

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS
DEL CENTRO DE LA REPUBLICA (PROPAC)

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL
DE AGLUTININAS PRESENTES EN SEMILLAS
DE XOCONOSTLE (*Opuntia joconostle*)**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el título de

Maestría en Ciencias

presenta

Q.F.B. ADRIANA JHENY RODRÍGUEZ MÉNDEZ

dirigida por

DR. JOHN R. WHITAKER

CENTRO UNIVERSITARIO
QUERÉTARO, QRO. MÉXICO 2002

BIBLIOTECA CENTRAL UAQ
"ROBERTO RUIZ OBREGON"



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Departamento de Investigación y
Posgrado en Alimentos

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE
AGLUTININAS PRESENTES EN SEMILLAS DE
XOCONOSTLE (*Opuntia joconostle*)**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el título de
Maestría en Ciencias

Presenta:

Q.F.B. ADRIANA JHENY RODRÍGUEZ MÉNDEZ

Dirigida por:

DR. JOHN R. WHITAKER

SINODALES

DR. JOHN R. WHITAKER
Presidente

DRA. Ma. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA
Secretario

DR. ALEJANDRO BLANCO LABRA
Vocal

DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ
Suplente

DRA. ELVIRA GONZALEZ DE MEJIA
Suplente

M. en C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE QUIMICA

DR. SERGIO QUESADA ALDANA
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y
POSGRADO

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
México

BIBLIOTECA CENTRAL UAQ
"ROBERTO RUIZ OBREGON"

No. Act. H66997
No. Ttulo:
Clas. 547.75
R696p



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Departamento de Investigación y
Posgrado en Alimentos

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE
AGLUTININAS PRESENTES EN SEMILLAS DE
XOCONOSTLE (*Opuntia joconostle*)**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el título de
Maestría en Ciencias

Presenta:

Q.F.B. ADRIANA JHENY RODRÍGUEZ MÉNDEZ

Dirigida por:

DR. JOHN R. WHITAKER

SINODALES

DR. JOHN R. WHITAKER

Presidente

DRA. Ma. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA

Secretario

DR. ALEJANDRO BLANCO LABRA

Vocal

DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ

Suplente

DRA. ELVIRA GONZALEZ DE MEJIA

Suplente

M. en C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE QUIMICA

DR. SERGIO QUESADA ALDANA
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y
POSGRADO

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
México

No. Adj. H 66997

No. Título

Clas. 547.75

B696p

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio del Dr. John R. Whitaker en la Universidad de California, Campus Davis, en el Laboratorio de Bioquímica Toxicológica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, de la Universidad Autónoma de Querétaro, y en el Laboratorio de Bioquímica de Proteínas del CINVESTAV Unidad Irapuato.

1. RESUMEN

Las lectinas son proteínas que unen residuos de carbohidratos en forma específica y se presentan en todos los seres vivos, aunque se han estudiado principalmente las de origen vegetal, ya que las semillas de las plantas son especialmente ricas en estas moléculas. Hasta la fecha se han purificado numerosas lectinas de origen vegetal, animal, fúngico y bacteriano, algunas con papeles importantes en la investigación científica. Debido a la propiedad que las lectinas exhiben de unir azúcares de manera selectiva, se han utilizado como elementos clave en la purificación de moléculas de interés y como herramientas en el diagnóstico de algunas enfermedades. Nuestro país cuenta con una enorme diversidad vegetal, riqueza que se refleja en la gran variedad de productos que integran nuestra dieta, como el fruto de xoconostle (*Opuntia joconostle* Weber & Diguét), elemento habitual en la dieta regional. En estudios previos se observó que sus semillas contienen hemaglutininas, pero aún no se conoce la naturaleza de tales moléculas ni los efectos que podrían tener sobre el organismo o sus posibles aplicaciones. Por ello, se realizó la purificación de la molécula responsable de la actividad. Las semillas del fruto se molieron y con la harina delipidizada se obtuvo el extracto empleando una solución amortiguadora de fosfatos. El extracto se fraccionó saturando al 65% con sulfato de amonio. El precipitado se sometió a cromatografía de exclusión de peso molecular (Sephadex G-100 y G-200) e intercambio iónico (Q-Sepharosa). La actividad aglutinante en el extracto crudo y cada una de las fracciones obtenidas se evaluó, luego de determinar su concentración de proteínas por el método de Bradford, utilizando eritrocitos de conejo en suspensión. Asimismo, se analizaron electroforéticamente los perfiles proteicos del extracto crudo y de las fracciones obtenidas, con la finalidad de monitorear cada etapa de la purificación. Como criterio de pureza se empleó electroforesis, en condiciones desnaturalizantes, y los geles fueron teñidos con plata.

Como parte de la caracterización se realizaron ensayos de estabilidad térmica, pH y de especificidad para unirse a distintos azúcares.

(Palabras clave: purificación de proteínas, lectina, *Opuntia joconostle*)

2. SUMMARY

Lectins are proteins that bind carbohydrate residues in a specific manner and are widely distributed in living organisms. Lectins have been purified from plants, because they are generally most abundant in the seeds. Until now many lectins have been purified from vegetables, animals, fungus and bacteria, some of them play many important research roles. Due to the carbohydrate specificity of lectins, they have been used as a key compounds to purify some important molecules. Recently, lectins have been used as tools to monitor some diseases. Our country possesses enormous vegetal diversity, and such richness is reflected by the national diet. Fruits such as "xoconostle" (*Opuntia joconostle* Weber & Diguét) 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 their possible applications. The crude extracts from seeds of these fruits were screened for the presence of hemagglutinating activities. The crude extract of "xoconostle" was analyzed and exhibited hemagglutinating activities, although we still do not know if this hemagglutinating activity is due to a lectin. To approach these subjects, the hemagglutinin was purified from crude extract by the combination of ammonium sulfate fractionation ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to 65% saturation), gel filtration (Sephadex G-100 and G-200), and ion-exchange chromatography (Q-Sephrose). Lectin activity of crude extract and fractions was determined by hemagglutination assay with a suspension of rabbit erythrocytes. Protein was quantitated by the method of Bradford with bovine serum albumin as standard. Criteria of purity was polyacrylamide gel electrophoresis stained by silver reagent. Protein nature of xoconostle agglutinin was analyzed by different parameters such as thermostability, pH stability and sugar inhibition tests.

(Key words: protein purification; lectins, *Opuntia joconostle*)

3. JUSTIFICACIÓN

Los usos de las lectinas son muy amplios, y actualmente se han empleado con éxito para purificar moléculas de interés para el hombre, por ejemplo, enzimas, receptores celulares, moléculas claves en la transmisión de señales, entre otras. Existen gran variedad de fuentes sin explorar, particularmente en México contamos con una gran biodiversidad, de las más ricas del planeta. La relevancia de la realización del presente trabajo es la descripción de lectinas con características diferentes a las que hasta ahora se han encontrado.

En estudios previos, se observó que extractos semipuros de semillas de xoconostle, contenían actividad hemaglutinante, pero aún se desconoce la naturaleza de las moléculas responsables. La purificación de la molécula permitirá estudios posteriores que contemplen los efectos biológicos y eventuales aplicaciones en el campo de la academia e investigación.

DEDICATORIAS

A DIOS, por permitirme estar donde estoy, ser quién soy, guiar mi camino, mi fe y rodearme de personas maravillosas

A mi Madre, por ser mi amiga y consejera en todo momento, quién me impulsa a continuar sin desfallecer, por todo su amor y dedicación

A mi Padre, por su ejemplo, su confianza, cariño y apoyo incondicional

A mis Hermanos, Hugo e Iván, por estar ahí en momentos difíciles y ayudarme a salir adelante con alegría

Con mucho cariño y admiración, a mi tía Chepinita, por mantenerme cerca de su corazón siempre, por el apoyo que siempre tengo en ella

Con admiración y cariño, a mi tío Alfredo y a mi tío Rodrigo, por haberme alentado en momentos difíciles

A mis amigos, que estuvieron conmigo en el camino sin defraudarme

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. John R. Whitaker, a la Dra. Guadalupe Flavia Loarca Piña, al Dr. Alejandro Blanco Labra, a la Dra. Maricela Luna Muñoz y de manera especial a la Dra. Elvira González de Mejía, por el tiempo que dedicaron a leer y corregir este trabajo, así como por su asistencia a la presentación del trabajo.

Al Dr. N.F. Haard, de la Universidad de California, Davis, por permitirme emplear su equipo durante el desarrollo de este trabajo

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que estuvieron junto a mí durante todo este tiempo, por brindarme una palabra de aliento y permitirme aprender a valorar lo que realmente vale: la amistad y la honestidad

Los amigos son los hermanos que no nos dieron nuestros padres, sino Dios!

Al Dr. John R. Whitaker, por depositar en mí toda su confianza, por todo su apoyo y la oportunidad de trabajar a su lado y aprender muchísimo del universo de la purificación de proteínas

Al Dr. Luis Antonio Salazar Olivo y al Dr. Alejandro Blanco Labra, por ser maravillosos profesores y excelentes amigos, por permitirme disfrutar de todo su conocimiento

A la Dra. Elvira González de Mejía, la Dra. Guadalupe Flavia Loarca Piña, a la Dra. Maricela Luna Muñoz por todo su apoyo y confianza

A la C. Dr. Tere García Gasca, por su confianza, amistad y apoyo en las situaciones más difíciles

Al C. Dr. Miguel Angel Duarte Vázquez, por ayudarme a crecer en el mundo de las proteínas, por su apoyo y su amistad

A mis amigos de la maestría: Mariela Camacho, Lidia Mallorga, Abraham Méndez, Tere García, Vane Paz, Azucena González, Betty Salcedo, Erika Cordova, Gerardo Lopez, José Antonio Aguilar, Zoraida y Félix, por ser amigos en todo momento, por su sinceridad, cariño y apoyo, son los mejores chavos.

A mis amigos de siempre: Yola Cabrera, Lalo Elizalde y Pablo García, por ser los incondicionales, por reír tanto y hacerme ver la vida de otra manera, son super!

A mis amigos de UCD: José Luis Cardenas por ayudarme en todo y ser un super amigo, Ana Lucia Cordova, Aracely Anaya, Miguel Rea, Enric Gisbert, Menjuai Ampunzang (Aun), Lupe Latapí, Sukanya, por ser tan buena onda y alivianarme en la depre

A mis amigos del CINVESTAV Irapuato, César Aguirre, Bety, Alicia, muchas gracias por todo lo que han hecho por mí

También deseo agradecer de todo corazón a quienes fueron mis compañeros y amigos del laboratorio de Bioquímica Toxicológica: Xochitl, Victor, Lili, Lulu, Ana Lizbeth, Anaberta, muchas gracias por todo!

De manera muy especial a Laurita, Carmelita, Marigel, Silvia y Virginia Ojeda, quienes me ayudaron a realizar todos mis trámites para culminar mi posgrado. A José y Don Vic, por que sin ellos no tendríamos un lugar de trabajo agradable

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
1. RESUMEN	i
2. SUMMARY	ii
3. JUSTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIAS	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
4. INTRODUCCIÓN	1
5. ANTECEDENTES	4
5.1 Historia de las Lectinas	4
5.1.1 Descubrimiento de las Lectinas	4
5.1.2 Definición de Lectina	5
5.1.3 Clasificación de las Lectinas	5
5.2 Fuentes de Lectinas	6
5.2.1 Lectinas de origen vegetal	6
5.2.2 Lectinas de origen animal	10
5.2.3 Lectinas de origen bacteriano	13
5.2.4 Lectinas de origen fúngico	15
5.2.5 Lectinas de origen viral	16

5.3 Función de las Lectinas	16
5.3.1 Función en vegetales	16
5.3.2 Función en animales	18
5.3.3 Función en bacterias y virus	19
5.4 Actividades Biológicas	20
5.5 Purificación de las Lectinas	21
5.6 Importancia de las Lectinas	23
5.7 Las Lectinas en la Dieta Mexicana	27
6. OBJETIVOS	29
6.1 Objetivos Generales	29
6.2 Objetivos Particulares	29
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
8. MATERIALES Y MÉTODOS	31
8.1 Materiales	31
8.2 Métodos	31
8.2.1 Análisis Químico	31
8.2.2 Detección de Aglutininas	32
8.2.3 Purificación de Extracto Crudo	33
8.2.4 Caracterización Parcial	35
8.2.6 Análisis Estadístico	35

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
9.1 Prepurificación	36
9.1.1 Fraccionamiento con Sulfato de Amonio	42
9.2 Purificación	48
9.2.1 Cromatografía de Exclusión de Peso Molecular	48
9.2.2 Cromatografía de Intercambio Iónico	59
9.3 Caracterización Parcial	64
9.3.1 Termoestabilidad	64
9.3.2 Afinidad a Azúcares	64
10. CONCLUSIONES	66
11. PERSPECTIVAS	67
12. BIBLIOGRAFIA	68
APENDICE A	77

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
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	Aplicaciones de las Lectinas	24
7	Lectinas para la tipificación de grupos Sanguíneos humanos	26
8	Escrutinio de Actividades Hemaglutinantes en Extractos Crudos de Xoconostle Obtenidos con Distintas Soluciones de Extracción	38
9	Diferencias en Actividades Hemaglutinantes Provenientes de Tres Distintos Lotes de Xoconostle	39
10	Actividades Hemaglutinantes en las Distintas Fracciones Obtenidas Mediante Precipitación del Extracto Crudo de Xoconostle	43

TABLA		PÁGINA
11	Tabla de Purificación de la Proteína (Lectina) De Xoconostle Mediante Cromatografía de Exclusión de Peso Molecular	58
12	Tabla de Purificación de la Proteína (Lectina) De Xoconostle Mediante Cromatografía de Intercambio Iónico	63

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Análisis Electroforético de las Proteínas contenidas en los Extractos Crudos de Xoconostle Provenientes de Distintos Comercios	41
2	Curva de Precipitación de las Proteínas contenidas en el Xoconostle	45
2A	Análisis Electroforético de las Fracciones Proteicas obtenidas del Xoconostle Mediante Precipitación con Sulfato de Amonio	46
2B	Análisis Electroforético de las Fracciones Proteicas obtenidas del Xoconostle	7
3	Purificación de la Hemaglutinina de Semillas de Xoconostle mediante Cromatografía de Exclusión de Peso Molecular (Sephadex G-100)	49
3A	Análisis Electroforético de las Proteínas contenidas en el Xoconostle y sus Fracciones	50

FIGURA		PÁGINA
4	Purificación de la Hemaglutinina de Semillas de Xoconostle mediante Cromatografía de Exclusión de Peso Molecular (Sephadex G-200)	52
4A	Análisis Electroforético de las Purificación de las Hemaglutininas del Xoconostle Obtenidas de G-200	53
5	Purificación de la Hemaglutinina de Semillas de Xoconostle mediante Cromatografía de Exclusión de Peso Molecular (Sephadex G-100)	55
5A	Análisis Electroforético de la Recromatografía en G-100, de la fracción F2 de G-200	56
6	Cromatografía de Intercambio Iónico	60
6A	Análisis Electroforético de la Fracción Obtenida mediante Intercambio Aniónico	61

4. INTRODUCCIÓN

A fines del siglo pasado Hermann Stillmark, de la Universidad de Dorpat en Estonia (ahora Tartu, Estonia) estudiaba algunas sustancias presentes en plantas como parte de su trabajo doctoral. Obtuvo una preparación proteica parcialmente pura de *Ricinus communis*, con capacidad de aglutinar eritrocitos y otras células en suspensión. Con estos experimentos y los de otros investigadores contemporáneos de Stillmark se inició el estudio de las lectinas (Stillmark, 1888).

