

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y
DESARROLLO, A. C.**

*PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PROPIEDADES
BIOACTIVAS DE LAS LECTINAS DE FRIJOL TEPARI, (Phaseolus
acutifolius, var. Latifolius).*

Por

María del Carmen Valadez Vega

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORADO EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA,

ENERO DEL 2004

APROBACION

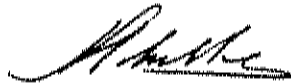
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de María del Carmen Valadez Vega, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



Dr. Gerardo Alvarez Manilla-Dubón



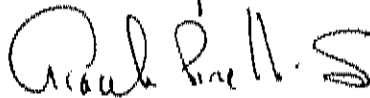
Dr. Alejandro Garcia Carranca



Dr. Fikrat Abdullaev



Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro



Dra. Araceli Pinelli Saavedra

DECLARACION INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (C.I.A.D.)

La Publicación de comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al C.I.A.D., previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis.

Dr. Alfonso A. Gardea Bejar
Director General

DEDICATORIA

Con gran amor :

A mi querido padre por su confianza y ayuda

A la memoria de mi querida madre quien me enseñó a luchar por mis sueños y quien me enseñó la fuerza y el valor que una mujer debe tener para salir adelante

A mis hermanas y hermanos quienes han creído en mí y me han dado su cariño, ayuda y consejos

A mis sobrinas y sobrinos por sus sonrisas y confianza

A mis amigos por su cariño y toda su ayuda

A todos aquellos quienes han confiado en mí

A Dios ya que sin él nada de esto sería posible

Persigue tus sueños pues ellos son el motor de nuestra vida

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Gerardo Alvarez Manilla Dubón, por darme la gran oportunidad de compartir conmigo sus conocimientos, por todos sus consejos, que han hecho que este trabajo sea concluido de manera satisfactoria, por darme las facilidades durante mi trabajo y sobre todo por darme la oportunidad de llegar a conseguir un objetivo mas en mi vida. Pero ante todo le agradezco la confianza y la amistad incondicional que me ha dado.

A los miembros de mi comité: Dr. Alejandro García Carrancá, Dr. Fikrat Abdullaev, Dra. Irasema Vargas Arispuro, Dra. Araceli Pinelli Saavedra por su ayuda y consejos durante la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Hidalgo, por la gran oportunidad de realizar otro sueño más en mi vida profesional.

Al CIAD por el apoyo proporcionado durante mi estancia.

A la Coordinación de Ciencia de los Alimentos por su ayuda durante el tiempo que estuve con ellos, así como al personal que en él labora que me ayudaron en la realización de mi trabajo.

Especial agradecimiento al Q. B. Francisco Javier Soto Córdova y a la M. en C. Ana María Guzmán Partida por todo su apoyo y ayuda en la realización de mi trabajo y sobre todo por su invaluable amistad.

Al Doctor Alejandro García Carrancá por toda su ayuda y consejos.

Al M. en C. Enrique Pérez Cárdenas del INCAN por toda su ayuda.

A la M. en C. Miriam Guido Jiménez del INCAN por sus consejos.

Al INCAN por las facilidades prestadas en la realización de los estudios biológicos de este trabajo.

Al Dr. Fikrat Abdullaev del INP-México, por toda su ayuda en el análisis de datos y sus valioso consejos.

A la M. en C. Leticia Riberón Negrete por sus consejos

Con mucho cariño agradezco a Gisela, Lulú, Carlos por su apoyo invaluable.

A los compañeros del CIAD que me hicieron pasar una buena época en mi vida.

A mis queridas amigas de Ensenada, y es especial a Gaby, Lili, Conchita por su valiosa amistad y por todo apoyo (en verdad son grandiosas).

A César quien en todo momento a estado a mi lado, apoyándome en cada logro, así como en cada caída que he tenido, aconsejándome y dándome siempre una palabra inteligente para salir adelante.

A mis amigos y amigas que aunque a la distancia su apoyo ha sido incondicional.

En especial a mi familia quien en cada paso de mi vida ha estado apoyándome y confiando en mi.

