y selectividad a azúcares específicos (Barre y cols., 1996).

Lectinas que unen quitina. Se distribuyen en cinco familias no relacionadas taxonómicamente (*Gramineae*, *Solanaceae*, *Urticaceae*, *Papaveraceae* y *Amaranthaceae*). A pesar de que existen notables diferencias en

molecular, las lectinas que unen quitina contienen dominios similares y exhiben especificidad comparable.

Proteínas del tipo 2 inactivadoras de ribosomas (RIP). Al igual que las lectinas que unen quitina, estas aglutininas se han aislado de plantas no relacionadas taxonómicamente. Todas las lectinas RIP tipo 2 son proteínas quiméricas, que están compuestas de una cadena A catalíticamente activa que se une covalentemente a través de un puente disulfuro a una cadena B que tiene afinidad por carbohidratos. Todas las lectinas RIP tipo 2 exhiben especificidad para unirse a galactosa o a N-acetilgalactosamina, a excepción de la lectina de *Sambucus nigra* (Peumans y Van Damme, 1996). La tabla 1 enlista algunas de las lectinas de origen vegetal que se han caracterizado.

Lectinas de origen vegetal.

FUENTE	TOXICIDAD ^{1, c}	ESTABILIDAD TÉRMICA ^{2, c}	PESO MOLECULAR ^a (kDa)	SUBUNIDADES ^{a, b}	ACTIVIDAD MITOGENICA ^{3, a}	ESPECIFICIDAD	
						SANGRE HUMANA ^a	AZÚCAR ^{4, a} INHIBIDOR
<i>Phaseolus max</i>	Letal	Baja	120	α_4	-	ABO	D-GalNAc
<i>Conium vulgare</i>	Moderada	Elevada	43	α_2	-	ABO	D-GalNAc
<i>Phaseolus moutanus</i>	Elevada	Moderada	124	α, α', β	?	A	D-GalNAc $\alpha_3[1Fuc\alpha_2]$ Gal
<i>Phaseolus vulgaris agglutinina</i>	Elevada	Moderada	115	α_4	+	ABO	D-Man D-GlcN
<i>Conium maculatum formis</i>	Letal		106	α_4	+	ABO	α -D-Man
<i>Conium maculatum</i>	Escasa	Inestable	52	$\alpha_2\beta_2$?	ABO	D-Man D-Glc
<i>Conium maculatum</i>	Escasa	Inestable	46	$\alpha_2\beta_2$	+	ABO	α -D-Man D-Glc

Sharon y Lis, 1972; ^b Jaffé, 1980; ^c Peumans y Van Damme, 1996

Toxicidad; Escasa = No hay síntomas de intoxicación; Moderada = Intoxicación ligera; Elevada = Efectos irreversibles de intoxicación; Letal = Muerte

Estabilidad térmica (lectina pura en solución acuosa); Inestable = 60°C; Baja = estable a 60°C; Moderada = estable a 70°C; Elevada = estable a 80°C

Actividad mitogénica en linfocitos humanos.

Sacáridos inhibidores: D-glucosa (D-Glc); D-glucosamina (D-GlcN); D-manosa (D-Man); N-acetil-D-galactosamina (D-GalNAc); fucosa (Fuc).

4.2.2 Lectinas de origen animal.

Recientemente, comenzó a crecer el interés en el estudio de las lectinas de origen animal. Estas proteínas tienen la habilidad de reconocer glucoconjugados endógenos de los animales o glucoconjugados presentes en microorganismos invasores. La descripción del receptor para la asialoglicoproteína en hígado de mamíferos, provee del primer modelo para comprender cómo los organismos animales discriminan entre varias glucoproteínas. En los últimos años, se han aislado gran cantidad de lectinas de origen animal y en algunos casos se han descrito sus funciones de reconocimiento en eventos biológicos (Drickamer y Taylor, 1993). La existencia de lectinas animales estableció que las porciones de carbohidratos en glucoconjugados pueden representar información biológica importante.

Las lectinas animales pueden clasificarse con base en la naturaleza de sus uniones a carbohidratos, los procesos en los cuales participan, su localización subcelular, y su dependencia de cationes bivalentes. En la década de los 70's las lectinas de origen animal se clasificaron en dos grandes grupos: **lectinas solubles (tipo S)** (Barondes, 1984) y **lectinas de membranas (tipo C)** (Ashwell y Harford, 1982). Alrededor de 100 lectinas de origen animal han sido determinadas a partir de sus estructuras primarias y se han relacionado con base en la similitud de sus secuencias aminoacídicas. En la amplia variedad de lectinas proteicas, la unión a carbohidratos puede ser atribuida a una porción limitada de la lectina. Este segmento activo puede ser designado como el dominio de reconocimiento a carbohidratos [CRD, por sus siglas en inglés: Carbohydrate-Recognition Domain], (Drickamer y Taylor, 1993). Estas lectinas contienen uno o más dominios de reconocimiento a carbohidratos (CRD) combinados con dominios responsables de otras funciones de la molécula. Los CRD's contienen 120 aminoácidos de longitud aproximadamente, de los cuales, 14 se conservan idénticos y otros 18 son similares en cuanto a características en sus grupos funcionales.

Lectinas solubles (tipo S). Las lectinas solubles se extraen de tejidos con soluciones amortiguadas, de ahí su nombre, a veces enriquecidas con azúcares

tejidos. Las lectinas solubles (tipo S) juegan papeles importantes en los organismos a nivel fisiológico, ya que estimulan la secreción de sustancias como mensajeros u hormonas, mediante su interacción intracelular (Barondes, 1984). Estas lectinas se distribuyen en varios tejidos, debido a que se sintetizan dentro de la célula, usualmente son intracelulares y unen β -galactósidos en ausencia de Ca^{2+} (Wang y cols., 1991). Las lectinas tipo S están bien caracterizadas en varias especies animales y pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo a la nomenclatura de Wang y cols., 1991 y Oda y cols., 1993. Algunas de las lectinas tipo S se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Lectinas solubles (tipo S)*.

NOMBRE	PRINCIPAL FUENTE	PESO APROXIMADO DE SUS SUBUNIDADES (kDa)
Lectina lactosa I (CLL-I)	Músculo embrionario, hígado de pollos adultos.	15
Lectina lactosa II (CLL-II)	Mucosa intestinal.	14
Electrolectina	Organo eléctrico de la anguila.	16.5
Lectina β -galactósido humana	Pulmón	14
Lectina de rata (RL-18)	Pulmón	18
Trombolectina	Veneno de serpiente	15

*(Liener y cols., 1986)

Algunas lectinas tipo S tienen papeles muy importantes relacionados con la matriz celular, debido a la gran afinidad que muestran hacia las estructuras de polilactosamina de la laminina. Durante la diferenciación mioblástica, estas lectinas cambian del citoplasma al fluido extracelular, lo cual sugiere una interacción con la matriz extracelular durante el desarrollo del músculo (Drickamer y Taylor, 1993).

Lectinas de membranas o dependientes de iones calcio (Tipo-C). Las lectinas animales pertenecientes al tipo-C se encontraron en suero, matriz extracelular y membranas. Las lectinas tipo C no contienen residuos aromáticos y sus iones metálicos coordinan los ligandos. Este grupo incluye: receptores endocíticos que median la endocitosis de glucoproteínas, llamados receptores tipo II, como lo son las lectinas hepáticas, asialoreceptores; los receptores de macrófagos, que pueden intervenir en la fagocitosis de microorganismos patógenos; las selectinas que se encargan de mediar la adhesión de leucocitos. Reciben el nombre de lectinas tipo C, debido a que para unirse a carbohidratos requieren la presencia de Ca^{2+} (Liener y cols., 1986; Drickamer y Taylor, 1993).

El receptor asialoglicoproteína de mamíferos se encontró en hepatocitos y tiene especificidad por galactosa y N-acetilglucosamina (Spiess, 1990). Este receptor interviene en la endocitosis de glucoproteínas séricas del sistema circulatorio. Consiste en dos polipéptidos que son similares, en su estructura, a la lectina hepática de pollo (Mc Phaul y Berg, 1986).

Algunas proteínas de receptores endocíticos relacionadas en estructura, han sido encontradas en las superficies de linfocitos. Son proteínas transmembranales que contienen su dominio de unión a carbohidratos en los COOH terminales (receptor tipo II). Estos receptores de los linfocitos, unen IgE en presencia de Ca^{2+} , aunque la desglucosilación de la IgE no afecta la unión al receptor (Bettler y cols., 1989, 1992). La unión es inhibida por péptidos específicos de la región Fc, pero no hay inhibición por azúcares (Vercelli y cols., 1989; Richards y Katz, 1990)

El receptor placentario de manosa es un receptor tipo II, ya que su CRD contiene el dominio de unión a carbohidratos en su -COOH terminal, con especificidad por manosa y fucosa. Se ha identificado plenamente en placenta humana (Curtis y cols., 1992). Algunos ejemplos de lectinas de origen animal del tipo C, se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Lectinas de membrana (tipo C)*.