Desde la introducción del término "lectina" (del latín *legere*, elegir) por Boyd y Shapleigh en 1954, se describieron una clase de 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, 1989b).

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 reservorio de nitrógeno, entre otras (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 (Beachey, 1981; 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 al interactuar 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).

Las lectinas se pueden purificar de extractos de plantas mediante técnicas convencionales de purificación de proteínas. Algunas lectinas que se han caracterizado presentan propiedades como: solubilidad en agua, insolubilidad en alcohol, no dializables, termolábiles y pueden salir de solución cuando se satura el extracto con sales. Tales propiedades permiten que las lectinas se purifiquen mediante esquemas relativamente sencillos: extracción con soluciones amortiguadoras acuosas, precipitación con sulfato de amonio y técnicas cromatográficas como intercambio iónico, exclusión de peso molecular,

cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y especialmente cromatografía de afinidad, por citar algunas.

Entre las plantas más notables que caracterizan las zonas áridas de México, se distingue la familia *Cactaceae*. Nuestro país, por sus peculiares condiciones de latitud, topografía y climas, posiblemente alberga la mayor cantidad de especies. Entre ellas *Opuntia joconostle*, conocida comúnmente como xoconostle, fruto que se consume habitualmente en la región del bajío. La actividad aglutinante observada en extractos semipuros de semillas de xoconostle no ha sido caracterizada. Por tal motivo en el presente trabajo, se purificó y caracterizó parcialmente la naturaleza de las aglutininas presentes en semillas de xoconostle. La presente investigación provee de material para que en trabajos posteriores se estudien los posibles usos de las lectinas obtenidas del xoconostle en otros campos de investigación y sus eventuales aplicaciones clínicas o industriales.

5. ANTECEDENTES

5.1 HISTORIA DE LAS LECTINAS

Durante mucho tiempo se había conocido y utilizado una preparación de ricino, obtenida de *Ricinus communis* (higuerilla), gracias a su efecto de purgante. En las semillas de la higuerilla existía un componente tóxico, pero nadie lo había estudiado, si no hasta a mediados del siglo XIX, cuando se obtuvieron extractos acuosos que contenían en gran proporción el componente tóxico. Fueron varios los investigadores que dejaron abierta la pregunta acerca de cuál sería la razón de la toxicidad de dicha preparación. Emil Werner en 1870 descubrió que la toxicidad presente en la preparación de higuerilla se perdía mediante calentamiento, pero su explicación no fue satisfactoria.

5.1.1 Descubrimiento de las Lectinas

El objetivo del trabajo doctoral de Stillmark fue obtener la explicación sobre el principio tóxico en las semillas de higuerilla, que hasta entonces había permanecido sin elucidar. La primera parte de su trabajo fue la purificación, en la que básicamente empleo técnicas de extracción acuosa y precipitación con ácido acético y sulfato de sodio y magnesio. Una vez que obtuvo la preparación semipura, que él llamó ricino, realizó los experimentos farmacológicos. Al hacer algunas pruebas con sangre, observó que al agregar el ricino, los eritrocitos se unían unos con otros formando un "coágulo" (Stillmark, 1888). Stillmark supuso que la presencia del ricino en la sangre provocaba un efecto semejante al que causaba la fibrina, y que tal actividad se debía a la actividad enzimática del ricino (Rüdiger, 1988). Durante el desarrollo de su trabajo, Stillmark también observó la aglutinación de células epiteliales, hepatocitos y leucocitos.

Posteriormente se desarrollaron otras pruebas con extractos de distintas semillas que confirmaron las observaciones de Stillmark. Con estos experimentos se inició la búsqueda de los papeles que las lectinas tienen en diferentes campos de la investigación (Sharon y Lis, 1972; Liener y cols., 1986).

5.1.2 Definición de Lectina

Las lectinas se han clasificado como glucoproteínas diferentes de las inmunoglobulinas y de origen no inmunogénico. El término lectina, define a un grupo de proteínas que se unen específicamente a carbohidratos, o residuos de carbohidratos que se encuentran formando parte de macromoléculas. Toda vez que la mayoría de las moléculas de la superficie celular son glucosiladas (glucolípidos y glucoproteínas), la capacidad de las lectinas de unirse a azúcares explica su capacidad para aglutinar células (Liener y cols., 1986; Sharon y Lis, 1989b). Las lectinas existen en todos los sistemas vivos, pero se estudiaron primero las contenidas en plantas debido a la abundancia en la que se encuentran en sus semillas.

5.1.3 Clasificación de las Lectinas

Existen varias formas de clasificar a las lectinas, pero en forma general se clasifican de acuerdo a los dominios que las componen, en: **merolectinas**, **hololectinas** y **quimerolectinas** (Peumans y Van Damme, 1995; 1996). Las **merolectinas** son proteínas que contienen únicamente un dominio de unión a carbohidratos, son polipéptidos pequeños incapaces de aglutinar células por su naturaleza monovalente. Las **hololectinas** exhiben al menos dos dominios para unir carbohidratos, comprenden la mayoría de las lectinas presentes en las plantas y pueden detectarse fácilmente mediante ensayos de aglutinación. Las **quimerolectinas**; en cambio, son una fusión de proteínas compuestas de uno o más dominios de unión a carbohidratos y un epítipo en otro sitio de la molécula con actividad catalítica bien definida. Dependiendo de la cantidad de sitios de unión a azúcares, las quimerolectinas pueden actuar como merolectinas o como hololectinas (Peumans y Van Damme, 1995; 1996).

Se han descrito las secuencias de aminoácidos de miles de lectinas, su estructura tridimensional, casi todas junto con su ligando (azúcar al cual se une) pero, las secuencias y estructuras nuevas van en ascenso. Con ello es posible reemplazar la clasificación tradicional que se hace de acuerdo al origen de las lectinas, por una clasificación con base en las características de su perfil estructural. La mayoría de

las lectinas entran en las siguientes tres categorías: **simples**, **mosaico** (o multidominio), y en **macromoleculares**, aunque también existen casos intermedios (Lis y Sharon, 1998).

Las **lectinas simples** consisten en pocas subunidades, que pueden no ser idénticas, con un peso molecular de menos de 40 kDa y pueden tener un dominio adicional cercano al sitio de unión para carbohidratos. Esta clase incluye, prácticamente, a todas las lectinas de plantas conocidas, así como a las galectinas de mamíferos (lectinas tipo S) (Lis y Sharon, 1998).

Las **lectinas multidominio o mosaico**, incluyen proteínas de diversas fuentes. Este grupo consiste en moléculas con un intervalo amplio de pesos moleculares, con distintos tipos de dominios en los que solo uno es de unión a carbohidratos. Dentro de las lectinas multidominio se encuentra la hemaglutinina del virus de la influenza (Lis y Sharon, 1998).

En el caso de las **lectinas macromoleculares**, se trata de filamentos proteicos formados por polímeros de la subunidad principal, como lo son los organelos heteropoliméricos de algunos microorganismos. Se encuentran comúnmente en la superficie de las bacterias en forma de fimbrias o pili, con un diámetro de 3-7 nm y 100 a 200 nm de longitud (Lis y Sharon, 1998).

5.2 FUENTES DE LECTINAS

Las lectinas se encuentran distribuidas en la mayoría de los seres vivos, si no es que en todos, vegetales, animales, hongos, bacterias y virus.

5.2.1 Lectinas de origen vegetal

En las plantas, los órganos más ricos en lectinas son las semillas, por esta razón la mayoría de las lectinas que actualmente conocemos provienen de esta fuente. Las plantas superiores no solo tienen lectinas en sus semillas, también están presentes en sus tubérculos y su savia, aunque en menor proporción. Así mismo se han encontrado concentraciones muy bajas de lectinas en hojas, tallos y cortezas (Jaffé, 1980).

En estudios realizados con semillas inmaduras, se observó que las lectinas pueden estar parcialmente o completamente unidas a inhibidores, lo que impide que las lectinas aglutinen células. Durante la maduración de algunos frutos, los títulos de aglutininas tienden a elevarse rápidamente, lo que puede atribuirse a la liberación de las lectinas de sus inhibidores (Jaffé, 1980).

En el reino vegetal, Peumans y Van Damme (1996) han clasificado lectinas de las plantas en cuatro subgrupos de acuerdo a su estructura, función y tipo de planta de la cual provienen.

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 caracterizaron mediante técnicas químicas o técnicas de biología molecular. Estos estudios revelaron que hasta el 20% de sus secuencias aminoacídicas son altamente conservadas, 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 su estructura 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 muestran 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 enlistan algunas de las lectinas de origen vegetal que se han caracterizado.

Tabla 1. 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>Glycine max</i>	Letal	Baja	120	α_4	-	ABO	D-GalNAc
<i>Triticum vulgare</i>	Moderada	Elevada	43	α_2	-	ABO	D-GalNAc
<i>Phaseolus lunatus</i>	Elevada	Moderada	124	α, α', β	?	A	D-GalNAc $\alpha_3[1\text{Fuc}\alpha_2]$ Gal
<i>Phaseolus vulgaris</i> Leucoaglutinina	Elevada	Moderada	115	α_4	+	ABO	D-Man D-GlcN
<i>Canavalia enisformis</i>	Letal		106	α_4	+	ABO	α -D-Man
<i>Vicia faba</i>	Escasa	Inestable	52	$\alpha_2\beta_2$?	ABO	D-Man D-Glc
<i>Lens culinaris</i>	Escasa	Inestable	46	$\alpha_2\beta_2$	+	ABO	α -D-Man D-Glc

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

¹ Toxicidad; Escasa = No hay síntomas de intoxicación; Moderada = Intoxicación ligera; Elevada = Efectos irreversibles de intoxicación; Letal = Muerte

² 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

³ Actividad mitogénica en linfocitos humanos.

⁴ Sacáridos inhibidores: D-glucosa (D-Glc); D-glucosamina (D-GlcN); D-manosa (D-Man); N-acetil-D-galactosamina (D-GalNAc); fucosa (Fuc).

5.2.2 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 asialoglucoproteína 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 1970'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). Aproximadamente 100 lectinas de origen animal han sido analizadas 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, 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 están formados por 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 que pueden separar las lectinas de las glucoconjugaciones que las unen a los

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, algunos ejemplos de 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

*(Lierier y cols., 1986)

Algunas lectinas tipo S tienen papeles muy importantes relacionados con la matriz celular, debido a la gran afinidad que tienen 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 asialoglucoproteína 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 tienen un dominio de unión a carbohidratos, unen IgE en presencia de Ca^{2+} , aunque la desglucosilación de la IgE no afecta la unión al receptor (Bettler y cols., 1989, 1992).

El receptor placentario de manosa es un receptor tipo II, 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	LOCALIZACIÓN	LIGANDOS	ORGANIZACIÓN	FUNCIÓN
Receptor asialoglucoproteína	Membrana Plasmática ¹	Endógenos	Transmembranal Tipo II	Receptor endocítico
Receptor a Fc IgE 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

5.2.3 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, actividad que frecuentemente se inhibe con la presencia de azúcares simples (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 bacterias presentan moléculas tipo lectina con diversas especificidades. Así, *Vibrio cholerae* presenta moléculas tipo lectina específicas para L-fucosa, en tanto que en *Myxococcus xanthus* éstas moléculas tienen especificidad para ciertos derivados de galactosa. Una faceta inusual de las lectinas se presenta cuando conforman 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 *Chlamydomonas*. 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 liberada 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 experimentalmente, que las lectinas son un factor clave en la habilidad de las bacterias para causar infecciones, ya que se fijan en las superficies de los órganos blanco por medio de éstas (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 numeran algunos 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)

5.2.4 Lectinas de origen fúngico

Algunos de los estudios realizados en hongos han demostrado la presencia de lectinas en estos organismos. La obtención de estas moléculas lleva a cabo de manera convencional, a partir de extractos en soluciones amortiguadas con sales. La mayoría de las lectinas de hongos se han purificado por cromatografía de afinidad con estromas de eritrocitos del grupo O pegados a una matriz de acrilamida.

La lectina encontrada en *Flammulina velutipes* 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. velutipes* 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 (aglutinación de eritrocitos con el antígeno H) como *Xylaria polymorpha* y *Clathrus cancellatus* (Guillot y cols., 1983). Uno de los hongos más estudiados es *Agaricus bisporus*, cuyas lectinas ejercen efectos inhibitorios sobre la proliferación de células de cáncer de colon humano, y aparentemente no tienen efecto citotóxico sobre células normales. Esto representa una ventaja, ya que en un paciente sometido a tratamiento con lectinas de *A. bisporus*, no correrá riesgos en las células normales 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

5.2.5 Lectinas de origen viral

Los virus contienen proteínas de superficie o glucoproteínas, las cuales permiten que se adhieran a las células huésped. Estas proteínas unen diversos azúcares, principalmente el ácido N-acetilneuramínico, actúan como hemaglutininas y pueden considerarse lectinas. Hasta el momento, las lectinas virales que están mejor caracterizadas son las del virus de la influenza y las del virus Sendai (Sharon y Lis, 1989b).

5.3 FUNCIÓN DE LAS LECTINAS

La presencia de las lectinas en la naturaleza, su habilidad para discriminar entre sacáridos en solución y superficies celulares, proveen del mayor estímulo para continuar investigando acerca de sus funciones fisiológicas (Sharon y Lis, 1989b). El hecho de que las lectinas tengan gran importancia en la naturaleza, es que se han conservado a través de la evolución como una familia homóloga de proteínas. Su aparición es regulada y coincide con distintos cambios fisiológicos en la vida de un organismo. Las principales funciones de las lectinas parecen ser el reconocimiento celular. La base de este reconocimiento es el ajuste molecular entre pares de estructuras complementarias de las superficies celulares. Un ejemplo de esta interacción es cuando se tiene una molécula en solución y una superficie celular, en una de ellas se contiene una información biológica codificada y en la otra se tiene la capacidad para descifrar el código. Este ejemplo representa una extensión del concepto de "llave y cerradura" que propuso Emil Fisher para explicar la especificidad de las interacciones entre enzimas y substratos (Lis y Sharon, 1998).