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS

INDICE DE FIGURAS

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	7
<u>Lectinas Vegetales: Características, Diversidad, Estructura</u>	7
<u>Efecto de Lectinas Vegetales Sobre Células Malignas</u>	11
Lectinas de Concanavalina A (Con A)	14
Lectina de Lenteja (LL)	15
Lectina de Ricino (LR)	16
Lectina de Germen de Trigo (LGT)	16
Lectina de Dolichos biflorus (DBA)	18
Lectina de Cacahuete (LC)	20
Lectina de Soya (LS)	22
Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA)	24
<u>Características del Frijol Tépari</u>	27
OBJETIVOS	30
<u>Objetivo General</u>	30
<u>Objetivos Específicos</u>	30
MATERIALES Y METODOS	31
<u>Materiales</u>	31

<u>Métodos</u>	31
Purificación de Lectinas	31
<u>Extracción y purificación de lectina</u>	31
<u>Preparación de columna de afinidad Mini-Leak- fetuina</u>	34
<u>Electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)</u>	35
Caracterización Bioquímica de la Lectina de Frijol Tépari	35
<u>Determinación de peso molecular</u>	35
<u>Determinación de punto isoelectrico</u>	37
<u>Electroforesis en dos dimensiones</u>	38
<u>Composición de aminoácidos</u>	38
<u>Contenido de carbohidratos totales</u>	40
<u>Determinación de metales</u>	40
<u>Secuenciación de fragmentos tripticos de lectina</u>	41
Propiedades Bioactivas de la Lectina de Frijol Tépari	41
<u>Actividad hemaglutinante de lectina</u>	41
Preparación de eritrocitos	41
Prueba de hemaglutinación	42
<u>Estudio de inhibición de la hemaglutinación</u>	42
<u>Cromatografía de afinidad</u>	44
Acoplamiento de lectina	44
Cromatografía de afinidad	45
Análisis composicional de carbohidratos	46
<u>Estudio <i>In vitro</i> sobre el efecto mitogénico de lectinas en linfocitos</u>	46

humanos.

Determinación de proliferación celular mediante la técnica de timidina tritiada ($[^3\text{H}]$ timidina)	48
Estudios Biológicos: Estudios <i>In vitro</i> Sobre el Efecto de Lectinas de Frijol Tépari en Células Malignas	49
<u>Estudio de viabilidad celular</u>	49
<u>Cultivo de células</u>	50
<u>Determinación de viabilidad celular</u>	51
<u>Estudios de proliferación y de post-incubación celular</u>	52
Análisis Estadístico de Datos	55
RESULTADOS	56
<u>Purificación de Lectinas</u>	56
<u>Caracterización Bioquímica de la Lectina de Frijol Tépari</u>	59
Estimación de Peso Molecular	59
Determinación de Punto Isoeléctrico (PI) y Electroforesis de Dos Dimensiones	64
Composición de Aminoácidos	64
Contenido de Carbohidratos	67
Contenido de Metales	67
Secuenciación de Fragmentos Tripticos de Lectina	67
<u>Propiedades Bioactivas de la Lectina del Frijol Tépari</u>	69

Actividad Hemaglutinante	69
Inhibición de la Actividad Hemaglutinante	71
Afinidad de la Lectina Hacia Glicopéptidos	71
Actividad Mitogénica	75
<u>Estudios Biológicos; Estudios In vitro sobre el Efecto de Lectinas de</u>	78
<u>Frijol Tépari en Células Malignas</u>	
Estudios de Viabilidad Celular	78
Efecto de Lectinas sobre la Proliferación Celular y Efecto Post-	80
Incubatorio de Lectinas en Células Malignas.	
Efecto de lectinas sobre la proliferación celular determinada mediante	83
la técnica de MTT.	
Efecto post-incubatorio con lectinas sobre la proliferación celular	86
determinada mediante la técnica de MTT	
Efecto de lectinas sobre la proliferación de células malignas	90
empleando la técnica de timidina tritiada	
Efecto post-incubatorio con lectinas sobre la proliferación de células	96
malignas	
DISCUSIONES	101
CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFIA	103

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Líneas Celulares Malignas Humanas Empleadas en los Estudios Biológicos	33
Tabla 2	Purificación de Lectinas de Frijol Tépari (<i>Phaseolus acutifolius</i>)	58
Tabla 3	Composición de Aminoácidos de Lectina de Frijol Tépari	66
Tabla 4	Concentración de Metales en Lectina de <i>Phaseolus acutifolius</i>	68
Tabla 5	Actividad Hemaglutinante de Lectina Purificada de <i>Phaseolus acutifolius</i>	70
Tabla 6	Efecto de Carbohidratos sobre la Inhibición de la Hemaglutinación de Lectina	72
Tabla 7	Composición de Carbohidratos de Glicopéptidos con Afinidad hacia Lectina de <i>Phaseolus acutifolius</i>	76
Tabla 8	Dosis Inhibitoria 50 (DI ₅₀) Calculadas para 13 Líneas Celulares Malignas	81
Tabla 9	Efecto de Lectinas de Frijol Tépari sobre la Proliferación Celular Determinado por la Técnica de MTT	84
Tabla 10	Efecto de Lectinas de Frijol Tépari sobre la Proliferación Celular Determinado por la Técnica de Timídina Tritilada	93