NOMBRE	FUENTE PRINCIPAL	LIGANDOS	ORGANIZACIÓN	FUNCIÓN
Receptor asialoglicoproteína	Membrana Plasmática ¹	Endógenos	Transmembranal Tipo II	Receptor endocítico
Receptor a IgE Fc linfocítico	Membrana Plasmática ²	Endógenos	Transmembranal Tipo II	Receptor endocítico
Receptor de manosa	Membrana Plasmática ³	Exógenos	Transmembranal Tipo I	Receptor endocítico
Selectinas	Membrana Plasmática ⁴	Endógenos	Transmembranal Tipo I	Adhesión de moléculas

* (Drickamer y Taylor, 1993).

¹ Hepatocitos de conejo

² Linfocitos humanos y linfocitos de ratón

³ Placenta humana

⁴ Leucocitos humanos

4.2.3 Lectinas de origen bacteriano.

Algunas bacterias intactas poseen la habilidad de unir y aglutinar eritrocitos y otro tipo de células. La actividad aglutinante de bacterias se ha observado a partir de sus extractos celulares, considerando que células intactas están exentas de esta actividad. La aglutinación celular por extractos bacterianos frecuentemente se inhibe con la presencia de azúcares simples, lo que indica que la actividad se debe a una lectina presente en la superficie bacteriana o en su interior (Liener y cols., 1986).

Las lectinas de *Escherichia coli* son las lectinas de origen bacteriano mejor caracterizadas, respecto a sus propiedades moleculares y a su especificidad por carbohidratos. Estas lectinas presentan especificidad por manosa o por Gal- α -4-Gal. Otras especies de bacterias presentan moléculas tipo lectina con diversas afinidades. Así, *Vibrio cholerae* presenta moléculas tipo lectina específicas para L-fucosa, en tanto que en *Myxococcus xanthus* éstas moléculas tienen especificidad

se presentan como proteínas filamentosas en la superficie de la bacteria, en estructuras llamadas pili (Liener y cols., 1986). Un ejemplo de aglutininas presentes en forma de proteínas filamentosas es la aglutinina que se encuentra formando parte de los flagelos membranales de la bacteria. Estos flagelos intervienen en el reconocimiento y adhesión de la bacteria a distintas superficies. La aglutinina se puede extraer *in vivo*, con EDTA, (ya que la aglutinina es arrojada al medio de cultivo de la bacteria), en su forma biológicamente activa (Cooper y cols, 1983).

Varios estudios han demostrado que especies de bacterias con pili que expresan lectinas específicas para manosa, aumentan su virulencia, comparándolas con bacterias que carecen de éstos pili (Duguid y cols., 1976; Fader y Davis, 1980; Iwahi y cols., 1983). Éstos estudios demostraron claramente que las lectinas son un factor clave en la habilidad de las bacterias para causar infecciones (experimentales), ya que se fijan en las superficies de órganos blanco por medio de lectinas. Aparentemente, la posible solución para prevenir la infección son los inhibidores de adherencia, pero se requiere realizar estudios más profundos (Liener y cols., 1986).

También gracias a la presencia de lectinas en las superficies bacterianas, se activan mecanismos de defensa que facilitan su fagocitosis. Este mecanismo se observa en humanos, en donde los neutrófilos se encargan de fagocitar bacterias (Liener y cols., 1986). En la tabla 4 se mencionan ejemplos de lectinas bacterianas.

Tabla 4. Lectinas en bacterias*.

BACTERIA	ESPECIFICIDAD DE LA LECTINA
<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Erwinia caratovora</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	Manosa
<i>Escherichia coli</i>	Galactosa, N-Acetilglucosamina
<i>Vibrio cholerae</i>	L-fucosa

*(Liener y cols., 1986)

4.2.4 Lectinas de origen fúngico.

Algunos de los estudios realizados en hongos han demostrado la presencia de lectinas en este reino. La obtención de estas moléculas se realizó de manera convencional, a partir de extractos en soluciones amortiguadas con fosfatos. Las lectinas de hongos se purificaron por cromatografía de afinidad con estromas de eritrocitos del grupo O pegados a una matriz de acrilamida.

La lectina encontrada en *Flammulina veltipes* no contiene carbohidratos en su estructura y estimula el crecimiento de linfocitos de ratón (Tsuda, 1979). Una característica que tienen en común las lectinas de los hongos es que por lo regular se componen de dos subunidades diferentes, como es el caso de las lectinas de *F. veltipes* y de *Volvariella volvacea* (Guillot y cols., 1983; 1991). Los pesos moleculares de las lectinas de hongos van de 20 a 64 kDa. Algunos extractos de hongos muestran propiedades anti-H como *Xylaria polymorpha* y *Clathrus cancellatus* (Guillot y cols., 1983). Uno de los hongos más estudiados es el *Agaricus bisporus*, cuyas lectinas ejercen efectos inhibitorios sobre la proliferación de células de cáncer de colon humano, y aparentemente no tiene efecto citotóxico sobre células normales. Esto representa una ventaja, ya que en un paciente sometido a tratamiento con lectinas de *A. bisporus*, no corre riesgos en el resto de las células de su organismo (Yu y cols., 1993).

En 1953, Bernheimer y Farkas estudiaron lectinas provenientes de hongos y determinaron hacia qué grupo sanguíneo (ABO) tenían afinidad (tabla 5).

Tabla 5. Lectinas en hongos*.

ESPECIES	GRUPO SANGUÍNEO HUMANO
<i>Boletus eximus, Lactarius volemus</i>	A
<i>Agaricus campestris, Russula foetentula</i>	B
<i>Pholiota praecox, Lactarius corrugis</i>	O
<i>Boletus bicolor, Polyporus betulinus, Amanita solitaria, Cantharellus cibarius</i>	No tienen afinidad a la sangre humana

* Bernheimer y Farkas, 1953

4.3 FUNCIÓN DE LAS LECTINAS

4.3.1 Función en vegetales.

Argumentos moleculares, bioquímicos, celulares, fisiológicos y evolutivos indican que las lectinas tienen un papel muy importante en las defensas de las plantas. Se cree que las lectinas son el equivalente vegetal al sistema de anticuerpos de los animales. En gran variedad de plantas, las lectinas evitan que los herbívoros e insectos las ingieran. Se acumulan gran cantidad de lectinas en órganos vitales de estas plantas, que al ser ingeridos por los depredadores, se unen a receptores para glucanos del tracto intestinal y les provoca malestar suficiente para desalentar el ataque. Asimismo, se especula que la localización estratégica de las lectinas tiene que ver con los sitios que son potencialmente susceptibles a la infección por microorganismos. En el caso del trigo, la propuesta se ha soportado debido a que la aglutinina del germen de trigo ha sido localizada en la superficie de sus células, que son sitios potenciales de infección debido a la gran cantidad de nutrientes que contienen (Peumans y Van Damme, 1996).

Se ha encontrado que algunas lectinas ejercen un papel fungistático en semillas de soya. El desarrollo de *Phytophthora megasperma* var. *sojae*, sobre soya se ve inhibido por la presencia de la lectina. Gracias a esta lectina la soya es resistente a *P. megasperma* var. *sojae* (Liener y cols, 1986).

Se ha llegado a la conclusión que las lectinas en las plantas sirven en general como un mecanismo de defensa. Pueden llegar a impedir algunas infecciones causadas por virus y bacterias, o evitar ataques de animales superiores. Debido a la abundancia de las lectinas en los órganos de almacenamiento, que se comportan como proteínas, se cree que las plantas acumulan parte de su nitrógeno de reserva en forma de proteínas unidas a carbohidratos y que pueden ser usadas como mecanismo de defensa pasiva (Peumans y Van Damme, 1995).

Las lectinas también juegan un papel importante en la relación de simbiosis que existe entre las plantas y las bacterias *Rhizobium*, ya que estas bacterias se unen con mayor facilidad a las plantas que contienen lectinas (Jaffé, 1980).

4.3.2 Función en animales.

Las lectinas animales funcionan como receptores, ubicados en la membrana plasmática de las células. Un ejemplo clásico es la asialoglicoproteína que se encuentra en los hepatocitos de mamíferos y que actúa como receptor que interviene en la endocitosis de glucoproteínas séricas, debido a que su unión es específica a ciertos azúcares (Liener y cols., 1986; Drickamer y Taylor, 1993). Otra función que realizan las lectinas en los organismos animales es la estimulación mitogénica, tanto en linfocitos como en otros tipos de células. Se tienen evidencias de que la unión de ciertas lectinas a linfocitos T provoca la formación de receptores funcionales para interleucina-2 y la producción de factores de crecimiento para la proliferación de linfocitos (Totterman y cols., 1979; Larsson y cols., 1980).

4.3.3 Función en bacterias.

La adhesión de bacterias a células epiteliales del tracto respiratorio, gástrico y de la mucosa genital, se considera el primer paso en un proceso infectivo. La adhesión permite a la bacteria el contacto físico con la célula huésped, localizar sus nutrientes, resistir los lavados por los fluidos de la zona y colonizar el tejido (Beachey, 1981).

La especificidad de la adhesión bacteriana reside en las proteínas de la superficie de órganos llamados pili o fimbrias. Estas proteínas les permite reconocer de manera específica glucoproteínas y glucolípidos de las membranas celulares del huésped. En algunos casos, la adhesión se inhibe en presencia de monosacáridos y oligosacáridos, lo que indica que estas adhesinas son lectinas (Rhodes y Milton, 1998).