5.3.1 Función en vegetales

Aunque las lectinas provenientes de plantas se han conocido durante los últimos 100 años, a penas se empieza a comprender su función en el ciclo biológico vegetal. Las lectinas de leguminosas son las más conservadas, lo que implica que juegan un papel importante en la vida de la planta (Pusztai, 1991).

Argumentos moleculares, bioquímicos, celulares, fisiológicos y evolutivos indican que las lectinas pueden actuar como sistema de defensa, transportadores de carbohidratos, sistema de reconocimiento, proteínas de almacenamiento o reguladores del crecimiento (Etzler, 1986).

Su localización en combinación con su habilidad para distinguir entre diferentes células que contienen distintos carbohidratos de membrana, es una evidencia de la función defensora contra fitopatógenos de las lectinas en las plantas. Los anticuerpos y las lectinas tienen similitudes en su efecto biológico, lo que ha sugerido que las lectinas son el equivalente vegetal al sistema de anticuerpos de los animales. No hay evidencia de la existencia de un sistema inmune en las plantas, particularmente si se compara en complejidad y adaptación con el sistema inmune animal (Pusztai, 1991). Sin embargo, las lectinas pueden llegar a impedir algunas infecciones causadas por virus y bacterias, o evitar ataques de animales superiores. En gran variedad de plantas, las lectinas evitan que los herbívoros e insectos las ingieran mediante su acumulación en órganos vitales, que al ser ingeridos por los predadores, se unen a glucoreceptores del tracto intestinal y les provocan 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).

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). La fijación de nitrógeno atmosférico es de gran importancia para la agricultura que se ha explotado por el hombre durante mucho tiempo. Sin embargo no se conocen aún los detalles de la interacción simbiótica entre las raíces de las plantas y los microorganismos. El interés de comprender esta relación es muy clara, ya que han aumentado el número de publicaciones sobre este tema en las últimas décadas. La evidencia experimental que se tiene hasta el momento, involucra a las lectinas vegetales en el reconocimiento y unión específica entre las bacterias nodulares y la planta huésped (Pusztai, 1991).

5.3.2 Función en animales

Para las lectinas animales también se han descrito una gran variedad de funciones. Algunas como el control del tráfico de glucoproteínas en el cuerpo están muy bien documentadas, otras como la relación en la formación de órganos o con la metástasis requieren de estudios que den una evidencia más contundente (Sharon y Lis, 1989b).

Las lectinas animales funcionan como receptores, ubicados en la membrana plasmática de las células. Un ejemplo clásico es la unión de asialoglucoproteína por una lectina específica de hepatocitos de mamíferos, que actúa como receptor e interviene en la endocitosis de glucoproteínas séricas (Lienert y cols., 1986; Drickamer y Taylor, 1993). Otro ejemplo es la pinocitosis que llevan a cabo los macrófagos cuando las glucoproteínas contienen residuos de N-acetilglucosamina. La especificidad de la unión se debe a una lectina de superficie específica a manosa y a N-acetilglucosamina. Esta lectina es probablemente la responsable de que los macrófagos unan y fagociten algunas levaduras (Sharon y Lis, 1989b).

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). Las lectinas también regulan la migración de linfocitos en el cuerpo. Estas células en condiciones normales viajan de torrente sanguíneo a los órganos linfoides, este proceso se lleva a cabo por interacciones entre azúcares y lectinas (Rosen and Stoolman, 1987).

Se cree que las lectinas presentes en distintas células de tumores metastásicos, de humanos y roedores, favorecen la malignidad del tumor (Raz y Lotan, 1987; Gabius, 1987). En estos casos las lectinas promueven la formación agregados celulares en la circulación y también favorecen su adhesión al tejido endotelial de los capilares sanguíneos. Algunos experimentos han demostrado una buena correlación entre la cantidad de lectina producida en células de melanoma y la formación de metástasis pulmonar (Raz y Lotan, 1987). Por lo que se ha considerado utilizar lectinas para el diagnóstico y terapias del cáncer, aunque se requiere hacer más investigación sobre el tema.

5.3.3 Función en bacterias y virus

La adhesión de bacterias y virus a células epiteliales del tracto respiratorio, gástrico y de la mucosa genital, se considera el primer paso en un proceso infeccioso. La adhesión permite al microorganismo 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 permiten 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.

Se han aislado las aglutininas 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).

5.4 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

Todas las células tienen una cubierta de glúcidos, la cual consiste de cadenas de carbohidratos, glucoproteínas y glucolípidos, en células eucariotas, o de polisacáridos en las células procariotas. Los carbohidratos sirven como sitios potenciales de unión para las lectinas. Esta unión puede inducir diversos cambios en las células, que son la expresión de la actividad biológica de las lectinas. La investigación de las actividades biológicas de las lectinas es importante por varias razones. Las lectinas son detectadas gracias a la expresión de la aglutinación celular. Lo que nos provee de los medios para investigar distintos procesos celulares y subcelulares, en particular aquellos que se inician en la superficie celular. Por último, las actividades biológicas de las lectinas que se investigan en el laboratorio dan idea de su probable función en la naturaleza (Sharon y Lis, 1989b).

La **aglutinación celular**, como ya se mencionó, es la manifestación que más fácilmente se detecta de la interacción de las lectinas que tienen al menos dos sitios de unión a carbohidratos, con las células. Gran cantidad de proteínas tienen la capacidad de unir azúcares, pero solo se consideraban lectinas aquellas que

aglutinan células. Desde hace mucho tiempo se han usado los ensayos de aglutinación para revelar la presencia de lectinas en materiales biológicos (Sharon y Lis, 1989b; Pusztai, 1991).

Sin duda alguna, uno de los efectos biológicos más impresionantes de las lectinas es la **estimulación mitogénica de linfocitos**. Al incubar linfocitos en presencia de 1 a 5 $\mu\text{g/mL}$ de algunas lectinas, se induce su división, fenómeno conocido como estimulación mitogénica (Sharon y Lis, 1989b; Pusztai, 1991). La primera lectina en la que se observó la actividad mitogénica fue la Fitohemaglutinina, PHA (Nówell, 1960).

Las lectinas también intervienen en la muerte de células animales, cuando se tiene una unión de reconocimiento específica, entre células asesinas (linfocitos T citotóxicos) y células blanco. El mecanismo por el cuál los linfocitos citotóxicos reconocen y lisan células blanco puede ser el que el organismo ocupa para eliminar células transformadas y que en algunos casos se estimula en presencia de lectinas vegetales (Sharon y Lis, 1989b).

Otra de las actividades biológicas de las lectinas es la **citotoxicidad**, como es el caso de la Concanvalina A, que es tóxica en animales. Otro ejemplo es el ricino, un veneno hasta 10 veces más potente que el veneno de la cobra (Sharon y Lis, 1989b).

5.5 PURIFICACIÓN DE LAS LECTINAS

Las lectinas tienen características muy diversas. Durante el descubrimiento de las primeras aglutininas, se describieron moléculas con propiedades muy semejantes al resto de las proteínas: solubles en soluciones con una concentración baja de sales, no dializables, fraccionamiento con sales. Es por ello que las lectinas no tienen un esquema general de purificación (Lis y Sharon, 1980a).

La presencia de lectinas se detecta, como regla general, por medio de ensayos de hemaglutinación, empleando eritrocitos de humano o de conejo. Sin embargo, cuando una reacción positiva de aglutinación indica la presencia de lectinas, la evidencia contundente sólo la da el aislamiento y caracterización de la proteína con

actividad aglutinante. Un resultado negativo (sin aglutinación), no indica la ausencia de lectinas, ya que 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; 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). Sin embargo al ser purificadas del extracto por técnicas como fraccionamiento con sales y cromatografía, se puede observar la actividad aglutinante (Englard y Seifter, 1990; Singh y Singh, 1996).

La obtención de lectinas puras, se logra mediante técnicas convencionales de purificación de proteínas. Cuando se trata de semillas y granos, de vegetales, se requiere moler y delipidizar la harina obtenida con solventes orgánicos, para posteriormente realizar la extracción con un amortiguador. Una de las propiedades de la mayoría de las lectinas es su solubilidad en soluciones acuosas, por lo que se utilizan soluciones amortiguadas con sales para la extracción. En el caso de órganos aéreos, como las hojas, primero se liofilizan los tejidos para su posterior molienda y extracción. Los extractos crudos pueden someterse a fraccionamiento mediante técnicas de precipitación, ya sea con sales o con solventes (Rüdiger, 1988). Esto con la finalidad de insolubilizar a las proteínas y separarlas de la mezcla compleja en la que se encuentran. Una de las sales más empleadas para la precipitación de proteínas es el sulfato de amonio, debido a que permite que las proteínas conserven su actividad biológica. Las etapas de purificación finales se realizan mediante cromatografía: de exclusión de peso molecular, intercambio iónico, de afinidad y cromatografía de líquidos de alta resolución. El proceso de purificación se monitorea, en cada etapa, con electroforesis y se evalúa la actividad biológica de la proteína de interés, en el caso de las lectinas, la actividad hemaglutinante (Englard y Seifter, 1990).

5.6. IMPORTANCIA DE LAS LECTINAS

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 inertes 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. Una de las lectinas más conocidas es la concanavalina A. Se han reportado varios usos para esta lectina. Hauptmann y cols. (1995) patentaron la identificación de receptores para el factor de necrosis tumoral, así como el mensajero y las proteínas que se unen al receptor, 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 membranales y citoplasmáticos, 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 las lectinas, algunas se mencionan en la tabla 6.

Tabla 6. 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>Aleuria aurantia</i> ⁵	Caracterización de glucoproteínas en cerebro Identificación de receptores, específicos para fucosa, en la retina de conejos
<i>Phaseolus vulgaris</i> ⁶ (Leucoaglutinina)	Estudio de las conexiones neuronales
<i>Pisum sativa</i> ⁷	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 Ohlson y Karlsson, 1983; Hall y Karlsson, 1985

⁶ Wouterlood y Groenewegen, 1991

⁷ Klein y cols. 1999

VIH= Virus de Inmunodeficiencia Humana adquirida.

CMV= Citomegalovirus.

También se han purificado 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, en este caso carbohidratos inmovilizados en una matriz de poliacrilamida (Sharon y Lis, 1972; Horejsí y Kocourek, 1978; Seigel y Notter, 1992; Mai y cols., 1996).

Las lectinas debido a su especificidad para unirse a moléculas de azúcares simples, tienen la habilidad de unirse a sacáridos de las superficies celulares. Propiedad que las ubica como una nueva herramienta en la investigación de la arquitectura de las superficies celulares. Las lectinas también se usan en el aislamiento y purificación de carbohidratos contenidos en polímeros, así como el estudio de su estructura química (Sharon y Lis, 1989; Colin, 1992). Uno de los usos más frecuentes de las lectinas es en banco de sangre para la tipificar grupos sanguíneos, lo cual se logra mediante reacciones específicas de lectinas con los azúcares de la superficie celular de los eritrocitos. Algunos ejemplos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. 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>
B	<i>Bandeiraea simplicifolia</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).

El uso de lectinas en estudios de cáncer se inició con el descubrimiento de una lectina contaminante en una preparación de lipasas 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).

Dada la importancia de las actividades biológicas de las lectinas, en los últimos 22 años (1976-1998), la Oficina de Patentes de los Estados Unidos ha otorgado 2,620 patentes, que utilizan lectinas en distintos campos de investigación.

5.7 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.

Las fuentes más exploradas para determinar la presencia de lectinas, han sido las diversas variedades de frijol que integran nuestra dieta. Así mismo, se han caracterizado y se conocen los efectos antinutricios que provocan en el hombre. La mayoría de las lectinas provenientes de frijol se inactivan mediante el proceso de cocción, lo que impide que tengan efectos antinutricios.

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 (Villegas, 1995).

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). De acuerdo a la literatura se conoce que las concentraciones más elevadas de lectinas están presentes en las semillas de las plantas. Por ello, aún cuando la semilla es una parte no comestible del fruto de xoconostle, se evaluó en estudios previos para determinar si contenía moléculas tipo lectina. Los resultados indicaron la presencia de moléculas con actividades hemaglutinantes con títulos de 320 U/mg, pero se desconoce si la naturaleza de dicha actividad se debe a una lectina (Rodríguez y Salazar, 1999).

6. OBJETIVOS

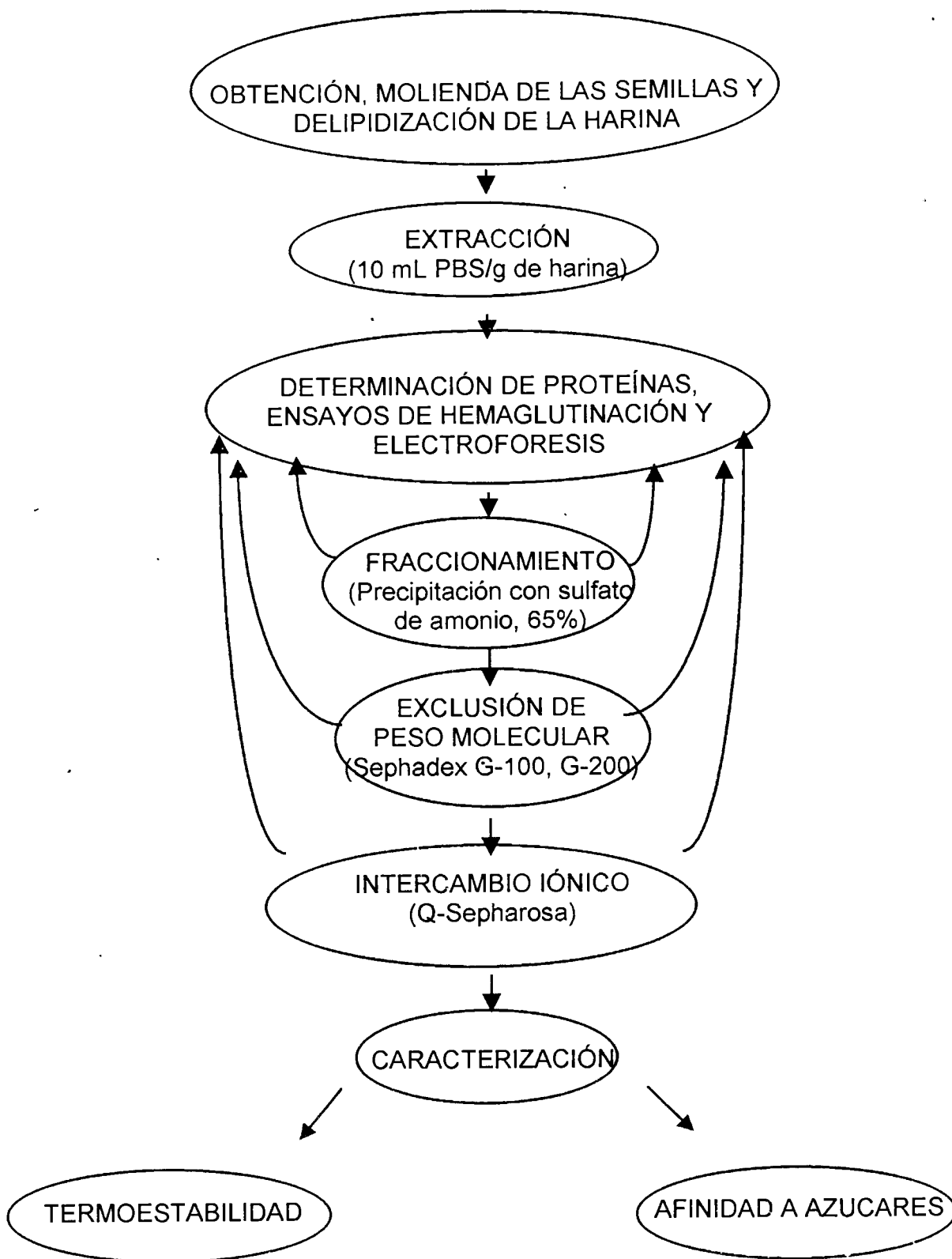
6.1 Objetivo General

- Purificar y caracterizar parcialmente la(s) molécula(s) responsables de la actividad aglutinante observada en el extracto de semillas de xoconostle (*Opuntia joconostle*).