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Patrón Cromatográfico de Lectina de Frijol Tépari en 57
Columna de Afinidad con Matriz de Fetuina Inmovilizada en
una Matriz de Agarosa (Minileak). La Flecha Vertical indica
cuando la Columna fue Eluída con una Solución ácida de
Glicina (50 mM, pH 2.5)
- Figura 2 Perfil de Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS en 60
Condiciones Desnaturalizantes y Reductoras de Lectina de
Frijol Tépari. A.- Marcadores de Peso Molecular, B.- Extracto
Proteico de Frijol, C.- Lectina Pura de Frijol Tépari
- Figura 3 Patrón de Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en 61
Condiciones Nativas. A.- Marcadores de Peso Molecular, B.-
Lectina Pura de Frijol Tépari
- Figura 4 Cromatografía de Exclusión en Gel de la lectina de Frijol 63
Tépari Purificada. La Línea Sólida Corresponde a la Muestra
Eludía con la Solución de Baja Fuerza Iónica (MES 25 mM,
pH 6.0). La Línea Punteada Corresponde a la Lectina Eludía
con una Solución de Alta Fuerza Iónica (MES 25 mM, NaCl
1M, pH 6.0). ▲ Marcadores de Peso Molecular (440, 232, 66,
44 kDa)
- Figura 5 Separación de la Lectina de Frijol Tépari en Electroforesis de 65
Isoelectroenfoque y Electroforesis de dos Dimensiones. (A)
Patrón Densitométrico del Punto Isoeléctrico de la Lectina de

Frijol Tépari (B) Electroforesis de dos Dimensiones donde Dimensión Horizontal Corresponde al Isoelectroenfoque y la Vertical a la Separación de Peso Molecular (SDS-PAGE). Las tres Principales Especies (pl 4.2, 4.4, 4.5) se Identifican con las Letras a, b, y c.

Figura 6	Cromatografía de Glicopéptidos de Tiroglobulina separados en una Columna de Lectina de Frijol Tépari Inmovilizada en una Matriz de Fractogel-Azilactona. Las Fracciones 1, 2, y 3 (indicada en la figura) Fueron Colectadas por Separado y Analizados para Analizar su Composición de Monosacáridos (ver Tabla 3)	74
Figura 7	Efecto Mitogénico de Lectinas sobre Linfocitos Humanos.	77
Figura 8	Efecto de las Lectinas de Frijol Tépari sobre la Viabilidad de Células Malignas. A) Caski, B) Mda, C) Sw13, D) 293, E)T24, F) HeLa	82
Figura 9	Efecto de Lectinas de Frijol Tépari sobre la Proliferación de Células Malignas Determinado por la Técnica de MTT.	86
Figura 10	Efecto de Lectinas de Frijol Tépari sobre la Proliferación de Células Malignas Después de 24 h de Incubación Determinado por la Técnica de MTT.	87
Figura 11	Efecto Post-Incubatorios de Células Malignas con Lectina de Frijol Tépari. A. Sknsh, B. Sw480, C. MCF-7, D. C33-A	91
Figura 12	Efecto de lectina de Frijol Tépari sobre la Proliferación de	94

Células Malignas, Determinado por la Técnica de [³H]
Timidina.

Figura 13 Efecto de Lectinas de Frijol Tépari sobre la Proliferación de 95
Células Malignas Después de 24 h de Incubación.

Determinado por la Técnica de [³H] Timidina.

Figura 14 Efecto post-incubatorio de Lectinas de Frijol Tépari sobre 100
Células Malignas. A. Sknsh, B. Sw480, C. MCF-7, D. C33-A

RESUMEN

El frijol es un alimento importante en la alimentación, aportando proteínas, vitaminas, minerales y carbohidratos a la alimentación de los seres humanos. Se conoce que el frijol presenta un contenido relevante de proteínas, siendo estas un aporte considerable en la nutrición. Dentro de las proteínas del frijol se encuentran las lectinas, las cuales son proteínas que se unen a carbohidratos con alta especificidad y que en muchas especies de leguminosas, poseen propiedades hemaglutinantes y mitogénicas, a las cuales se les han atribuido diversos efectos adversos para la salud de animales y seres humanos.

A pesar de que muchos grupos de Investigación se han dado a la tarea de estudiar a las lectinas aun queda mucho por hacer, ya que cada día se siguen encontrando nuevas fuentes de obtención de estas proteínas, así como nuevos usos para ellas. En las últimas décadas las lectinas han tornado gran importancia en diversas áreas de la ciencia, entre ellas en el área de la clínica en donde se les ha empleado de manera satisfactoria en la tipificación de grupo sanguíneo, presentando un gran potencial para ser empleadas como biomarcador en algunos tipos de cáncer, además de poder ser usadas como posible herramienta en la terapia de ciertas neoplasias. Esto ha hecho que día a día se tome mayor atención hacia el estudio de estas proteínas, con la finalidad de conocer sus características bioquímicas así como sus propiedades bioactivas.