La virulencia de las bacterias está directamente relacionada con la presencia de lectinas en sus pili o fimbrias. Esto se ha comprobado mediante estudios en los que infecciones gastrointestinales producidas por *Salmonella typhimurium* en ratones (Duguid y cols., 1976), infecciones del tracto urinario causadas por *Klebsiella pneumoniae* en ratas (Fader y Davis, 1980) e infecciones urinarias por *Escherichia coli* en ratones (Iwahi y cols., 1983), han sido mortales únicamente cuando las

bacterias tenían fimbrias, en cambio los animales inoculados con bacterias carentes de fimbrias sobrevivieron.

Las lectinas en las bacterias desempeñan la función de fijar a la bacteria al órgano blanco, lo que hace que la bacteria sea más virulenta que las bacterias que carecen de lectinas en sus membranas (Liener y cols., 1986). Se han aislado aglutininas de órganos de bacterias como las que se encuentran en los pili de *Chlamydomonas reinhardi* y tienen la función de reconocimiento y adhesión de gametos (Cooper y cols., 1983). El *Streptococcus pyogenes* se adhiere a células epiteliales mediante la proteína M, adhesina que le facilita el proceso de infectividad (Wang y Stinson, 1994).

La presencia de lectinas en las bacterias también representa ciertas desventajas para éstas, ya que esas moléculas, facilitan su reconocimiento como partículas extrañas al organismo huésped y son fagocitadas por los neutrófilos (Liener y cols., 1986).

4.4 TOXICOLOGÍA DE LAS LECTINAS

Casi todas las leguminosas que se consumen contienen lectinas en sus semillas. Su concentración es relativamente elevada, pero muchas de ellas son termolábiles y se inactivan mediante el proceso de cocción. Un ejemplo de ello son las lectinas contenidas en el frijol (Sharon y Lis, 1989; Peumans y Van Damme, 1996).

Algunas lectinas son termoestables y se mantienen funcional e inmunológicamente intactas. Un ejemplo de lectinas termoestables es la lectina contenida en *Glycine max*, que se mantiene estable después de someterse a 140°C durante 10 minutos (Ramamani y cols., 1996). Por ello, algunas lectinas presentes en alimentos permanecen activas aún después de la cocción de éstas y pueden interactuar con las células del epitelio intestinal y alterar su funcionamiento (Rhodes y Milton, 1998).

Los posibles efectos adversos del consumo de lectinas en humanos están pobremente documentados, por razones obvias. La información sobre toxicidad de

accidental. Después de la ingestión de lectinas contenidas en semillas, la muerte sobreviene (Peumans y Van Damme, 1996).

El efecto de las lectinas en el laboratorio sólo se ha observado en animales como ratas o cerdos, resultados que no pueden extrapolarse mecánicamente a humanos. Además la toxicidad también depende de la especie y etapa de desarrollo del animal. Los animales se someten a dietas con las lectinas y se observan los efectos en varios órganos. En algunos, causan hiperplasia o aplasia, pero el mecanismo por el cual se producen estos efectos no se ha dilucidado (Cuatrecasas, 1973; Jaffé, 1980; Carraro y cols., 1993; Yu y cols., 1993). No todas las lectinas producen efectos tóxicos en animales de experimentación. Algunas semillas crudas causan un retardo en el crecimiento, efectos antinutricios y algunas veces hasta la muerte (Jaffé, 1980). Los mejores indicadores de efectos antinutricionales son los cambios de peso corporal, el cambio de peso en los órganos internos, así como el crecimiento del animal (Rhodes y Milton, 1998). Varios investigadores han propuesto que la toxicidad de las lectinas contenidas en frijol puede atribuirse a su habilidad de unirse con receptores de la superficie de las células que recubren el intestino. Esta suposición fue comprobada mediante estudios con inmunofluorescencia, en los cuales se observó la presencia de partículas marcadas, unidas a la microvellosidad de la mucosa intestinal de una rata alimentada con lectinas de frijol. El daño ocasionado por lectinas a la mucosa intestinal provoca una disminución en la absorción de nutrientes a través de la pared del intestino. Lo anterior se demostró *in vitro* cuando el intestino tomado de animales alimentados con lectinas, mostró una marcada disminución en la absorción de glucosa comparándola con el control. Con estos resultados se llegó a la conclusión de que las lectinas se unen a las células intestinales causando una interferencia inespecífica en la absorción de nutrientes (Jaffé, 1980). La habilidad de las lectinas para disminuir la capacidad de absorción intestinal, no sólo se refiere a glúcidos. Existen lectinas capaces de disminuir la absorción de L-histidina en ratones, como la lectina de *Pisum arvense* (Liener y cols., 1986).

4.5 UTILIDAD DE LAS LECTINAS

Las lectinas juegan papeles muy importantes. Desde 1900 Karl Landsteiner tipificó los grupos sanguíneos por medio de reacciones específicas de lectinas con los azúcares de la superficie celular de los eritrocitos (Liener y cols., 1986). A partir de este descubrimiento, se evitaron muertes debido a reacciones transfusionales. Uno de los usos más frecuentes de las lectinas es en banco de sangre para la tipificación de grupos sanguíneos.

Tabla 6. Lectinas para la tipificación de grupos sanguíneos humanos*.

GRUPO SANGUÍNEO QUE AGLUTINA	ORIGEN DE LA LECTINA
A	<i>Phaseolus limensis</i> <i>Vicia cracca</i> <i>Dolichos biflorus</i> <i>Crotalaria aegyptiaca</i>
AB	<i>Sophora japonica</i> <i>Calpurina aurea</i>
H	<i>Cytisus sessilifolius</i> <i>Laburnum alpinum</i> <i>Lotus tetragonolobus</i> <i>Ulex europeus</i>
M	<i>Iris amara</i>
N	<i>Vicia graminea</i> <i>Bauhinia purpurea</i>

*(Sharon y Lis, 1972).

Algunos de los principales usos de las lectinas se relacionan con la purificación selectiva de compuestos de interés para el consumo humano, mediante el soporte de las mismas (puras) en matrices para cromatografía de afinidad, debido a que la unión es muy selectiva (Horejsí y Kocourek, 1978). Además, se han utilizado para la investigación de la arquitectura de las superficies celulares, ya que reaccionan con azúcares terminales no reducidos de glucoproteínas y glucolípidos de las membranas (Smith y Goldstein, 1967; Colin, 1992).

Existen aún muchas aplicaciones de las lectinas que no han sido estudiadas. En los últimos 22 años (1976-1998), la Oficina de Patentes de los Estados Unidos otorgó 2,620 patentes que usan lectinas en distintas aplicaciones.

Una de las lectinas más conocidas es la concanavalina A. Se han reportado varios usos de esta lectina. Hauptmann y cols. (1995) patentaron la identificación de receptores para el factor de necrosis tumoral, las proteínas que se unen a él y su código genético de síntesis, mediante concanavalina A (Hauptmann y cols., 1995). Se ha patentado también un procedimiento para purificar lactoferrina humana de muestras de leche, utilizando una columna de cromatografía con concanavalina A (Nuyens y Nan Veen, 1995). Se ha ideado un método para el diagnóstico de leishmaniasis visceral por un marcador clave llamado 9-*o*-acetilado sialoglicoconjugado. La identificación con el marcador clave se logró con la ayuda del ácido 9-*o*-acetil siálico unido a la lectina achatinin-H, con la que se une específicamente, y se logra una rápida reacción de aglutinación para el diagnóstico de leishmaniasis visceral. Esta prueba tiene la ventaja de ser semicuantitativa si se realizan diluciones seriadas con cantidades conocidas de la lectina (Mandal y cols., 1997).

En las últimas décadas, se purificaron gran cantidad de lectinas de plantas, animales, bacterias y virus, por medio de la cromatografía de afinidad utilizando compuestos a los que se unen específicamente (Sharon y cols., 1972; Horejsí y Kocourek, 1978; Seigel y Notter, 1992; Mai y cols., 1996).

La especificidad de las lectinas para unirse a carbohidratos de glucoproteínas y glucolípidos de las superficies celulares ha mostrado uno de los efectos más dramáticos de la interacción entre lectinas y células: la estimulación mitogénica. Este efecto ha permitido utilizar las lectinas en el análisis de los eventos que ocurren durante la activación y proliferación linfocítica (Rhodes y Milton, 1998). Cambios en la expresión de carbohidratos en la superficie de células de cáncer, son comunes durante la neoplasia. Los cambios que sufren los carbohidratos son un dato crítico en el comportamiento metastásico de los tumores (Nicolson, 1982; Raz y Lotan, 1987). Por tal motivo, las lectinas pueden ser empleadas para dar

seguimiento a la evolución metastásica de los tumores. Se han descubierto gran cantidad de aplicaciones de la lectinas, algunas se mencionan en la tabla 7.

Tabla 7. Aplicaciones de las Lectinas.