6.2 Objetivos Específicos

- Realizar un fraccionamiento del extracto crudo de semillas de xoconostle con sulfato de amonio y determinar la presencia de aglutininas en las fracciones obtenidas.
- Purificar la(s) fracción(es) con actividad aglutinante mediante técnicas cromatográficas.
- Evaluar la pureza de las fracciones obtenidas mediante electroforesis.
- Determinar estabilidad a temperatura y la afinidad a algunos azúcares, de las moléculas purificadas.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Materiales

Los frutos de xoconostle se obtuvieron del mercado local de un mismo proveedor, cultivados en el Estado de México. Los eritrocitos de conejo se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro y de la Universidad de California, Campus Davis. La albúmina sérica bovina, la matriz empleada para intercambio iónico (Q-Sepharosa), así como las membranas para diálisis, fueron de SIGMA Chemical Co. (St. Louis MO). Las matrices empleadas en exclusión de peso molecular (Sephadex G-100 y G-200), fueron Pharmacia Fine Chemical Inc. (Suecia). El sulfato de amonio y el resto de las sales empleadas, así como los solventes, fueron de J.T. Baker (Xalostoc México) y SIGMA Chemical Co. (St. Louis MO). Los reactivos y el equipo para electroforesis fueron todos de BIO-RAD (Hércules CA). El resto de los reactivos empleados fueron todos de grado analítico.

8.2 Métodos

8.2.1 Análisis Químico.

8.2.1.1 Preparación del Material. Las semillas del fruto de xoconostle se extrajeron manualmente, se secaron durante 24 horas a temperatura ambiente (20-25°C) y 48 horas a 36°C. Una vez secas, las semillas se molieron para obtener la harina correspondiente, en un molino Tecator CEMOTEC 1090. La harina de las semillas se delipidizó, con una mezcla de cloroformo:metanol (2:1), a razón de 5 mL de solvente por gramo de harina, a 4°C.

8.2.1.2 Obtención del Extracto Crudo. Una vez evaporado el solvente, el extracto crudo se obtuvo adicionando 10 mL de una solución salina amortiguada con fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés: Phosphate Buffered Saline; KCl 2.68 mM,

KH_2PO_4 1.47 mM, Na_2HPO_4 8.10 mM y NaCl 140 mM, pH = 7.2) por gramo de muestra agitando la mezcla a 4°C, durante 2 horas. Después de la extracción, el sobrenadante se recuperó por centrifugación, en una centrífuga refrigerada Hermle Modelo Z323 K (10,000 r.p.m., 20 min., a 4°C). El extracto crudo obtenido se alicuyó y almacenó a -20°C hasta su uso.

8.2.1.3 Cuantificación de Proteínas. El contenido de proteínas en el extracto crudo y sus fracciones se cuantificó por el método de Bradford (1976). Las lecturas de absorbencia se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2S, a 595 nm, usando albúmina sérica bovina como estándar.

8.2.2 Detección de Aglutininas.

8.2.2.1 Ensayo de Hemaglutinación. Los ensayos de hemaglutinación se realizaron en placas de ELISA de 96 pozos empleando una suspensión de eritrocitos de conejo al 1% en PBS, previamente tratados con tripsina 0.15%. Los eritrocitos fueron fijados con glutaraldehído (0.1 %), con el objetivo de prolongar su vida útil 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 los 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 cada extracto en los pozos subsiguientes (1A, 1B, 1C...). Se incluyó un control positivo utilizando concanavalina A (2 mg/mL) y un control negativo en el que sólo se colocó PBS. Por último, se adicionó a cada pozo 50 μL de la suspensión de eritrocitos de conejo al 1% fijados con glutaraldehído. La microplaca se incubó a 35°C durante 3 horas, y se observó en un microscopio invertido Zeiss Axiovert 25, para determinar el grado de aglutinación. La hemaglutinación se estimó mediante una escala arbitraria 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).

8.2.3 Purificación del Extracto Crudo.

8.2.3.1 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 a que porcentaje saturar el extracto de xoconostle. Se adicionó la cantidad de sulfato de amonio necesaria para saturar el extracto al 65% (Englard, 1990), y una vez que toda la sal entro 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 (P65) y sobrenadante (S65) mediante centrifugación (10,000 r.p.m., 20 min., 4°C). El precipitado (P65) se resuspendió en 5.5 mL de PBS. Las fracciones, así como el extracto crudo, se dializaron contra agua a través de una membrana con tamaño de corte de 12 kDa, durante 30 horas con 8 cambios de agua (4°C). Las muestras del extracto crudo, el sobrenadante (S65) y el precipitado (P65), se liofilizaron después de la diálisis, para concentrar y posteriormente cuantificar el contenido de proteínas por el método de Bradford (1976). Conociendo la concentración de proteínas se probó la actividad hemaglutinante (Jaffé, 1980). El extracto crudo y sus fracciones se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de 12.5%, en condiciones desnaturizantes no reductoras por el método de Laemmli (1970).

8.2.3.2 Cromatografía de Exclusión de Peso Molecular. La fracción P65 obtenida mediante el fraccionamiento con sulfato de amonio se sometió a cromatografía de

exclusión de peso molecular con la finalidad de separar la mezcla de proteínas de acuerdo a su peso molecular. El liofilizado de la fracción P65 se resuspendió en 3.5 mL de PBS, se centrifugo y filtro através de una membrana de 0.22 μ de poro, previamente. La columna (70 x 2 cm) que se empleo fue empacada con Sephadex G-100, y equilibrada con PBS, como etapa preparativa. El volumen vacio (V_0) de la columna fue de 40 mL, la velocidad de flujo de 0.33 mL/min y se colectaron fracciones de 0.9 mL, aproximadamente. Las fracciones obtenidas se dializaron, liofilizaron y almacenaron a 4°C, para su uso posterior. El amortiguador de elución que se utilizó fue PBS.

La fracción P65 (3.5 mL, PBS) también se inyectó a una columna (90 x 2 cm) empacada con Sephadex G-200, $V_0=38$ mL. Posteriormente la fracción con actividad aglutinante obtenida mediante cromatografía en G-200, se dializó contra agua y liofilizó. La fracción obtenida de G-200, se resuspendió en 1 mL de PBS-0.4 N de NaCl, y se sometió nuevamente a cromatografía de exclusión de peso molecular, esta vez en una columna empacada con 180 mL de Sephadex G-100 (70 x 2 cm) que se equilibrio y eluyó con PBS-0.4 N de NaCl, con una velocidad de flujo de 0.8 mL/min.

8.2.3.3 Cromatografía de Intercambio Iónico. La cromatografía de intercambio iónico se llevó a cabo con una columna (10 x 1.5 cm) empacada con 10 mL de resina de intercambio aniónico, Q-Sepharosa. La Q-Sepharosa, se equilibró con un amortiguador de Tris-HCl 0.02 M, pH=8 y el gradiente lineal de elución se realizó con NaCl de 0 a 0.4 M en el mismo amortiguador. Se inyectó la fracción con actividad hemaglutinante obtenida de filtración en gel G-100 preparativa, previamente resuspendida en 0.5 mL de Tris-HCl 0.02 M, pH=8. Las fracciones colectadas fueron de 3 mL cada una, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Durante la realización de las etapas de cromatografía, de exclusión de peso molecular e intercambio iónico, la presencia de proteínas se detecto mediante su absorbencia a 280 nm, en un espectrofotómetro Perkin Elmer uv/vis Lambda 2S.

8.2.4 Caracterización Parcial.

8.2.4.1 Termoestabilidad. La estabilidad térmica de las fracciones con actividad hemaglutinante (resuspendidas en PBS), se evaluó tratando las muestras a la temperatura de 20, 60, 70 y 90°C (en baño de agua con recirculación) durante 15 minutos. La muestra tratada se enfrió y centrifugó (12,000 r.p.m., 5 min., a 4°C) al concluir los 15 minutos de incubación, y de inmediato se realizó la prueba de hemaglutinación con el sobrenadante recuperado.

8.2.4.2 Afinidad a Azúcares. Se probó la afinidad con algunos azúcares, incubando las fracciones en presencia de distintos azúcares con una concentración inicial de 0.1 M. A partir del primer pozo se realizaron diluciones dobles seriadas del azúcar, se adicionaron a cada pozo 50 μL de la fracción con una concentración de proteína de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y, finalmente, 50 μL de una suspensión de eritrocitos al 1%. Se determinó la inhibición de la aglutinación mediante la observación al microscopio después de 3 horas de incubación.

8.2.5 Análisis Estadístico.

La cuantificación de proteínas, la detección de aglutininas y los experimentos de la purificación parcial se efectuaron al menos tres veces obteniéndose la media y la desviación estándar como medida de dispersión de los datos. Las curvas estándar se procesaron mediante regresión lineal simple (utilizando el programa Sigma Plot versión 4.0).

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 PREPURIFICACIÓN

La presencia de actividad aglutinante en xoconostle se determinó mediante el escrutinio del extracto crudo obtenido de las semillas de estos frutos (ver Materiales y Métodos). Se evaluaron distintos amortiguadores de extracción, con la finalidad de conocer el amortiguador que permitiría la mayor recuperación de actividad aglutinante. Para ello se emplearon los siguientes amortiguadores: Agua, PBS pH = 7.2, NaCl 0.5 M, Etanol al 70% y Ácido Cítrico 0.2 M, pH = 2.5 (Rüdiger, 1988).

Los extractos crudos obtenidos presentan una baja concentración de proteínas, en contraste con la actividad aglutinante, la cual fue mayor en los extractos que se obtuvieron con: PBS, NaCl 0.5 M y Ácido Cítrico. Las actividades específicas y las concentraciones de proteína se muestran en la Tabla 8. Los resultados mostraron que el amortiguador que permite una mayor recuperación de la actividad aglutinante es el PBS, esto era de esperarse ya que las lectinas son moléculas fáciles de extraer en amortiguadores que contengan una concentración baja de sales (Rüdiger, 1988). Los amortiguadores que tienen un pH ácido llegan a provocar la desnaturalización de algunas lectinas. En este caso la lectina mantuvo su actividad (780 U/mg), pero en menor proporción si comparamos la actividad obtenida con PBS (1280 U/mg). El hecho de que la actividad aglutinante persista en una extracción realizada con un amortiguador que contiene fosfatos, indica que es muy probable que la lectina no requiera de iones para llevar a cabo su función biológica. Una de las lectinas mejor conocidas es la concanavalina A, la cual requiere de cationes de manganeso y calcio para unir azúcares. Por lo que su extracción se lleva a cabo en ausencia de compuestos como las sales de fosfato (Rüdiger, 1988).

Un factor importante en el desarrollo de la purificación de proteínas, es evitar la variabilidad que se tiene entre una muestra y otra, dependiendo de la región en donde se cultive el fruto de estudio, de la época del año y condiciones de crecimiento. Por tal motivo se decidió evaluar la diferencia, en cuanto al perfil

proteico y la actividad aglutinante, contenido en distintos lotes de xoconostle que se cultivan en la región. Los lotes que se probaron fueron obtenidos del mercado local (L1), supermercado (L2) y de la central de abastos local (L3) durante la misma estación del año, los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 8. Escrutinio de Actividades Hemaglutinantes en Extractos Crudos de Xoconostle Obtenidos con Distintas Soluciones de Extracción.

SOLUCIÓN	PROTEÍNA (mg/mL)	ULTIMA DILUCIÓN CON AGLUTINACION	AE (U/mg)	UNIDADES TOTALES
Agua	0.640	5±0	320.00	2240.00
PBS	1.000	7±0	1280.00	8960.00
NaCl 0.5 M	1.130	6.5±0	905.00	6335.00
Etanol 70%	0.060	0±0	000.00	0.000
Ácido Cítrico 0.2 M	0.600	5.5±0	780.00	5460.00

La capacidad hemaglutinante de extractos crudos, obtenidos de la harina delipidizada de las semillas de xoconostle, se probó en suspensiones de eritrocitos de conejo tratados previamente con glutaraldehído al 0.1%, como se indica en Materiales y Métodos. Las actividades se observaron después de 3 horas de incubación (37°C). Los datos mostrados son el resultado de 4 replicas con desviación estándar menor al 5%. AE= Actividad Específica.

Tabla 9. Diferencias en Actividades Hemaglutinantes Provenientes de Tres Lotes Distintos de Xoconostle.

MUESTRA	PROTEÍNA (mg/mL)	INTENSIDAD	ULTIMA DILUCIÓN CON AGLUTINACION	AE (U/mg)
Lote 1 (L1)	0.893	+++	5±0	320.00
Lote 2 (L2)	0.776	+++	5±0	320.00
Lote 3 (L3)	0.803	+++	5±0	320.00

Las actividades hemaglutinantes de extractos crudos de los frutos provenientes de distintos negocios se analizaron con preparaciones de eritrocitos de conejo fijados con glutaraldehído. La hemaglutinación se cuantificó luego de 3 horas de incubación a 37°C. Se utilizó concanavalina A (1mg/mL) como control positivo y PBS como control negativo. Los datos mostrados son el resultado de 4 replicas con desviación estándar menor al 5%.

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. La presencia de proteínas en los extractos crudos del xoconostle y sus fracciones se analizó por electroforesis en condiciones desnaturizantes no reductoras (SDS-PAGE), en geles de poliacrilamida al 12.5%. Los geles obtenidos se tiñeron con azul de Coomassie durante las etapas de prepurificación y purificación. Los análisis electroforéticos permitieron confirmar la presencia de proteínas en el extracto y las fracciones estudiadas.

Al evaluar el perfil proteico de los distintos lotes mediante electroforesis desnaturizante, en condiciones no reductoras (Fig.1), no se observaron diferencias en la expresión de bandas proteicas de cada uno de los extractos, por lo tanto se puede suponer que no hay diferencia apreciable en el tipo de proteínas que contienen los frutos. La mayoría de las veces, cuando se trata de lectinas, pueden encontrarse varias isoformas, esto es isolectinas, que difieren únicamente en algunos de sus aminoácidos. En la Tabla 9 se observa que la actividad específica en cada uno de los lotes evaluado fue similar, por lo que se deduce que la cantidad de aglutininas presentes en las semillas de xoconostle se expresa de manera semejante. De acuerdo a los resultados del experimento anterior, a la disponibilidad del fruto y con el fin de simplificar la purificación, se decidió utilizar el lote número tres (L3).

En la Figura 1, se analizaron los extractos crudos obtenidos del xoconostle de cada uno de los establecimientos. Las mismas muestras se sometieron a diálisis, con la finalidad de eliminar péptidos pequeños que pudieran interferir durante la purificación. En los extractos dializados se observó la ausencia de algunas bandas, principalmente la que se encontraba en 21 kDa, aproximadamente, en los tres lotes que se utilizaron. También se enriquecieron otras bandas, como es el caso de las que se encuentran por arriba de 31 kDa.

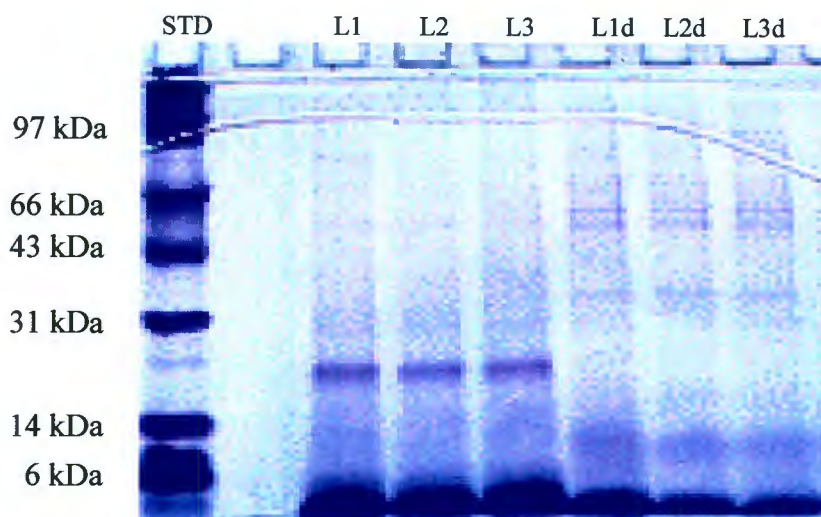


Fig. 1. Análisis Electroforético de las Proteínas contenidas en los Extractos Crudos de Xoconostle Proveniente de Distintos Comercios. Los extractos crudos xoconostle L1, L2 y L3 se analizaron en geles de poliacrilamida al 12.5% con SDS, en condiciones no reductoras. Así mismo, se evaluaron los mismos extractos previamente dializados (L1d, L2d, L3d). En cada uno de los carriles se colocó la cantidad equivalente a 20 μ g de proteína. El gel se tiñó con azul de Coomassie. El carril número 1 corresponde a los estándares de peso molecular (STD).

9.1.1 Fraccionamiento con Sulfato de Amonio

Una vez que se seleccionó el material biológico y el amortiguador de extracción, se inició el fraccionamiento secuencial con sulfato de amonio. Las sales han sido una herramienta muy útil para la purificación de proteínas y se realiza con base en la diferencia de solubilidad que tienen las cadenas de polipéptidos. Se utiliza con el objeto de fraccionar y concentrar a las proteínas presentes en mezclas complejas (Rüdiger, 1988; England y Seifter, 1990; Whitaker, 1994). Por tal motivo se eligió esta técnica para obtener el fraccionamiento inicial. Se adicionó sulfato de amonio a 200 mL de extracto crudo de semillas de xoconostle recién obtenido, hasta alcanzar un 20% de saturación, en este caso no se recuperó precipitado. Posteriormente se probó saturar de 0 a 30%, sin obtener precipitado del extracto. Por tal motivo el extracto crudo se saturó de 0 a 40%, al término del fraccionamiento se recuperaron un sobrenadante (S40) y un precipitado (P40). El P40 fue escaso, pero contenía un 25% de la actividad específica total. Posteriormente el S40 se llevó de 40% de saturación a un 50%, recuperando un 25% de la actividad específica en el P50. El precipitado (P60) obtenido al saturar el S50 de 50 al 60%, presentó una actividad equivalente al 35.31% de la actividad total. Mientras que al saturar de 60 a 65% se recuperó el 50% de la actividad en el P65. Por último el extracto se llevó de 65 a 70%, y de 70 a 90% de saturación, en ambos casos se recuperó menos del 10% de la actividad. Cada una de estas fracciones se dializaron para eliminar el exceso de sales como se indica en Materiales y Métodos, y se liofilizaron. 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 fracciones derivadas del extracto crudo de semillas de xoconostle, P50, P60 y P65, mostraron elevadas actividades hemaglutinantes. El porcentaje de saturación que es necesario para que una proteína precipite, puede dar información general pero importante, acerca del comportamiento de la proteína de interés. Dos de los factores que afectan la solubilidad de una proteína son el grado de hidratación y la presencia de componentes no proteicos en la molécula, tales como carbohidratos, fosfatos o lípidos (Whitaker, 1994).

Tabla 10. Actividades Hemaglutinantes en las Distintas Fracciones Obtenidas Mediante Precipitación del Extracto Crudo de Xoconostle.

SATURACIÓN CON SULFATO DE AMONIO (%)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	AE (U/mg)
P20	0.00	0.00
P30	0.00	0.00
P40	0.83	80.00
P50	12.70	80.00
P60	18.57	113.30
P65	9.04	160.00
P70	1.52	20.00
P90	2.25	0.00

Las actividades hemaglutinantes de las fracciones obtenidas, previamente dializadas, se cuantificaron utilizando preparaciones de eritrocitos de conejo fijados con glutaraldehído. Las fracciones P20 y P30 se obtuvieron saturando directamente el extracto crudo, esto es de 0-20% y de 0-30%, respectivamente. El resto de las fracciones se obtuvieron de forma secuencial, el sobrenadante del precipitado con 40% de saturación (P40), se saturó nuevamente para obtener el P50 y así sucesivamente. La hemaglutinación se cuantificó en cada una de las fracciones luego de 3 horas de incubación a 37°C, como se indica en Materiales y Métodos. Los valores que se muestran son la media de 4 replicas con una desviación estándar menor a 5%.

En el caso de las lectinas, algunas de ellas contienen azúcares en su molécula, lo cual puede resultar en el aumento del grado de hidratación de la molécula (mayor solubilidad) y por consiguiente se incrementa la cantidad de sal necesaria para precipitarlas. La aglutinina proveniente de xoconostle, requirió de aproximadamente 65% de saturación, lo que representa un porcentaje intermedio, con respecto al utilizado para fraccionar otras lectinas. Tal es el caso de la lectina proveniente de *Dolichos lablab*, la cual precipitó cuando su extracto se saturó al 80% con sulfato de amonio. La lectina proveniente de *Dolichos lablab* contiene 4.8% de carbohidratos (hexosas) en su composición (Mo y cols., 1990). Por lo tanto se podría esperar que la lectina obtenida de xoconostle contenga un porcentaje menor de carbohidratos.

Para monitorear el fraccionamiento del extracto de xoconostle, los precipitados se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 12.5%, bajo condiciones no reductoras. El análisis electroforético (Fig. 2A y 2B) mostró bandas proteicas de entre 17 y 28 kDa altamente expresadas en todas las fracciones de xoconostle. En especial se puede apreciar que en el P65, también se enriqueció una banda alrededor de 90 kDa.

La baja resolución de algunas de las bandas presentes en el análisis electroforético puede deberse tanto a la baja cantidad de proteína de los extractos, como a las limitantes propias del método de tinción.

En la Fig. 2 se presenta la curva de precipitación obtenida durante el fraccionamiento con sulfato de amonio. De acuerdo a los resultados obtenidos durante el fraccionamiento secuencial, se eligió precipitar el extracto crudo hasta alcanzar un 65% de saturación. En estas fracciones (del P50 al P65) se recuperó mayor cantidad de actividad aglutinante y como se observa en el gel de poliacrilamida (Fig. 2A y 2B), se eliminó una cantidad considerable de moléculas proteicas (bandas contaminantes en P70). Mientras que algunas bandas de alrededor de 90 kDa se enriquecieron. La precipitación con sulfato de amonio permitió purificar la lectina de xoconostle 8 veces.

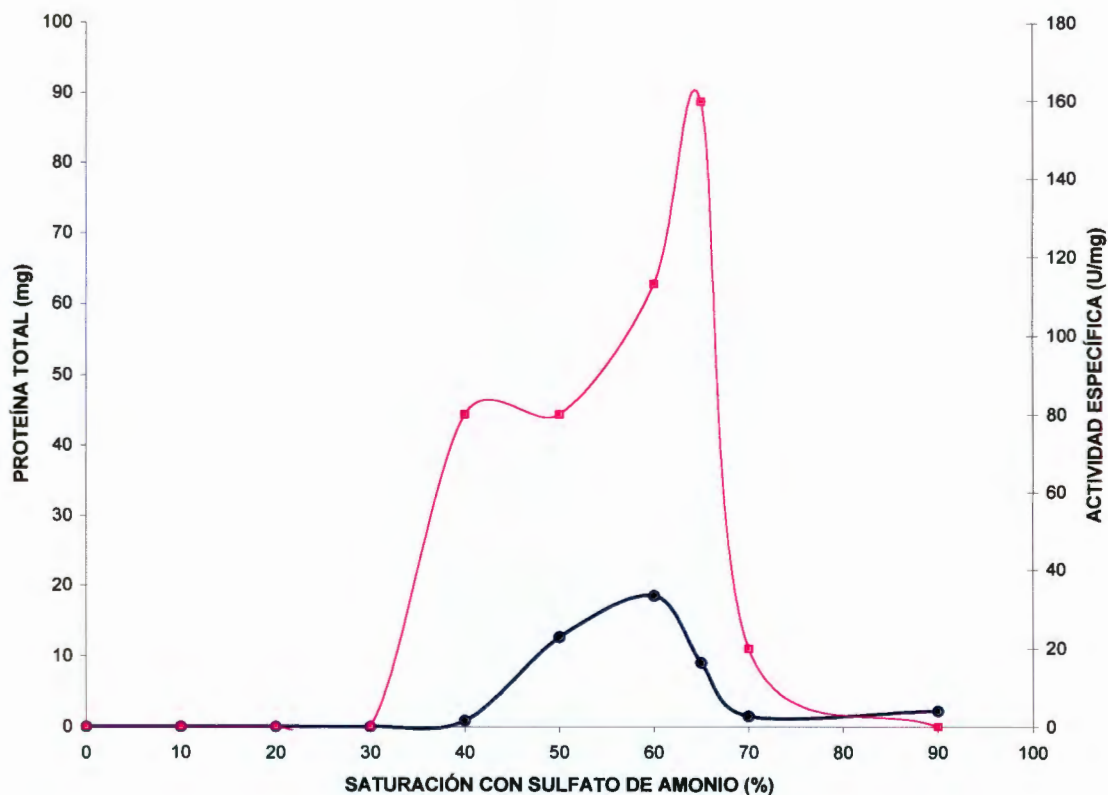


Fig. 2. Curva de Precipitación de las Proteínas contenidas en el Xoonostle. El extracto crudo de xoonostle se fraccionó saturándolo con sulfato de amonio y a sus fracciones (precipitados) se les cuantificó el contenido proteico (●) y se evaluó su actividad específica aglutinante (■).

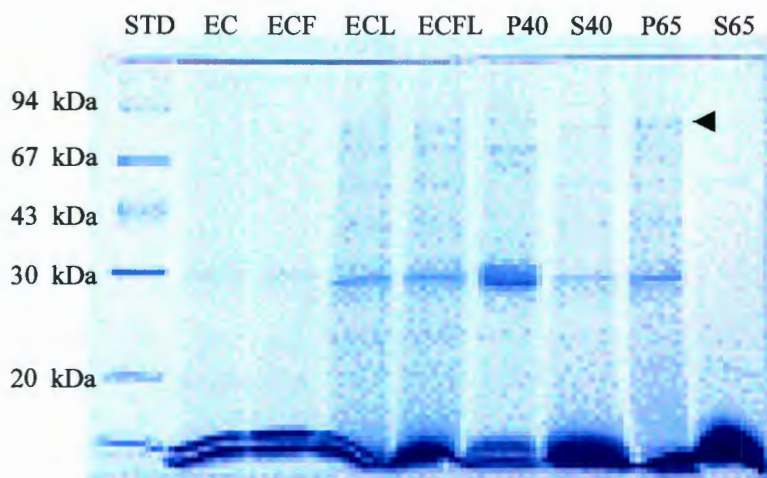


Fig. 2A. Análisis Electroforético de las Fracciones Proteicas obtenidas del Xoconostle Mediante Precipitación con Sulfato de Amonio. El extracto crudo de xoconostle y sus fracciones se analizaron en geles de poliacrilamida al 12.5% con SDS, en condiciones no reductoras. El gel se tiñió con azul de Coomassie. En el carril número 1 se encuentran los estándares de peso molecular (STD). EC= Extracto Crudo; ECF= Extracto Crudo Filtrado; ECL= Extracto Crudo Liofilizado; ECFL= Extracto Crudo Filtrado y Liofilizado; P40= Precipitado obtenido con 40% de saturación; S40= sobrenadante del precipitado 40; P65= Precipitado obtenido con 65% de saturación; S65= sobrenadante del precipitado 65.