FUENTE DE LA LECTINA	APLICACIÓN
<i>Bowringia mildbraedi</i> ¹	Efecto sobre la infectividad de VIH
<i>Epipactis helleborine</i> ²	Inhibidor de la replicación <i>in vitro</i> de VIH y CMV
<i>Lens culinaris</i> ³	Análisis de la α -fetoproteína humana Caracterización de cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Codium tomentosum</i> ⁴	Interacción con parásitos intestinales
<i>Psathyrella velutina</i> ⁵	Estudio de la glucosilación anormal de la IgG reumatoide
<i>Aleuria aurantia</i> ⁶	Caracterización de glucoproteínas en cerebro Identificación de receptores, específicos para fucosa, en retina de conejos
<i>Phaseolus vulgaris</i> ⁷ (Leucoaglutinina)	Estudio de las conexiones neuronales
<i>Pisum Sativa</i> ⁸	Detección de cáncer de próstata

¹ Chawla y cols., 1993

² Balzarini y cols., 1992

³ Taketa y cols., 1983; Schalla y cols., 1985

⁴ Llovo y cols., 1993

⁵ Tsuchiya y cols., 1993

⁶ Ohlson y Karlsson, 1983; Hall y Karlsson, 1985

⁷ Wouterlood y Groenewegen, 1991

⁸ Klein y cols. 1999

4.6 ESTUDIO DE LAS LECTINAS

Durante su trabajo doctoral en la Universidad de Dopart, Stillmark inició el estudio de las lectinas en sustancias de algunas plantas de la familia Euphorbiaceae. Cuando obtuvo una preparación proteica parcialmente pura de *Ricinus communis* (higuerilla) a la que llamó ricino, realizó algunas pruebas en sangre. Observó que al agregar el ricino, los eritrocitos se unían unos con otros formando un "coágulo". Stillmark observó también la aglutinación de hepatocitos, células epiteliales y leucocitos. Kobert publicó resultados similares a los de Stillmark 15 años después

estudio de las lectinas. Posteriormente se desarrollaron otras pruebas con distintos extractos de semillas que confirmaron las observaciones de Stillmark y Kobert (Sharon, 1972; Liener y cols., 1986).

La detección de lectinas se realiza por reacciones de aglutinación de células en suspensión, normalmente eritrocitos humanos o de conejo, en alguna solución salina amortiguada (Liener y cols., 1986). Aunque una reacción positiva de aglutinación indica la presencia de lectinas, la evidencia contundente sólo la da el aislamiento y caracterización de la proteína pura. Un resultado negativo no indica la ausencia de lectinas, algunas lectinas no se detectan por aglutinación. Las lectinas pueden pasar desapercibidas por varias razones, una de las más comunes es que sólo reaccionen con eritrocitos de especies animales bien definidas. En algunas ocasiones la actividad hemaglutinante es tan baja que no se detecta en el extracto crudo (Sharon y Lis, 1972; Horejsí y Kocourek, 1978; Tsuda, 1979; Nunomura, 1991).

Las lectinas pueden ser purificadas de extractos de plantas por técnicas convencionales de purificación de proteínas, como fraccionamiento del extracto crudo por saturación con sales y cromatografía (England y Seifer, 1990; Singh y Singh, 1996).

Paul Ehrlich fue quien propuso que las lectinas tenían un modelo de acción antigénico, en el que la actividad de la lectina podía ser inhibida por una molécula que se le unía específicamente (Liener y cols., 1986). Por ello, uno de los ensayos para corroborar la presencia de lectinas es la inhibición de la actividad hemaglutinante mediante carbohidratos.

Karl Landsteiner inició en 1900 el estudio de aglutininas presentes en plantas y de su afinidad diferencial por células sanguíneas (Liener y cols., 1986). Los trabajos de Landsteiner permitieron tipificar los grupos sanguíneos del sistema ABO (Liener y cols., 1986). Se identificaron características de algunas aglutininas de plantas que presentaban propiedades como: solubilidad en agua, no dializables, insolubles en alcohol, termolábiles y precipitación por saturación con sales (Liener y cols., 1986).

El uso de lectinas en estudios de cáncer se inició con el descubrimiento de una lectina contaminante en una preparación de liposomas que aglutinaba células

tumorales de ratón (Liener y cols., 1986). Trabajos posteriores sugirieron que las células normales y las células malignas diferían en sus glucoconjugados de superficie. También observaron que aglutininas contenidas en germen de trigo aglutinaban células leucémicas, por lo que se incrementó el interés en este tipo de moléculas (Liener y cols., 1986; Mai y cols., 1996).

Actualmente, se han estudiado más a fondo sus efectos en células transformadas y células normales con la finalidad de emplearlas en la terapia del cáncer. Aún no se conocen los mecanismos de acción de las lectinas sobre células transformadas, pero se han propuesto varias hipótesis. Una de ellas propone que interactúan con receptores de membrana activando el mecanismo de apoptosis e inhibiendo la mitosis de las células transformadas. Se ha determinado que algunas lectinas son capaces de unirse selectivamente a células transformadas lo cual permite distinguir entre células normales y células malignas, por lo que se estudia la posibilidad de su empleo en métodos de diagnóstico y terapias dirigidas selectivamente (Colin, 1992; Ryder y cols., 1992; Seigel y Notter, 1992; Mody y cols., 1995; Mai y cols., 1996).

4.7 OCURRENCIA DE LAS LECTINAS EN LA DIETA MEXICANA

Gracias a la gran biodiversidad que México posee, la dieta de nuestra población es muy variada, pero aún se desconoce la ocurrencia de lectinas en muchos de los alimentos de la dieta nacional, así como los efectos que estas lectinas tendrían en nuestro organismo. En nuestro país, la población acostumbra consumir el pepino en ensaladas. El tomate se consume por lo regular en guisos y salsas; cuando se licúa el fruto, las semillas se rompen y liberan parte de su contenido. Aún no se ha estudiado cuál es el efecto que las moléculas contenidas en las semillas de éstos frutos pueden tener en el organismo.

En la República Mexicana, se reconoce como nopales a gran variedad de especies del género *Opuntia* de la familia botánica *Cactaceae*. Las cactáceas son originarias de nuestro país y se han distribuido a otras partes del mundo a partir del siglo XVI

Hasta ahora se han reconocido para México varias especies de *Opuntia* que se desarrollan en zonas áridas, semiáridas, cálidas y templadas. Se encuentran desde el nivel del mar hasta cerca de los 3000 metros en varios estados de la República; pueden ser silvestres en algunos tipos de vegetación o cultivados (Villegas, 1995).

El Xoconostle, también conocido como Xoconol, Choconostle, Joconostle (*Opuntia joconostle*) provee de la tuna que lleva estos mismos nombres. Es una tuna subglobosa, de 5 a 10 cm de largo, de color púrpura, púrpura verdoso o verde grisáceo, de pulpa rosa ácida cercana a las semillas y blanquisca en su parte más externa. Estos frutos son considerados como verdura y especia o condimento; en Querétaro se usan para elaborar botanas, salsas, postres y guisados (Villegas, 1995).

La importancia de realizar este escrutinio, fue determinar la presencia o ausencia de lectinas en frutos de la región. Una vez que se encontró actividad hemaglutinante, se precipitó con sulfato de amonio, posteriormente se estudió la naturaleza de la molécula y se realizó una caracterización parcial que permitirá que en estudios posteriores se determine qué tipo de beneficios se podrían obtener. Ya sea efectos biológicos sobre células transformadas y normales, mecanismo de acción, purificación de alguna molécula de interés, determinar alguna estructura celular, entre otros.

Los usos de las lectinas son muy amplios y gran variedad de fuentes no se han estudiado, por lo que es importante conocer más acerca de los beneficios que podemos obtener de ellas. Con la finalidad de escrutar la presencia de aglutininas en algunos frutos de la dieta regional, se plantearon los siguientes objetivos.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

1. Escrutar la presencia de hemaglutininas en algunos frutos comestibles de la región y caracterizar parcialmente la naturaleza de al menos una de dichas hemaglutininas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Escrutar la presencia de hemaglutininas en los frutos pepino, huamiche, tomate verde y xoconostle.
2. Fraccionar mediante precipitación con sulfato de amonio el extracto crudo que muestre mayor actividad hemaglutinante.
3. Determinar la presencia de hemaglutininas en las diferentes fracciones obtenidas.
4. Ensayar la naturaleza proteica y la termoestabilidad de la aglutinina de mayor actividad.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

Los frutos de pepino, huamiche, tomate verde y xoconostle, se obtuvieron del mercado local. La sangre de conejo se obtuvo del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro. La tripsina, la albúmina sérica bovina, el N-benzoil-L-arginin etil éster (BAEE), el fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF), la polivinil pirrolidona (PVP) y las membranas para diálisis fueron de SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO). El sulfato de amonio y el resto de las sales empleadas, así como los solventes, fueron de J.T. Baker (Xalostoc, México). Los reactivos, el equipo para electroforesis y el dodecil sulfato de sodio (SDS) fueron todos de BIO-RAD (Hercules, CA). El resto de los reactivos que se emplearon fueron todos de grado analítico. La presencia de inhibidor de tripsina se realizó con las facilidades otorgadas por el Dr. Alejandro Blanco Labra del CINVESTAV Unidad Irapuato.

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Análisis Químico.

6.2.1.1 Preparación del Material. Las semillas de los frutos de pepino, huamiche y xoconostle se extrajeron manualmente; las semillas de tomate verde se recuperaron por sedimentación de un licuado del fruto. Las semillas se secaron durante 24 horas a temperatura ambiente y 48 horas a 36°C. Una vez secas, las semillas se molieron para obtener las harinas correspondientes.