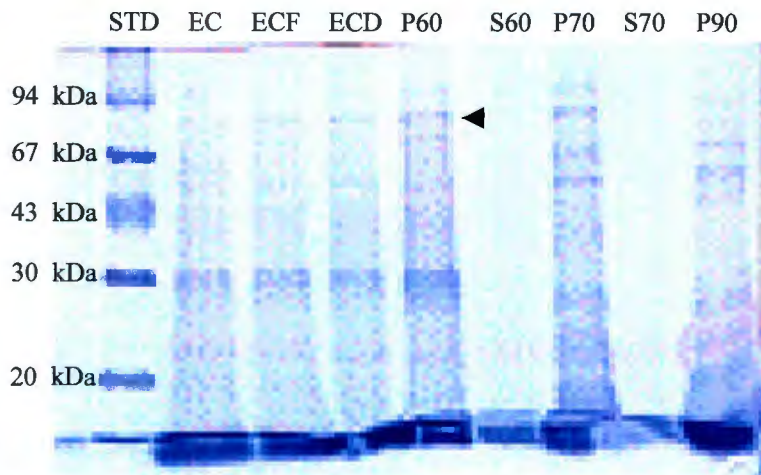


Fig. 2B. Análisis Electroforético de las Fracciones Proteicas contenidas en el Xoconostle. El extracto crudo de xoconostle y sus fracciones se analizaron en geles de poliacrilamida al 12.5% con SDS, en condiciones no reductoras. El gel se tiñió con azul de Coomassie. En el carril número 1 se corrieron los estándares de peso molecular (STD). EC= Extracto Crudo; ECF= Extracto Crudo Filtrado; ECD= Extracto Crudo Dializado; P60= Precipitado obtenido con 60% de saturación; S60= sobrenadante del precipitado 60; P70= Precipitado obtenido con 70% de saturación; S70= sobrenadante del precipitado 70; P90= Precipitado obtenido con 90% de saturación.

9.2 PURIFICACIÓN

9.2.1 Cromatografía de Exclusión de Peso Molecular

Con la fracción P65 obtenida mediante precipitación con sulfato de amonio, se realizó la purificación utilizando cromatografía de exclusión de peso molecular. El P65, previamente dializado, liofilizado y equilibrado con el amortiguador de elución (PBS 0.4 N de NaCl), se inyectó a una columna de Sephadex G-100, con la finalidad separar la mezcla de proteínas. En el cromatograma (Fig. 3) se observaron tres picos, solo uno de ellos contiene actividad aglutinante (■). La fracción con actividad hemaglutinante fue eluida en el volumen vacío (39 mL, aproximadamente) de la columna, lo que indicó que la molécula responsable de la actividad no había entrado a la matriz. Varias lectinas, hasta ahora descritas, llegan a tener elevados pesos moleculares, ya que algunas están compuestas por dos o más subunidades.

Durante esta cromatografía se eliminaron compuestos coloridos de tipo fenólico, que corresponden a la fracción F3 (X, se colectó de la fracción 77 a la 160). El perfil electroforético mostró aún una gran cantidad de proteínas de alto peso molecular en la fracción con actividad hemaglutinante (F1■, se formó de la unión de las fracciones 34 a la 47), pero se perdieron las bandas en la región de pesos moleculares pequeños, que aparecieron en la fracción 2 (F2▲, de la fracción 48 a la 76) (Fig.3A).

Se tomó la fracción con actividad (F1■), se dializó, liofilizó y se almacenó, a -20°C , para su uso posterior.

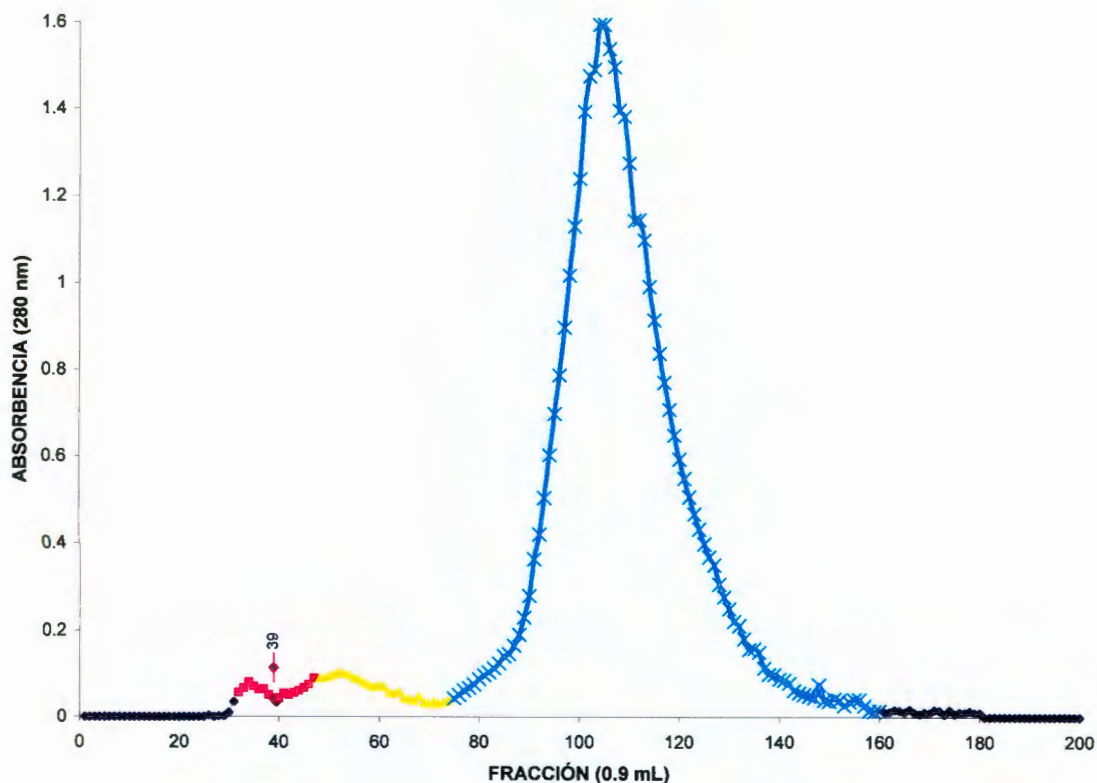


Fig. 3. Purificación de la Hemaglutinina de Semillas de Xoconostle mediante Cromatografía de Exclusión de Peso Molecular (Sephadex G-100). La hemaglutinina precipitada con sulfato de amonio (P65), dializada, liofilizada y resuspendida en PBS, se inyecta a una columna G-100. La elución se realizó con el mismo amortiguador en el que fue resuspendido el P65. Las fracciones en azul no presentaron actividad hemaglutinante, ni proteína a 280 nm (◆); se colectaron de la fracción 34 a la 47 y se le llamó F1, que fue la única fracción con actividad hemaglutinante (■); el resto de las fracciones (F2 ▲, F3 ×) no tuvieron actividad aglutinante. El volumen vacío fue de 38 mL.

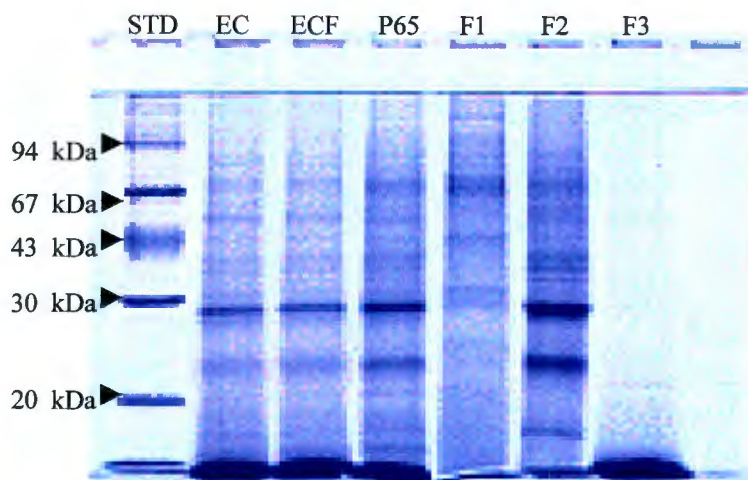


Fig. 3A. Análisis Electroforético de las Proteínas contenidas en el Xoconostle y sus Fracciones. El extracto crudo de xoconostle y sus fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión de peso molecular (Sephadex G-100) se analizaron en geles de poliacrilamida al 12.5% con SDS, en condiciones no reductoras. El gel se tiñió con azul de Coomassie. En el carril número 1 se colocaron los estándares de peso molecular (STD). EC= Extracto Crudo; ECF= Extracto Crudo Filtrado; P65= Precipitado obtenido al saturar el extracto crudo hasta 65% con sulfato de amonio; F1= fracción obtenida en filtración en gel, con actividad aglutinante; F2= fracción obtenida en filtración en gel, no contiene actividad aglutinante; F3= fracción con residuos de péptidos pequeños y compuestos fenólicos obtenidos en filtración en gel. En cada uno de los carriles se colocó la cantidad equivalente a 20 μ g de proteína.

Los resultados obtenidos de la cromatografía con Sephadex G-100, sugieren que la proteína responsable de la actividad hemaglutinante podría tener un tamaño superior a los 100 kDa, debido a que eluyó en el volumen vacío. Con la finalidad de lograr una mejor separación de la fracción con actividad hemaglutinante, se preparó una columna empacada con Sephadex G-200,.

Se midió el volumen vacío de la columna y fue de 30 mL, aproximadamente, volumen que equivale a la fracción 38.

A partir del extracto crudo de las semillas del xoconostle, se obtuvo la fracción P65, la cual después de ser dializada, liofilizada y resuspendida en PBS, se inyectó en la columna. En la Figura 4 se muestran las distintas fracciones que se eluyeron. Se observa una mejor separación, ya que se obtuvieron cinco fracciones: F1 (■ se colectó de la fracción 41 a la 56), F2 (▲ se colectó de la fracción 57 a la 79) en la que se recuperó la mayor actividad hemaglutinante, y finalmente F3 (×), F4 (-) y F5(●) que no presentaron actividad hemaglutinante. Como se aprecia en la Figura 4, la molécula de interés eluyó después del volumen vacío (V_0), pero continúa en valores muy cercanos a V_0 . Por lo que se podría determinar el peso molecular aproximado utilizando una matriz como P-300, por ejemplo.

El perfil proteico de cada una de las fracciones también mejoró, ya que en la fracción que contuvo la actividad hemaglutinante se observan escasas bandas, sobre todo alrededor de 90 kDa (Fig. 4A). Durante esta etapa se logró un factor de purificación de 402 veces.

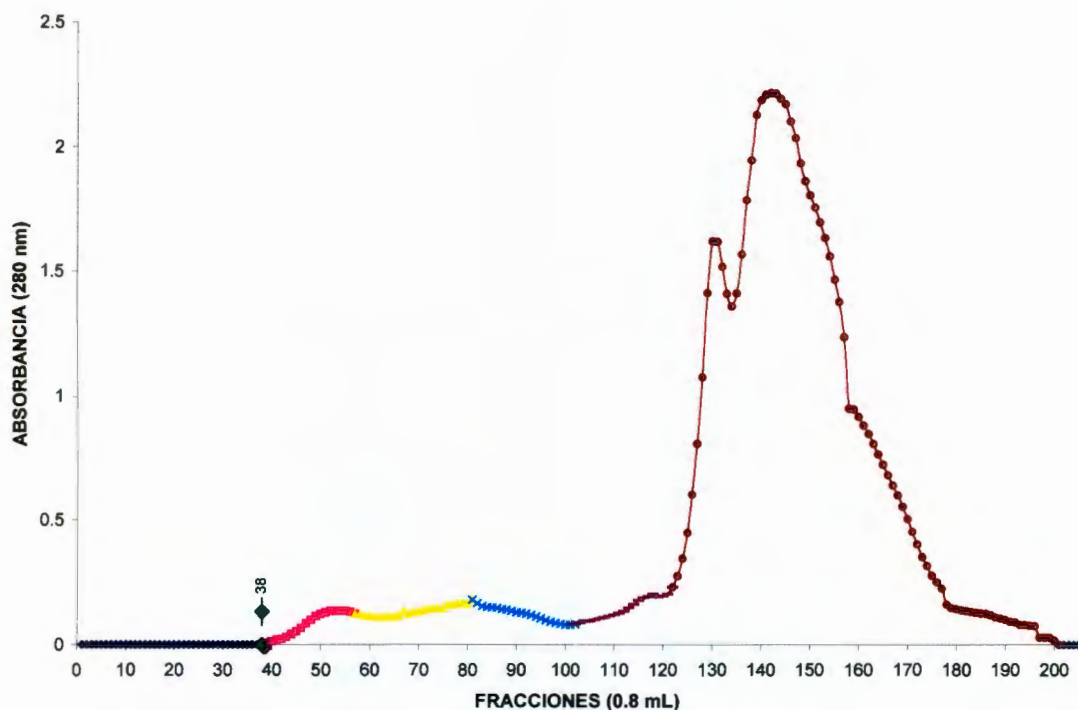


Fig. 4. Purificación de la Hemaglutinina de Semillas de Xoconostle mediante Cromatografía de Exclusión de Peso Molecular (Sephadex G-200). La hemaglutinina precipitada con sulfato de amonio (P65), dializada, liofilizada y resuspendida en PBS, se inyectó a una columna G-200, se utilizó el mismo amortiguador de elución. Las fracciones en azul no presentaron actividad hemaglutinante, ni proteína a 280 nm (◆); se colectaron de la fracción 41 a la 56 y se le llamó F1 (■); la fracción con mayor actividad hemaglutinante fue F2 ▲, el resto de las fracciones (F3 ×, F4 - y F5 ●) no tuvieron actividad aglutinante. Volumen vacío: fracción 38.

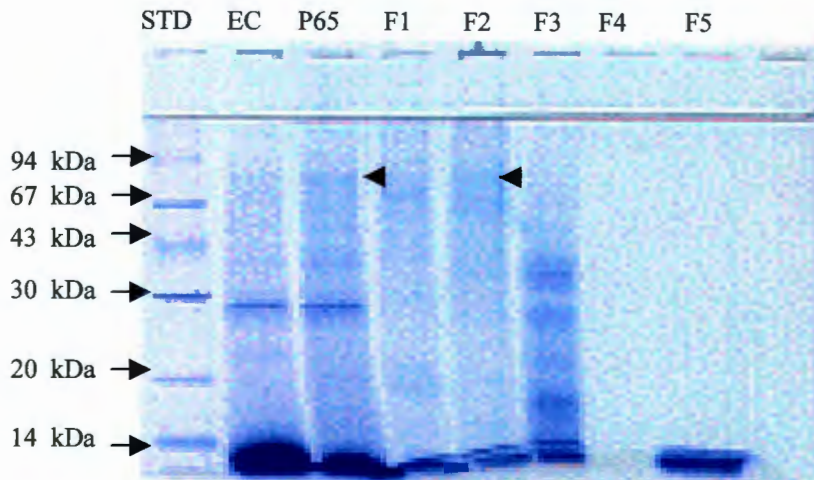


Fig. 4A. Análisis Electroforético de la Purificación de las Hemaglutininas del Xoconostle Obtenidas de G-200. El extracto crudo de xoconostle y sus fracciones se analizaron en geles de poliacrilamida al 12.5% con SDS, en condiciones no reductoras. El gel se tiñó con azul de Coomassie. En el carril número 1 se corrieron los estándares de peso molecular (STD). EC= extracto crudo; P65= Precipitado obtenido al saturar el extracto crudo hasta 65% con sulfato de amonio; F1= fracción obtenida en filtración en gel; F2= fracción obtenida en filtración en gel, contiene actividad hemaglutinante; F3= fracción proveniente de filtración en gel; F4= fracción sin proteína; F5= fracción con residuos de péptidos pequeños y compuestos fenólicos obtenidos en filtración en gel.

Mediante la cromatografía realizada con Sephadex G-200, se obtuvo un fracción semipura con elevada actividad hemaglutinante, F2 ▲. En algunos casos el motivo por el que una proteína no entra en la matriz durante la cromatografía de filtración en gel, es que se trata de una molécula que forma agregados, particularmente moléculas que contienen compuestos como ácido péctico, mucílagos o inclusive carbohidratos más simples (Al-Bakir y Whitaker, 1978). Esto provoca que se obtenga una estimación errónea del peso molecular de la proteína. Debido a que la molécula responsable de la actividad hemaglutinante del xoconostle eluyó en el volumen vacío (Sephadex G-100) o muy cerca del volumen vacío (Sephadex G-200), se decidió emplear un amortiguador de elución con una normalidad superior a la que se utilizó en un principio. Muchas de las interacciones que existen entre las proteínas se ven mediadas por cargas, por tal motivo, al incrementar la concentración de las sales del amortiguador de elución puede, en algunos casos, interrumpir dichas interacciones, evitando que se formen agregados proteicos. La fracción F2, obtenida de la filtración en gel G-200, se sometió nuevamente a cromatografía de exclusión de peso molecular, utilizando Sephadex G-100, con una modificación en el amortiguador de elución, se aumento la concentración de 0.1N a 0.4N de NaCl (Al-Bakir y Whitaker, 1978). El cromatograma y el análisis electroforético se muestra en la Fig. 5 y Fig. 5A, respectivamente.

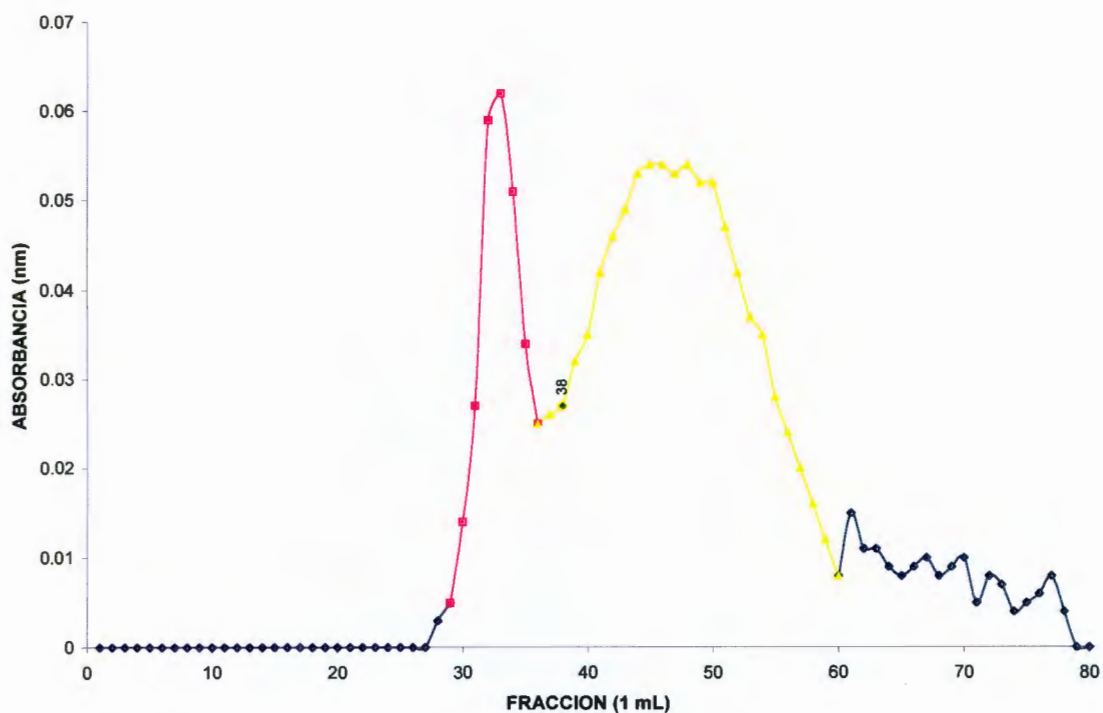


Fig. 5. Purificación de la Hemaglutinina de Semillas de Xoconostle mediante Cromatografía de Exclusión de Peso Molecular (Sephadex G-100). La hemaglutinina obtenida mediante exclusión de peso molecular (F2), se dializó, liofilizó, resuspendió en PBS 0.4 N de NaCl y se inyectó a una columna G-100. La elución se realizó con el mismo amortiguador en el que fue resuspendida la F2. Las fracciones en azul no presentaron actividad hemaglutinante, ni proteína a 280 nm (◆), se colectaron de la fracción 30 a la 37 y se le llamó FA (■), y fue el único pico con actividad hemaglutinante, la fracción FB ▲ no tuvo actividad aglutinante.

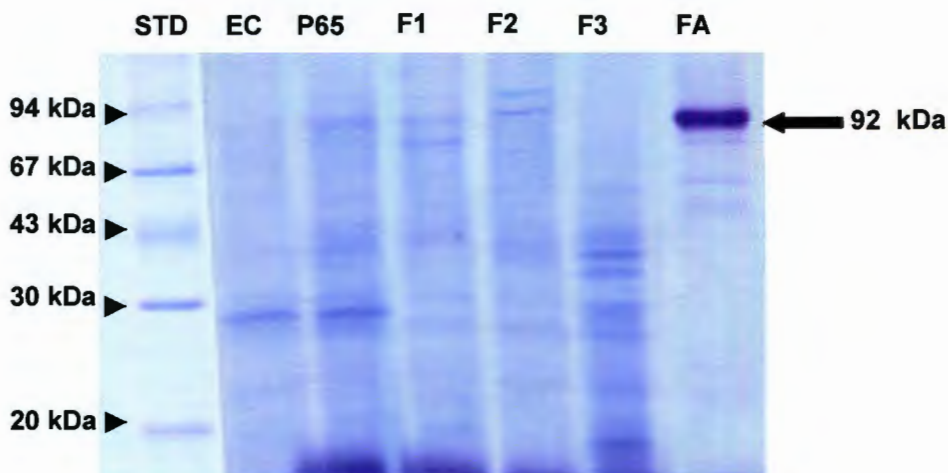


Fig. 5A. Análisis Electroforético de la Recromatografía en G-100, de la fracción F2 de G-200. El extracto crudo de xoconostle y sus fracciones se analizaron en geles de poliacrilamida al 12.5% con SDS, en condiciones no reductoras. La tinción del gel se realizó con azul de Coomassie. En el carril número 1 corresponde a los estándares de peso molecular (STD). EC= extracto crudo; P65= Precipitado obtenido al saturar el extracto crudo hasta 65% con sulfato de amonio; F1= fracción obtenida en filtración en gel (G-200); F2= fracción obtenida en filtración en gel (G-200), con mayor actividad aglutinante; FA= fracción obtenida en filtración en gel (G-100), que contiene la actividad aglutinante (ver Figura 5). En cada uno de los carriles se colocó la cantidad equivalente a 20 μ g de proteína.

La fracción que resultó de la cromatografía en Sephadex G-100 (FA■), tiene una elevada actividad hemaglutinante. Y como se observa en el gel de electroforesis (Fig. 5A), prácticamente está homogénea. De la fracción obtenida, también se realizó un gel de electroforesis en condiciones desnaturalizantes, no reductoras, que fue teñido con un reactivo específico para glucoproteínas. La tinción fue positiva, pero muy débil, por esta razón, se espera que la lectina contenga en su estructura azúcares, principalmente hexosas ya que el reactivo que se utilizó reacciona específicamente con estos carbohidratos. Aún resta determinar la naturaleza de dichos carbohidratos, así como la proporción en que se encuentran. La purificación de la molécula responsable de la actividad aglutinante, en semillas de xoconostle, se llevó a cabo hasta 1120 veces, con respecto a su concentración inicial en el extracto crudo, utilizando precipitación con sulfato de amonio y dos etapas de cromatografía de exclusión de peso molecular (Tabla 11).

Tabla 11. Tabla de Purificación de la Proteína (lectina) de Xoconostle Mediante Cromatografía de Exclusión de Peso Molecular.

MUESTRA	VOLUMEN (mL)	PROTEÍNA (mg/mL)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	AE (U/mg)	PURIFICACIÓN (veces)	RECUPERACIÓN (%)
EC	200.00	0.75	150.00	20	1	100.00
P65	5.50	1.64	9.04	160	8	6.03
F2G200	30.00	0.13	2.46	8050	400	1.65
FAG100	10.50	0.04	0.17	22500	1100	0.11

EC= Extracto Crudo; P65= Precipitado obtenido al 65% de saturación con sulfato de amonio; F2G200= Fracción 2 obtenida en Exclusión de Peso Molecular, Sephadex G-200; FAG100= Fracción A, obtenida mediante Exclusión de Peso Molecular, Sephadex G-100.

9.2.2 Cromatografía de Intercambio Iónico

Con la finalidad de explorar una vía alternativa de purificación, se realizó la técnica de intercambio iónico. La cromatografía de intercambio iónico, se realizó en una columna de intercambio aniónico, empacada con Q-Sepharosa, como se indica en Materiales y Métodos. La muestra que se empleó en esta etapa, fue una fracción semipura de filtración en gel Sephadex G-100 (F1 ■) que se había mantenido en refrigeración (4°C) hasta su subsecuente purificación. Durante el desarrollo de esta etapa de purificación, se observó que la molécula responsable de la actividad aglutinante fue estable a pH=8. La fracción F1 (■) se resuspendió en Tris-HCl 0.02 M, pH=8 y se adsorbió en Q-Sepharosa. El gradiente que se utilizó para eluir la lectina fue de 0 a 0.4 M de NaCl, en el mismo amortiguador. En el cromatograma se observan dos picos, de los cuales únicamente uno presentó (F1 -) la actividad aglutinante (Fig.6).

El perfil electroforético de la fracción con actividad aglutinante fue similar al obtenido mediante cromatografía de exclusión de peso molecular. Los pesos moleculares son muy parecidos en condiciones desnaturizantes no reductoras, alrededor de 92 kDa. Por esta razón se puede proponer que la molécula está formada de al menos dos subunidades, que suman un total de 200 kDa, o hasta 400 kDa, ya que al realizar cromatografía de exclusión de peso molecular, la actividad se observó, en todos los casos, durante la elución del volumen vacío.

De la fracción obtenida de intercambio aniónico, también se realizó un gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes, no reductoras, que fue teñido con plata. El resultado fue la tinción de las mismas bandas proteicas, con plata (Fig. 6A) que las que se observaron con la tinción de azul de Coomassie, esto es, una tinción muy débil. Mediante la tinción con plata se observó una banda homogénea, pero aún se confirmará su pureza mediante isoelectroenfoque en estudios posteriores (Fig. 6A).

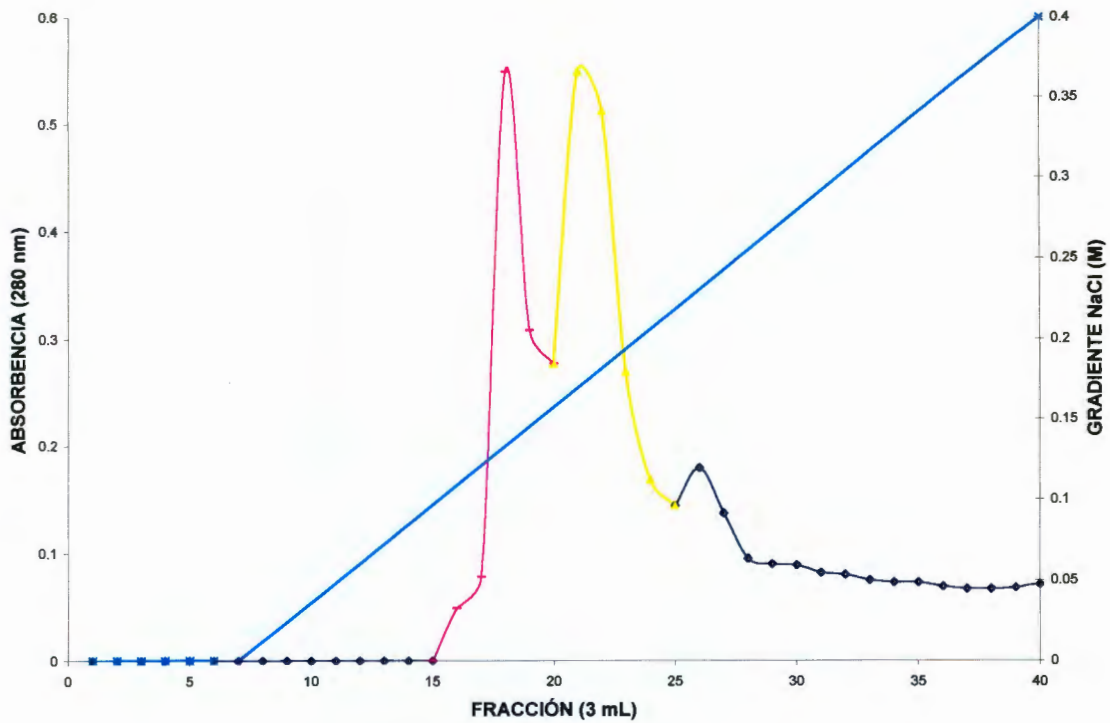


Fig. 6. Cromatografía de Intercambio Iónico. La fracción obtenida a partir de filtración en gel (Sephadex G-100), se inyectó a la columna de intercambio aniónico (Q-Sepharosa), previamente equilibrada con Tris-HCl 0.02 M, pH=8. Se colectaron de la fracción 15 a la fracción 19, para formar F1 (—), F1 contuvo la actividad aglutinante. La zona amarilla (▲) y azul (◆), no presentaron actividad. El gradiente de elución fue NaCl de 0 a 0.4 N (—), en el mismo amortiguador de equilibrio.