6.2.1.2 Obtención de Extractos Crudos. Las harinas de las semillas se delipidizaron, con una mezcla de cloroformo:metanol (2:1), a razón de 5 mL de solvente por gramo de harina, a 4°C. El extracto crudo se obtuvo a partir de harinas delipidizadas adicionando 10 mL de una solución salina amortiguada con fosfatos

agitando la mezcla a 4°C, durante 45 a 48 horas. El amortiguador incluyó un inhibidor de proteasas (PMSF) con la finalidad de minimizar la degradación de las proteínas, y polivinil pirrolidona (PVP) para atrapar compuestos fenólicos, que pudieran interferir en la reacción de hemaglutinación, dando falsos positivos. Después de la extracción, el sobrenadante se recuperó por centrifugación (10,000 r.p.m., 20 min., a 4°C). Los extractos crudos obtenidos se alicuotaron y almacenaron a -20°C hasta su uso. En el caso del xoconostle, también se obtuvo un extracto crudo de la pulpa (mesocarpio) del fruto por el método descrito, pero, empleando solo 1.5 mL de amortiguador por gramo de pulpa. Para facilitar el manejo de los datos se le asignó a cada extracto crudo una clave: M1=PEPINO, M2=HUAMICHE, M3=TOMATE, M4=XOCONOSTLE

6.2.1.3 Cuantificación de Proteínas. El contenido de proteínas en los extractos crudos o sus fracciones se cuantificó por el método de Bradford (1976). Las lecturas de absorbencia se realizaron en un espectrofotómetro uv/vis a 595 nm, usando albúmina sérica bovina como estándar.

6.2.2 Detección de Hemaglutininas.

6.2.2.1 Ensayo de Hemaglutinación. Los ensayos de hemaglutinación se realizaron en placas de ELISA de 96 pozos empleando una suspensión de eritrocitos de conejo al 2% en PBS, previamente tratados con tripsina 0.15%. En estos ensayos se usaron tanto eritrocitos de conejo frescos como eritrocitos de conejo fijados con glutaraldehído, ya que éstos últimos tienen una vida útil más prolongada para el ensayo de hemaglutinación (Turner y Liener, 1975). Los ensayos de hemaglutinación se realizaron por el método de Lis y Sharon (1981), que a continuación se describe brevemente.

Se colocaron 50 µL de PBS en cada pozo de la placa de ELISA. En los primeros pozos de cada línea (1A, 2A, 3A...) se agregaron, en tratamientos por duplicado, 50 µL de cada extracto crudo o fracción ajustados a una concentración de proteína de 2 mg / mL. A partir de estos pozos se prepararon diluciones dobles seriadas para

positivo utilizando concanavalina A (2 mg / mL) y un control negativo en el que sólo se colocó PBS. Por último, se agregaron a cada pozo 50 µL de la suspensión de eritrocitos de conejo al 2% frescos o fijados con glutaraldehído. La microplaca se incubó a 35°C durante 3 horas y, se observó al microscopio invertido para determinar el grado de aglutinación. La hemaglutinación se estimó mediante una escala apreciativa como alta (+++), media (++) , baja (+) y nula (-). La actividad específica de la hemaglutinación se cuantificó mediante la ecuación:

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

en donde **AE** es la actividad específica hemaglutinante expresada en unidades por mg de proteína (U/mg), **n** es la última dilución con aglutinación apreciable al microscopio y **mg** es la cantidad de proteínas, expresada en mg que se utilizó en el ensayo (Jaffé, 1980). Una vez que se evaluó la actividad específica de cada extracto, se seleccionó el que mostró una mayor actividad aglutinante y se fraccionó parcialmente mediante precipitación con sulfato de amonio.

6.2.3 Caracterización Parcial.

6.2.3.1 Fraccionamiento con Sulfato de Amonio. Para llevar a cabo la precipitación con sulfato de amonio, se realizaron ensayos preliminares y con base en ellos se decidió saturar el extracto de xoconostle, que mostró aglutinación intensa, al 50%. Se adicionó la cantidad de sulfato de amonio necesaria para saturar al 50% (Englard, 1990) el extracto elegido, y una vez que toda la sal entró en solución se incubó el extracto con agitación suave a 4°C por una hora. Al término de la incubación, el extracto se separó en precipitado y sobrenadante mediante centrifugación (10,000 r.p.m., 20 min., 4°C). Ambas fracciones, así como el extracto crudo, se dializaron a través de una membrana con tamaño de corte de 12 kDa, contra 50 volúmenes de agua tridestilada a 4°C. En los casos en los que no fue posible la diálisis, las muestras se ultrafiltraron por una membrana de corte de 10 kDa. Se liofilizaron las muestras después de la diálisis, para concentrar la proteína

extractos crudos y sus fracciones se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida de 7.5, 12.5 y 15%, en condiciones desnaturalizantes no reductoras.

6.2.3.2 Naturaleza Proteica. La naturaleza proteica de la actividad hemaglutinante se evaluó incubando las muestras con tripsina insoluble (15 min., 36°C), con agitación esporádica. Al término, se retiró la tripsina insoluble por centrifugación (12,000 r.p.m., 5 min., 4°C) y se probó si la actividad hemaglutinante estaba presente después de este tratamiento.

6.2.3.3 Inhibidores de Tripsina. La presencia de inhibidores de tripsina en las fracciones del xoconostle se analizó empleando una solución de BAEE (0.014 M) como sustrato de la tripsina y una solución de la misma en HCl 0.001 N, utilizando un método espectrofotométrico (Schwartz y Takenaka, 1955), con base en los siguientes criterios:

- Una unidad de tripsina se definió como un incremento de 0.01 de absorbencia a 253 nm.
- La actividad inhibitoria se definió como el número de unidades de tripsina inhibidas.

$$\text{Act./mL} = \frac{\text{D.O./min.}}{(0.01) \text{ (mL de alicuota de la enzima)}}$$

$$\text{UI/mL} = \frac{(\text{D.O./min. C.E.} - \text{D.O./ min. muestra})}{(0.01) \text{ (mL de alicuota de la enzima)}}$$

$$\text{Act. Esp.} = \frac{\text{UI/mL}}{\text{mg/mL de proteína}}$$

en donde **Act./mL** es la actividad inhibitoria por mililitro; **UI/mL** son las unidades de inhibición por mililitro; **Act. Esp.** es la actividad inhibitoria por miligramo de proteína; **D.O.** es la densidad óptica; **C.E.** es la enzima control y **min.** es el tiempo

6.2.3.4 Termoestabilidad. La estabilidad térmica de las actividades aglutinantes se evaluó tratando las muestras a la temperatura de 90°C durante 15 minutos. La muestra tratada se centrifugó (12,000 r.p.m., 5 min., a 4°C) y de inmediato se realizó la prueba de hemaglutinación con el sobrenadante recuperado.

6.2.4 Análisis Estadístico.

La cuantificación de proteínas, la detección de aglutininas y los experimentos de la purificación parcial se efectuaron al menos dos veces obteniéndose la media y la desviación estándar como medida de dispersión de los datos. Las curvas estándar se procesaron mediante regresión lineal simple.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 ESCRUTINIO DE AGLUTININAS

La presencia de aglutininas en pepino, huamiche, tomate y xoconostle se analizó mediante el escrutinio de extractos crudos obtenidos de las semillas de estos frutos (ver Materiales y Métodos). Los extractos crudos obtenidos contuvieron una baja concentración de proteínas. Los ensayos de hemaglutinación iniciales mostraron elevadas actividades específicas en los extractos crudos de pepino y de tomate, en tanto que en los extractos crudos de huamiche y xoconostle se observaron actividades específicas menores (tabla 8). No obstante, la hemaglutinación observada en el extracto de xoconostle mostró una marcada intensidad; esto es, aunque la hemaglutinación en este extracto se observó en pocas diluciones, el grado de aglutinación celular fue muy marcada en todas ellas (tabla 9).

Como se mencionó anteriormente, la presencia de actividades aglutinantes se detecta empleando suspensiones de eritrocitos de diversas especies. Sin embargo, estas células tienen un tiempo de vida corto, y distintas preparaciones de eritrocitos pueden dar diferencias en las actividades aglutinantes de una misma fuente. Por ello, con el fin de obtener una mayor eficiencia en los ensayos de hemaglutinación, los eritrocitos de conejo se fijaron con glutaraldehído (Turner y Liener, 1975), previamente a su empleo. Este procedimiento aumentó la vida útil de las células en los ensayos de hemaglutinación y permitió el empleo de una sola muestra de sangre de conejo durante el resto de los ensayos; con ello se minimizó la variabilidad entre éstos (tabla 9). La figura 1B muestra la aglutinación de eritrocitos fijados con glutaraldehído luego de ser incubados con el extracto crudo de xoconostle durante 3 horas a 37°C. Los eritrocitos incubados únicamente con PBS en las mismas condiciones (tratamiento control) no mostraron aglutinación (figura 1A).

De acuerdo a los resultados obtenidos, todos los extractos crudos analizados presentaron actividades hemaglutinantes (tabla 8, tabla 9). En todos los ensayos de

Tabla 8. Escrutinio de Actividades Hemaglutinantes en Pepino, Huamiche, Tomate y Xoconostle.

FRUTOS	PROTEÍNA (mg/mL)	ULTIMA DILUCIÓN CON AGLUTINACION	AE (U/mg)	UNIDADES TOTALES
Pepino	2.9	6.5±0.5	905.0	170610.7
Humaiche	2.5	5±0	320.0	120000.0
Tomate	1.7	6±0	640.0	87040.0
Xoconostle	1.0	5±0	320.0	22400.0

La capacidad hemaglutinante de extractos crudos, obtenidos de harinas delipidizadas de las semillas, se probó en suspensiones recién preparadas de eritrocitos frescos de conejo, como se indica en Materiales y Métodos. Las actividades se observaron después de 3 horas de incubación (37°C).

Tabla 9. Diferencias en Actividades Hemaglutinantes ensayadas con distintas suspensiones celulares.

MUESTRA	SUPENSIÓN CELULAR			
	1		2	
	INTENSIDAD	AE (U/mg)	INTENSIDAD	AE (U/mg)
Pepino	++	452.540	++	320.000
Huamiche	+	905.096	+	320.000
Tomate	+++	320.000	+++	320.000
Xoconostle	+++	226.270	+++	1280.000
Concanavalina A	++	640.000	++	640.000

Las actividades hemaglutinantes de extractos crudos de los frutos señalados se analizaron en dos preparaciones de eritrocitos de conejo provenientes de distinta fuente. Previamente a su empleo los eritrocitos se fijaron con glutaraldehído al 0.1%. La hemaglutinación se cuantificó luego de 2 horas de incubación a 37°C. Se utilizó concanavalina A (1mg/mL) como control positivo.

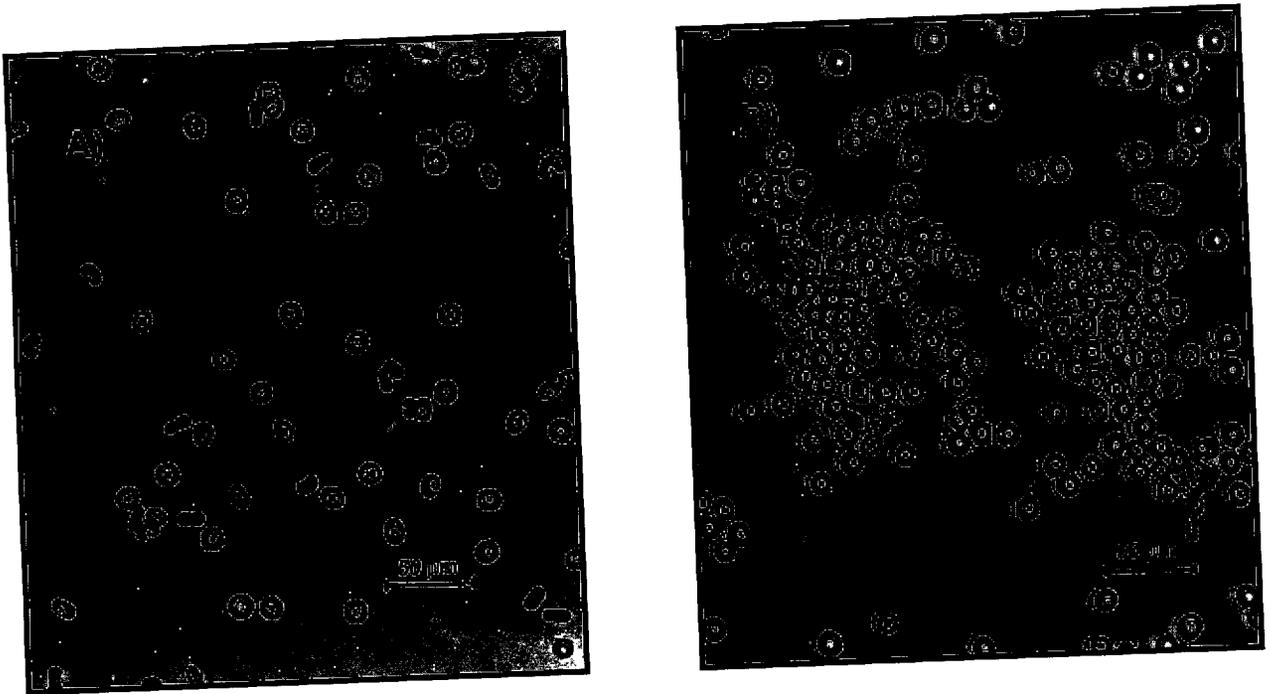


Fig. 1. Aglutinación de Eritrocitos por Extractos Crudos de Xoconostle. Suspensiones de eritrocitos de conejo fijados con glutaraldehído (ver Materiales y Métodos) se incubaron con una solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) (A), o con distintas concentraciones de proteína del extracto crudo de Xoconostle preparado en PBS (B). Las muestras se analizaron al microscopio invertido luego de 3 horas de incubación a 37°C.

fue más intensa que la observada en los extractos de los otros frutos (tabla 9). Por ello, se eligió el extracto crudo de xoconostle para un fraccionamiento parcial de sus actividades hemaglutinantes mediante precipitación diferencial con sulfato de amonio. Todos los extractos crudos, mostraron actividades hemaglutinantes semejantes a las de una lectina pura (concanavalina A), lo que indica una fuerte actividad tipo lectina en los extractos de pepino, huamiche, tomate verde y xoconostle.

Uno de los métodos más empleados para evaluar la presencia de moléculas proteicas en una mezcla compleja, y determinar su peso molecular aproximado, es la electroforesis en geles de poliacrilamida. Para determinar la presencia de proteínas en los extractos crudos de los frutos estudiados, muestras de éstos se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12.5%. Las electroforesis se realizaron en condiciones desnaturalizantes no reductoras, y los geles obtenidos se tiñeron con azul de Coomasie. Los análisis electroforéticos permitieron determinar la presencia de proteínas en los extractos estudiados. La Fig. 2 muestra el patrón electroforético de los extractos crudos de pepino, huamiche, tomate y xoconostle. En el extracto crudo de pepino (M1) se observaron bandas proteicas de entre 15 kDa y 60 kDa, en tanto que el extracto crudo de tomate (M3) mostró bandas con pesos moleculares aproximados de 30 kDa a 70 kDa. Por otro lado, los extractos crudos de huamiche (M2) y xoconostle (M4) mostraron un menor número de bandas; el primero de ellos mostró una sola banda de alrededor de 28 kDa, en tanto que el segundo expresó principalmente dos bandas de 25 y 21 kDa, tanto en el extracto crudo como en el extracto dializado y liofilizado (M4_L). La baja resolución de algunas de las bandas presentes en el análisis electroforético pudo deberse tanto a la baja cantidad de proteína de los extractos, como a las limitantes propias del método de tinción.

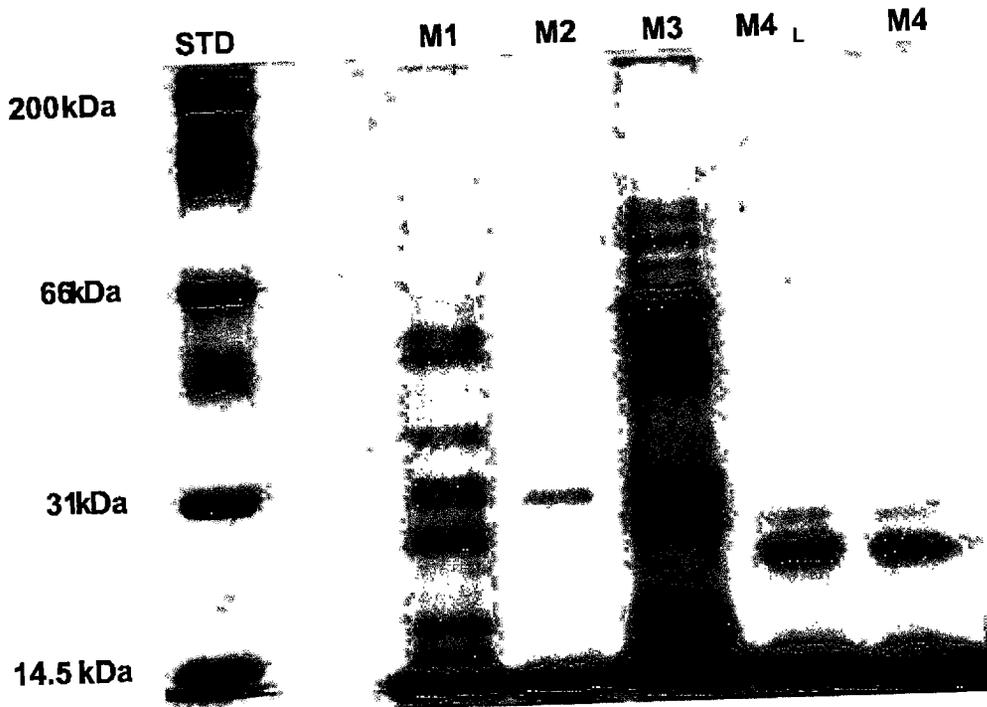


Fig. 2. Análisis Electroforético de las Proteínas contenidas en los Extractos Crudos de Pepino, Huamiche, Tomate y Xoconostle. Los extractos crudos de pepino (M1), huamiche (M2), tomate (M3) y xoconostle (M4) se analizaron en geles de poliacrilamida al 12.5% con SDS, en condiciones no reductoras. El gel se tiñió con azul de Coomassie. En el carril número 1 se corrieron los estándares de peso molecular (STD).