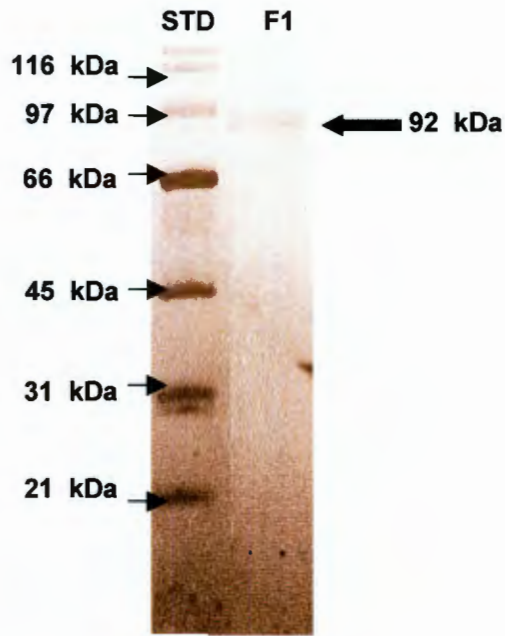


Fig. 6A. Análisis Electroforético de la Fracción Obtenida Mediante Intercambio Aniónico. La fracción F1 (-), obtenida mediante Q-Sepharosa se analizó en un gel de poliacrilamida al 12.5% con SDS, en condiciones no reductoras. La tinción del gel se realizó con plata. En el carril número 1 se encuentran los estándares de peso molecular (STD). En cada uno de los carriles se colocó la cantidad equivalente a 15 μ g de proteína.

La técnica de cromatografía de intercambio iónico es muy utilizada cuando se tienen moléculas de pesos moleculares muy parecidos, ya que en algunos casos a pesar de tener tamaños semejantes, su carga y distribución de las mismas es diferente (Rüdiger, 1988).

Algunas lectinas se han purificado mediante cromatografía de intercambio iónico, tal es el caso de la glucolactina de leche bovina (Ye y Ng, 1999). La leche es una mezcla muy compleja de proteínas y otras sustancias, por lo que en este artículo se optó por utilizar intercambio iónico.

Mediante el análisis electroforético de la fracción con actividad hemaglutinante, obtenida mediante cromatografía de intercambio aniónico se observó una sola banda. El factor de purificación en esta fracción fue de 1609 veces, con respecto al extracto crudo (Tabla 12).

Tabla 12. Tabla de Purificación de la Proteína (lectina) de Xoconostle Mediante Cromatografía de Intercambio Iónico.

MUESTRA	VOLUMEN (mL)	PROTEÍNA (mg/mL)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	AE (U/mg)	PURIFICACIÓN (veces)	RECUPERACIÓN (%)
	200.0	0.75	150.00	20	1	100.00
5	5.5	1.64	9.04	160	8	6.03
G100	14.0	0.13	1.76	2000	100	1.17
A	11.0	0.07	0.77	32100	1600	0.51

EC= Extracto Crudo; P65= Precipitado obtenido al 65% de saturación con sulfato de amonio;
 F1G100= Fracción 1 obtenida en Exclusión de Peso Molecular, Sephadex G-100 a partir del P65;
 F1IA= Fracción 1, obtenida mediante Cromatografía de Intercambio Aniónico, Q-Sepharosa.

9.3 CARACTERIZACIÓN PARCIAL

9.3.1 Termoestabilidad

La prueba de termoestabilidad es un parámetro empleado para determinar la naturaleza proteica de una molécula. 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 alteración 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. Después de someter las fracciones del extracto de xoconostle a la temperatura de 60°C, se observó que la actividad hemaglutinante en las fracciones se perdió, en comparación con 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), pero esta resistencia depende de su contenido en carbohidratos, que permite estabilizar a la molécula. Estos resultados sugieren que la inestabilidad al tratamiento térmico de la lectina de xoconostle, se debe a que probablemente tiene un bajo contenido de carbohidratos.

9.3.2 Afinidad a Azúcares

La principal característica de las lectinas es su actividad biológica: la capacidad que tienen para unirse a azúcares de forma específica. La prueba de inhibición de la actividad aglutinante, mediante diversos azúcares, es una prueba contundente acerca de la presencia de una molécula tipo lectina. El ensayo se realizó como se indica en Materiales y Métodos. Se probaron los siguientes azúcares: Glucosa, Manosa, Xilosa y Arabinosa, a una concentración inicial de 100 mM (**mM** = mili molar). Después de la incubación de 3 horas, a temperatura ambiente, se observó la misma actividad aglutinante en presencia de glucosa y manosa. Cuando las

fracciones se incubaron en presencia de Arabinosa se observó aglutinación en la tercera dilución, la concentración de Arabinosa en esta dilución corresponde a 25 mM. Este resultado sugiere que la lectina tiene una concentración mínima inhibitoria de 50 mM de Arabinosa, aproximadamente. Y para el caso de Xilosa, no hubo aglutinación, incluso a una concentración de 3.125 mM de Xilosa, lo que indica que este azúcar se une específicamente a la lectina contenida en semillas de xoconostle. Esta prueba brinda una evidencia muy fuerte que confirma el argumento de que la molécula responsable de la actividad aglutinante es una lectina.

10. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se purificó y se caracterizó de forma parcial las fracciones con actividad hemaglutinante presentes en semillas de xoconostle, el cual permitió llegar a las siguientes conclusiones.

- Se encontró, al menos, una lectina en las semillas del fruto de xoconostle, moléculas no descritas hasta el momento en dicha cactácea.
- Se confirmó la naturaleza de la lectina mediante pruebas de afinidad a carbohidratos, siendo afín a xilosa y en menor grado a arabinosa.
- La lectina presentó sensibilidad térmica a 60°C, aproximadamente.
- La lectina es estable en intervalos de pH neutro (6-8)
- De acuerdo a su elución en cromatografía de exclusión de peso molecular, se puede proponer que la lectina tiene un peso molecular superior a 100 kDa y esta formada, al menos, por dos subunidades.
- Los resultados de la purificación por cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel sugieren que es probable que no se trate de una sola lectina; posiblemente estén presentes al menos dos isoformas
- Se desarrollo un esquema posible de purificación para la lectina presente en las semillas de xoconostle, con una recuperación de 22,500 U/mg mediante cromatografía de exclusión de peso molecular y de 32,000 U/mg utilizando cromatografía de intercambio iónico.

11. PERSPECTIVAS

La presente investigación podría ser el inicio de una búsqueda más profunda acerca de la existencia, naturaleza y función de las lectinas en xoconostle u otras cactáceas. Futuros trabajos abordaran aspectos como:

- Caracterización bioquímica, cristalización y secuenciación
- Caracterización biológica, evaluando efectos en sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo*
- Mecanismo de acción, estructura-función
- Biosíntesis
- Función biológica dentro de la planta
- Su utilidad en técnicas de purificación para el estudio de otras moléculas

12. BIBLIOGRAFÍA

Ashwell, G., Harford, J. 1982: Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu. Rev. Biochem.* 51: 531-554.

Al-Bakir, A., Whitaker, J.R. 1978: Purification and characterization of invertase from dates (*Phoenix dactylifera* L., var. Zahdi). *J. Food Biochem.* 2: 133-160

Balzarini, J., Neyts, J., Schols, D., Hosoya, M., Van Damme, E.J.M., Pneumans, W.J., De Clercq, E. 1992: The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine) n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication *in vitro*. *Antiviral Res.* 18: 191-207.

Barondes, S.H. 1984: A new class of extracellular proteins. *Science* 223: 1259-1264.

Barre, A., Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Rougé, P. 1996: Structure-function relationship of monocot mannose-binding lectins. *Plant Physiol.* 112: 1531-1540.

Beachey, E.H. 1981: Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect.* 143: 325-345.

Benoff, S. H. 1996: Male contraceptives. Patente No. 5854254. Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica.

Bernheimer, A.W., Farkas, M.E. 1953: Hemagglutinins among higher fungi. *J. Immunol.* 70: 197-198.

Bettler, B., Marier, R., Ruegg, D., Hoffstetter, H. 1989: Binding site for IgE of the human lymphocyte low-affinity Fc ϵ receptor (Fc ϵ /CD23) is confined to the domain homologous with animal lectins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 7118-7122.

Bettler, B., Texido, G., Raggini, S., Rüegg, D., Hoffstetter, H. 1992: Immunoglobulin 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.

Boyd, W.C., Shapleigh, E. 1954: Science 119: 419

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. Biochim. Biophys. Acta 1202: 38-46.

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

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

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., Wheeler, 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.

Etzler, M.E. 1986: Distribution and function of plant lectins. In *The Lectins* (Liener, I.E., Sharon, N. Y Goldstein, I.J. eds.). Academic Press Orlando. pp.371-435.

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

Gabius, H. J. 1987: Endogenous lectins in tumors and the immune system. *Cancer Invest.* 5: 39-46.

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*. *Biochem.* 22: 5365-5269.

Gillot, J., Giollant, M., Damez, M., Dusser, M., 1991: Isolation and characterization of a lectin from the mushroom, *Lactarius deliciosus*. *Biochem.* 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 Norteamérica.

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. 2nd Edition. (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.

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

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., Eds. 1986: *The Lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine*. In: *Molecular Biology*. Academic Press, Inc. Orlando. 400p.

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

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 beta-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 sialoglycoprotein receptor after transfection with cDNAs encoding the receptor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 8863-8867.

Mo, H., Lin, Z., Sun, C. 1990: A new lectin from *Dolicho lablab* L. *Lectins-Biology, Clinical Biochemistry*, Sigma Chemical Company. St. Louis, Missouri. Vol. 7: 35-40.

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.
- Nowell, P. 1960: Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal leucocytes. *Cancer Res.* 20: 462-464.
- 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.
- 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.
- Pusztai, A. 1991: *Plant Lectins*. University Press. Cambridge. 200 p.
- 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. Pp. 24-34, 48-69, 82-114.

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 Norteamérica.

Rodríguez-Méndez, A.J., Salazar-Olivo, L.A. 1999: Caracterización de Aglutininas Presentes en Frutos de la Dieta Regional. Tesis. Universidad Autónoma de Querétaro, México. 32-44.

Rosen, S.D., Stoolman, L.M. 1987: Potential role of cell surface lectin in lymphocyte recirculation. In: Vertebrate Lectins. (Olden, K., and Parent, J.B., Eds.). Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 152-81.

Rüdiger, H. 1988: Preparation of Plant Lectins. In: Advances in Lectin Research, Volume 2 (Franz, H. Ed.) Springer-Verlag. Berlin, Germany. Pp. 26-70.

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.

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

Sharon, N., Lis, H. 1972: Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science 177: 949-959.

Sharon, N., Lis, H. 1989a: Lectins as cell recognition molecules. Science 246: 227-246.

Sharon, N., Lis, H. 1989b: Lectins. First Edition. Chapman and Hall. London. 127p.

Sharon, N., Lis, H. 1990: Legume lectins –a large family of homologous proteins. *FASEB J.* 4: 3198-3208.

Schalla, W.O., Rice, R.J., Biddle, J.W., Jeanlouis, Y., Larse, S.A., Whittington, W.L. 1985: Lectin characterization of gonococci from an outbreak caused by penicillin-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 22: 481-483.

Singh, P.C., Singh, R.K. 1996: Choosing an appropriate bioseparation technique. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 49-58.

Smith, E.E., Goldstein, I.J. 1967: Protein-carbohydrate interaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 121: 88-95.

Spiess, M. 1990: The sialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochem.* 29: 10008-10019.

Stillmark, H. 1888: Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus comm. L* und einigen anderen Euphorbiaceen. Thesis, Dorpat.

Taketa, K., Izumi, M., Ichikawa, E. 1983: Distinct molecular species of human α -fetoprotein due to differential affinities to lectins. *Ann. NY. Acad. Sci.* 417: 61-68.

Tatarintsev, A.V., Turgiev, A.S., Davidson, J.B. 1996: Contraceptive method using ajoene. Patente No. 5863954. Patentes de los Estados Unidos de Norteamerica.

Totterman, T.H., Andersson, L.C., Hayry, P. 1979. Evidence for thyroid antigen-reactive T lymphocytes infiltrating the thyroid gland in Grave's disease. *Clin. Endocrinol.* 11: 59-68.

Tsuda, M. 1979: Purification and characterization of a lectin from the mushroom, *Flammulina velutipes*. *J. Biochem.* 86: 1463-1468.

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

Villegas, M. 1995: El nopal como alimento tradicional mexicano. *Cuadernos de nutrición* 18: 14-17.

Wang, J.L., Laing, J.G., Anderson, R.L. 1991: Lectins in the cell nucleus. *Glycobiol.* 1: 243-252.

Wang, J.R., Stinson, M.W. 1994: Streptococcal M6 protein binds to fucose-containing glycoproteins on cultured human epithelial cells. *Infect. Immunol.* 62: 1268-1274.

Whitaker, J.R. 1994: *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. 2nd Edition. Marcel Dekker, New York. pp. 63-117.

Wouterlood, F.G., Groenewegen, H.J. 1991: The *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin tracing technique for the study of neuronal connections. *Prog. Histochem. Cytochem.* 22: 1-78.

Ye, X.Y., Ng, T.B. 1999: Purification and characterization of glycolactin, a novel glycoprotein from bovine milk. *Life Sciences* Vol. 66. No. 13: 1177-1186.

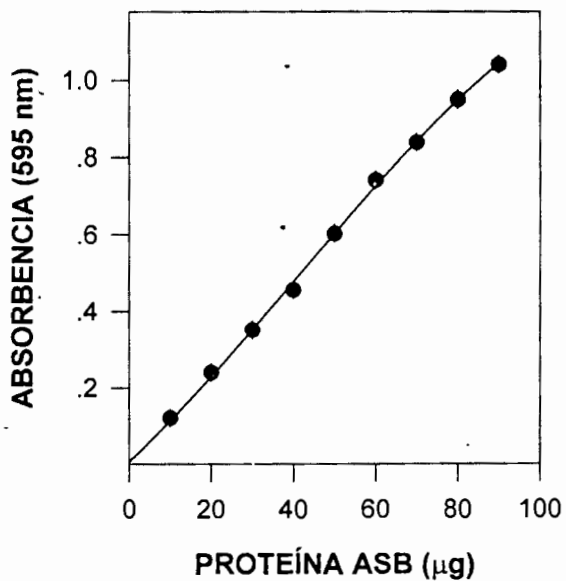
Yu, L., Fernig, D.G., Smith, J.A., Milton, J.D., Rhodes, J.M. 1993: Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin. *Cancer Res.* 53: 4627-4632.

APENDICE A

Valores de la Curva Estándar de Determinación de Proteínas por el Método de Bradford

PROTEÍNA ASB (μg) y	ABSORBENCIA $x \pm \sigma$
0	0 ± 0
10	0.12 ± 0.005
20	0.24 ± 0.010
30	0.35 ± 0.007
40	0.46 ± 0.006
50	0.60 ± 0.007
60	0.74 ± 0.010
70	0.84 ± 0.002
80	0.95 ± 0.008
90	1.04 ± 0.031

CURVA ESTANDAR DE DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS



$R = 0.999$

$b = 0.011$

$m = 0.012$