7.2 CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LAS AGLUTININAS DE XOCONOSTLE

FRACCIONAMIENTO CON SULFATO DE SODIO.

La precipitación con sulfato de amonio es una técnica que permite fraccionar o concentrar las proteínas presentes en mezclas complejas. Puesto que el extracto crudo de xoconostle mostró una intensa actividad hemaglutinante, se inició una caracterización de la(s) molécula(s) responsable(s) de tal actividad. Para ello se adicionó sulfato de amonio a 100 mL de extracto crudo de semillas de xoconostle hasta alcanzar un 50% de saturación. Al término del fraccionamiento se recuperaron un sobrenadante (M4S₅₀) y un precipitado (M4P₅₀), los cuales se dializaron para eliminar el exceso de sales como se indica en Materiales y Métodos. Asimismo, para explorar la presencia de actividades hemaglutinantes en otros tejidos del xoconostle diferentes de las semillas, se obtuvo también un extracto crudo de la pulpa del xoconostle (M4PULPA). Puesto que la concentración de proteínas en tal extracto fue muy baja, éste se saturó al 90% con sulfato de amonio para concentrar la proteína. Posteriormente, el precipitado se ultrafiltró a través de una membrana de corte de 10 kDa para eliminar las sales. La actividad específica hemaglutinante del extracto del xoconostle y de sus fracciones se evaluó mediante ensayos de hemaglutinación.

Como se muestra en la tabla 10, las dos fracciones derivadas del extracto crudo de semillas de xoconostle, M4P₅₀ y M4S₅₀, mostraron elevadas actividades hemaglutinantes. Esto indica que la actividad hemaglutinante observada en el extracto crudo de semillas de xoconostle se debió a por lo menos dos moléculas con peso molecular superior a los 12 kDa. Igualmente, el extracto crudo obtenido de la pulpa de xoconostle (M4PULPA) mostró una elevada actividad hemaglutinante. Los datos obtenidos hasta este momento no permiten asegurar si la actividad hemaglutinante observada en M4PULPA corresponde a alguna de las moléculas presentes en las fracciones M4P₅₀ o M4S₅₀, o si es diferente de ellas. En cualquier caso el hallazgo de una actividad hemaglutinante en la pulpa del xoconostle podría

tener importantes implicaciones para la fisiología del sistema digestivo, toda vez que la pulpa es la parte comestible del fruto.

Algunos casos de aglutinación celular inespecífica pueden ser el resultado de la presencia de fenoles en las muestras de ensayo. Aunque la diálisis de los extractos estudiados excluyó esta posibilidad, para descartarla totalmente se obtuvo el extracto de xoconostle en presencia de polivinil pirrolidona (PVP), un compuesto que atrapa fenoles. Puesto que las semillas de muchos frutos presentan proteasas, el extracto incluyó también el inhibidor de proteasas fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF). Durante el fraccionamiento con sulfato de amonio de los extractos tratados con PVP y PMSF se formó una goma en vez de precipitado, debido a la presencia de los complejos que se formaron entre los fenoles presentes y la PVP. Debido a la formación de la goma, el patrón electroforético de éstas fracciones no se obtuvo. Los ensayos de hemaglutinación realizados con estos extractos mostraron una fuerte actividad específica, tanto en el extracto crudo (M4EC) como en las fracciones obtenidas por precipitación con sulfato de amonio, M4P₅₀ y M4S₅₀, como se muestra en la tabla 11. Estos resultados descartaron totalmente la posibilidad de que las actividades hemaglutinantes presentes en la semilla de xoconostle fueran el resultado de compuesto fenólicos y fortalecieron la hipótesis de que tales actividades se deben a proteínas.

Tabla 10. Actividades Hemaglutinantes en Xoconostle.

FRACCIÓN	AE (U/mg)
M4EC	780.00
M4P ₅₀	1280.00
M4S ₅₀	2560.00
M4 _{PULPA}	5120.00

Las fracciones de xoconostle se obtuvieron por precipitación, saturando al 50% el extracto crudo (M4EC) con sulfato de amonio. El precipitado obtenido (M4P₅₀) se resuspendió en el mínimo volumen de agua tridestilada y se dializó al igual que el sobrenadante (M4S₅₀). El extracto de la pulpa (M4_{PULPA}) se precipitó, saturándolo con 90% de sulfato de amonio. El ensayo de hemaglutinación se realizó con las muestras dializadas, como se indica en Materiales y Métodos.

Tabla 11. Actividad Hemaglutinante en el Extracto de Xoconostle y sus Fracciones Obtenidos en presencia de PVP.

FRACCIONES	AE (U/mg)
M4EC	4654.54
M4P ₅₀	5120.00
M4S ₅₀	5120.00

Los ensayos de hemaglutinación se realizaron con el extracto crudo de xoconostle (M4EC), obtenido en presencia de PVP y PMSF, y sus correspondientes fracciones M4P₅₀ y M4S₅₀ dializadas y liofilizadas.

TERMOESTABILIDAD.

Otra de las pruebas para determinar la naturaleza proteica de una molécula es su desnaturalización por calor. Un aumento de temperatura puede debilitar la fuerza entre las interacciones dipolares, como puentes de hidrógeno, y pueden favorecer la formación de interacciones hidrofóbicas. El resultado de un calentamiento es la descomposición de la estructura cuaternaria de la proteína, lo que a su vez ocasiona, la mayoría de las veces, la pérdida de la actividad biológica de la molécula. No obstante, después de someter las fracciones del extracto de xoconostle a la temperatura de 90°C, se observó que la actividad hemaglutinante de ambas fracciones se conservó con la misma actividad hemaglutinante que las fracciones mantenidas a 4°C. Existen trabajos en los que se han reportado actividades aglutinantes estables a temperaturas mayores a los 50°C (Peumans y Van Damme, 1996). Algunas glucoproteínas de plantas, particularmente lectinas, son muy resistentes a la desnaturalización por calor (Rhodes, 1998). Uno de los procesos reportado como de los más eficaces para la inactivación de algunas hemaglutininas termoestables, es el tostado a temperaturas de 140°C de las fuentes de las hemaglutininas, como lo son las semillas (Ramamani y cols., 1996). Por lo que en posteriores estudios se probará la inactivación de la hemaglutinina por este proceso.

8. CONCLUSIONES

El presente trabajo analizó la presencia de actividades hemaglutinantes tipo lectina en semillas de pepino, huamiche, tomate y xoconostle, y permitió llegar a las siguientes conclusiones.

Durante el escrutinio se determinó la presencia de actividades hemaglutinantes en las semillas de pepino, huamiche, tomate y xoconostle. En el caso de las semillas de tomate y xoconostle las actividades observadas fueron muy intensas y por ello se decidió purificar en forma parcial la actividad observada en xoconostle. En tanto se realizaban los experimentos para la caracterización parcial del xoconostle, se obtuvieron evidencias que indicaban que la actividad observada se debía a moléculas de tipo proteico, que probablemente pertenecían a la familia de las lectinas. Otro tipo de moléculas que frecuentemente se encuentran en semillas de diversos frutos, y que también pueden aglutinar células, son los fenoles. Los fenoles de las plantas son de bajo peso molecular, por lo que se eliminan fácilmente por diálisis. La actividad no se perdió después de dializar el extracto crudo y sus fracciones, por tanto, podemos decir que la actividad observada no se debe a fenoles.

Para corroborar la naturaleza proteica de las moléculas responsables de la actividad hemaglutinante, se realizaron ensayos de digestión enzimática, pero la actividad se conservó después del tratamiento con tripsina. En la literatura existen reportes acerca de la presencia de inhibidores de proteasas en semillas, que evitan el ataque de enzimas digestivas de los animales que consumen las semillas. Las fracciones del xoconostle contienen inhibidores de tripsina, que impidieron la digestión de la molécula responsable de la actividad hemaglutinante. La evidencia obtenida de las actividades hemaglutinantes en xoconostle, indicó en gran medida que las moléculas responsables son lectinas, pero la prueba contundente la dará la obtención de la molécula pura.

Hasta el momento no se han reportado estudios que indaguen sobre la presencia de actividades tipo lectina en éstos frutos, por lo que el presente trabajo podría ser

moléculas pueden ejercer sobre el organismo. Futuros trabajos abordaran la purificación y caracterización biológica de éstas actividades.

Bettler, B., Texido, G., Raggini, S., Rüegg, D., Hoffstetter, H. 1992: Inmunoglobulin E-binding site in Fc ϵ receptor (Fc ϵ RII/CD23) identified by homolog-scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 267: 185-191.

Bradford, M.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.

Carraro, S., Hamamura, S., Tiscornia, O., Celener, D., Gravelle, F., Bustos, L. 1993: *Ulex Europeus* agglutinin I binding pattern during chemical carcinogenesis in the rat gastrointestinal tract. *Cancer.* 72: 669-676.

Chawla, D., Animashaun, T., Hughes, R.C., Harris, A., Aitken, A. 1993: *Bowringia mildbraedii* agglutinin: polypeptide composition, primary structure and homologies with other legume lectins. *Biochi. Biophys. Acta.* 1202: 38-46.

Colin, H.R. 1992: Lectins as cell adhesion molecules. *Curr. Opin. n Struct. Biol.* 2: 687-692.

Cooper, J.B., Adair, W.S., Mecham, R.P., Heuser, J.E., Goodenogh, U.W. 1983: *Chlamydomonas* agglutinin is a hydroxyproline-rich glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:5898-5901.

Cuatrecasas, P. 1973: Interaction of concanavalin A and wheat germ agglutinin with the insulin receptor of fat cells and liver. *J. Biol. Chem.* 248: 3528-3534.

Curtis, B.M., Sharnowske, S., Watson, A.J. 1992: Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 8356-8360.

Drickamer, K., Taylor, M.E. 1993: Biology of animal lectins. *Annu Rev. Cell. Biol.* 9: 237-264.

Duguid, J.P., Darekar, M.R., Wheater, D.W. 1976: Fimbriae and infectivity in *Salmonella typhimurium*. *J. Med. Microbiol.* 9: 459-473.

Englard, S. Seifter, S. 1990: Precipitation Techniques. In: Guide to protein purification. (Deutscher, M.P., ed.). Academic Press, San Diego, California, pp.285-305.

Fader, R.C., Davis, C.P. 1980: Effect of piliation on *Klebsiella pneumoniae* infection in rat bladders. *Infect. Immun.* 30: 554-561.

Garnaat, C.W., Meyer, T. 1996: Maize protein for insect control. Patente No. 5882668. Patentes de los Estados Unidos de Norteamerica.

Gillot, J., Genaud, L., Gueugnot, J., Damez, M. 1983: Purification and properties of two hemagglutinins of the mushroom *Laccaria amethystina*. *Biochemistry.* 22: 5365-5269.

Gillot, J., Giollant, M., Damez, M., Dusser, M., 1991: Isolation and characterization of a lectin from the mushroom, *Lactarius deliciosus*. 109: 840-845.

Hall, C., Karlsson, J.O. 1985: Identification of the principal receptor responsible for adsorptive endocytosis of a fucosa-specific lectin from *Aleuria aurantia* in the rabbit retina. *Neurosci. Lett.* 58: 79-82.

Hauptmann, R., Himmler, A., Maurer-Fogy, I., Stratowa, C. 1995: TNF receptors, TNF binding proteins and DNA's coding for them. Patente No. 5843791. Patentes de los Estados Unidos de Norteamerica.

Horejsí, V., Kocourek, J. 1978: Studies on Lectins: Properties of some lectins prepared by affinity chromatography on o-glycosyl polyacrylamide gels. *Biochim. Biophys. Acta.* 538: 299-315.

Iwahi, T., Abe, Y., Nakao, M., Imada, A., Tsuchiya, K. 1983: Role of type 1 fimbriae in the pathogenesis of ascending urinary tract infection induced by *Escherichia coli* in mice. *Infect. Immun.* 39: 1307-1315.

Jaffé, W.G. 1980: Hemagglutinins (Lectins). In: Toxic constituents of plant foodstuffs. 2da edición. (Liener, I.E., ed.). Acad. Press, New York. pp. 73-102.

Klein, O., Lin, S., Embon, O., Sazbon, A., Zidan, J., Kook, A.I. 1999: An approach for high sensitivity detection of prostate cancer by analysis of changes in structuredness of the cytoplasmic matrix of lymphocytes specifically induced by PSA-ACT. *J. Urol.* 161: 1994-1996.

Laine, R.A. 1996: Diagnosis of fungal infections, and a chitin-binding lectin useful in such diagnoses. Patente No. 5914239. Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica.

Larsson, E.L., Iscove N.N., Coutinho, A. 1980: Two distinct factors are required for induction of T-cell growth. *Nature.* 283: 664-666.

Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J. 1986: The Lectins. In: *Molecular Biology.* Academic Press. Orlando Florida.

Llovo, J., Lopez, A., Fabregas, J., Muñoz, A. 1993: Interaction of lectins with *Cryptosporidium parvum*. *J. Infect. Dis.* 167: 1477-1480.

Mai, A., Jung, S-K., Tachikawa, H., Fujimoto, D. 1996: A novel β -galactoside-binding lectin in cultured murine lymphocytic leukemia cells. *J. Biochem.* 120:478-480.

Mandal, C., Sharma, V., Chatterjee M. 1997: Method for diagnosing visceral leishmaniasis in a patient by identification of a new key marker namely 9-o-acetylated sialiglycoconjugate. Patente No. 5846943. Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica.

McPaul, M., Berg, P. 1986: Formation of functional asialoglycoprotein receptor after transfection with cDNAs encoding the receptor proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 8863-8867.

Mody, R., Shantaram, J., Chaney, W. 1995: Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. J. Pharmaceut. Toxicol. Methods. 33: 1-10.

Nicolson, G.L. 1982: Cancer metastasis, organ colonization and cell surface properties of malignant cells. Biochim. Biophys. Acta. 95: 113-176.

Nunomura, W. 1991: C-reactive Protein in Eel: purification and agglutinating activity. Biochim. Biophys. Acta. 1076: 191-196.

Nuyens, J.H., Nan Veen, H.H. 1995: Isolation of lactoferrin from milk. Patente No. 5849885. Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica.

Oda, Y., Herrmann, J., Gitt, M.A., Turck, C.W., Burlingame, A.L. 1993: Soluble lactose-binding lectin from rat intestine with two different carbohydrate-binding domains in the same peptide chain. J. Biol. Chem. 268: 5929-2939.

Ohlson, C., Karlsson, J.O. 1983: Glycoproteins of axonal transport: polypeptides interacting with the lectin from *Aleuria aurantia*. Brain Res. 264: 99-104

Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M. 1995: Lectins as plant defense proteins. Plant. Physiol. 109: 347-352.

Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M. 1996: Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. *Trends in Food Sci. Technol.* 7:132-138.

Ramamani, S., Chandrasekhara, H.N., Narasimha, K. 1996: Efficiency of inactivation of trypsin inhibitors and haemagglutinins by roasting of soybean

Raz, A., Lotan R. 1987: Endogenous galactoside-binding lectins: a new class of functional tumor cell surface molecules related to metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 6: 433-452.

Rhodes, J.M., Milton J.D. 1998: *Lectin Methods and Protocols*. Humana Press. Totowa, New Jersey.

Richards, M.L., Katz, D.H. 1990: The binding of IgE to murine Fc RII is calcium-dependent but not inhibited by carbohydrate. *J. Immunol.* 144: 2638-2646.

Robbins, P.W., Prakash, S. 1997: Detection of prostate and other cancers by assaying for cancer specific antigens having linked oligosaccharides which are at least triantennary. Patente No. 5902725. Patentes de los Estados Unidos de Norteamerica.

Ryder, S.D., Smith, J.A., Rhodes, J.M. 1992: Penaut Lectin: A mitogen for normal human colonic epithelium and human HT29 colorectal cancer cells. *J. National Cancer Institute.* 84: 1410-1416.

Schwartz, G.W., Takenaka, Y. 1955. A spectrophotometric determination of trypsin an chymotrypsin activity. *Biochem. Biophys. Acta.* 16: 571-575.

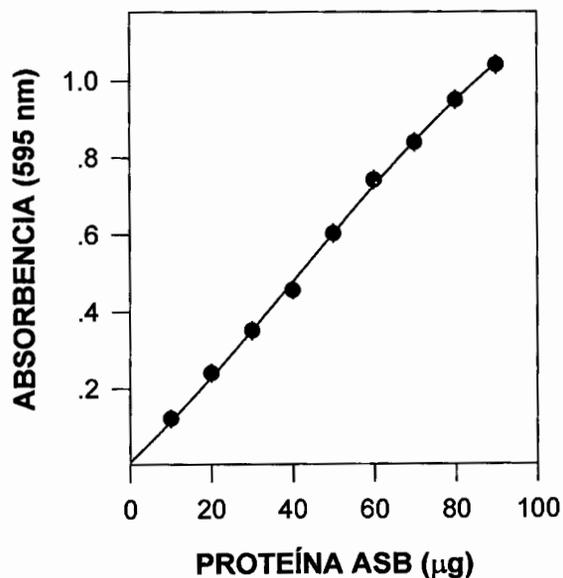
Seigel, G.M., Notter, M.F.D. 1992: Lectin-induced differentiation of transformed neuroretinal cells *in Vitro*. *Experimental Cell Research* 199: 240-247.

APENDICE A

Valores de la Curva Estándar de Determinación de Proteínas

PROTEÍNA ASB (μg) y	ABSORBENCIA $x \pm \sigma$
0	0 ± 0
10	0.121 ± 0.005
20	0.240 ± 0.010
30	0.351 ± 0.007
40	0.456 ± 0.006
50	0.602 ± 0.007
60	0.741 ± 0.010
70	0.839 ± 0.002
80	0.950 ± 0.008
90	1.041 ± 0.031

CURVA ESTANDAR DE DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS



$$R = 0.99852$$

$$b = 0.01059$$

$$m = 0.01154$$