El objetivo del presente estudio fue la caracterización de las lectinas de frijol tepari, tanto en sus propiedades bioquímicas como en sus propiedades bioactivas.

propiedades bioactivas. Para el trabajo se emplearon lectinas de frijol tepal (Phaseolus acutifolius) las cuales fueron extraídas y purificadas mediante cromatografía de afinidad empleando una columna de fetulina inmovilizada en agarosa. Se observó que la lectina purificada era una mezcla de al menos tres diferentes isoformas cuyo peso molecular oscilaban en el rango de 123 a 153 Kda, con puntos Isoeléctricos entre 4.2 y 4.5. Se determinó que la lectina es una glicoproteína tetramérica con mayores niveles de glicina, leucina y metionina, además de observarse que esta proteína es una metaloproteína con iones de calcio, cobre y zinc, principalmente. Por otro lado, la secuenciación de fragmentos tripticos mostraron que dichos fragmentos presentan secuencias correspondientes a una misma proteína, los cuales previamente ya habían sido reportados por otros autores.

Así mismo se estudiaron sus propiedades bioactivas tales como: Capacidad hemaglutinante (actividad específica) observándose que presenta una alta actividad hemaglutinante; con una mayor afinidad hacia glicoproteínas tales como la fetulina, fibrinógeno y tiroglobulina y que los oligosacáridos presentes en la tiroglobulina a los cuales son afines la lectina presentan en su estructura residuos de fucosa, manosa, galactosa y N-acetilglucosamina. Por otro lado, presenta una menor actividad mitogénica que PHA, pero mayor que la concanavalina A.

Se estudió el efecto citotóxico de las lectinas sobre 13 líneas celulares malignas, determinando una menor dosis Inhibitoria 50 (DI₅₀) para las líneas celulares MCF-7, T-24 y 293, mientras que las líneas MOA, H1p-G2 y C33-A presentaron mayor resistencia hacia el efecto de las lectinas. El efecto de las

lectinas sobre la proliferación de cuatro líneas de células malignas (Skns1, Sw480, MCF-7 y C33-A), mostró que la lectina (fa tépari) tiene un mayor efecto inhibitorio en la proliferación celular sobre la línea Sw480, mientras que en las líneas Skns1, MCF-7 y C33-A no mostraron efecto marcado. Los estudios de post-incubación presentaron variaciones dependiendo de la técnica empleada para la determinación, ya que en la línea Skns1, mediante la técnica de MTT, se observó una recuperación de las células, mientras que la técnica de timidina trillada, mostró que las células no son capaces de recuperarse e incluso disminuir su tasa de proliferación: en las células MCF-7 ambas técnicas mostraron una recuperación en la proliferación celular, las células Sw480 mostraron una continua inhibición en la proliferación, mientras que en las células C33-A se observó una mayor recuperación mediante la técnica de MTT,

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron información valiosa en cuanto a las características fisicoquímicas y bioquímicas de la lectina de frijol tépari, además de aportar información sobre la capacidad citotóxica de la lectina sobre células malignas.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas alimentarios en nuestro país, es la deficiencia de alimentos que provean al consumidor de una fuente rica en proteínas de buena calidad. La deficiencia de alimentos ricos en proteínas y carbohidratos para la población mundial es una de las causas del aumento en ciertas enfermedades, viéndose afectada principalmente la población infantil (Pimentel y col, 1975). Las leguminosas, así como otras fuentes vegetales, constituyen una fuente importante en el ámbito nutricional tanto en nuestro país como en muchos otros.

El frijol forma parte en la alimentación diaria y desde el punto de vista nutricional es una fuente de proteínas, vitaminas, minerales y carbohidratos. En el mercado nacional existe una gran diversidad de variedades de frijol, las cuales difieren de sus características, tales como color, tamaño, forma y tiempo de cocción. Los cambios físicos y químicos que sufre el grano tienen una influencia determinante sobre la calidad, estos cambios se traducen en la aceptación del producto por el consumidor en función de la uniformidad del grano, tamaño de la semilla, ausencia de fisuras, tiempo de cocción, así como sabor y textura después del cocimiento.

En cuanto a la composición química del frijol común, se ha observado que éste presenta un contenido de proteína en promedio entre el 23 y 33% (Sgarbieri y Galeazzi, 1990; Durigan y col.1987). Entre las principales proteínas del frijol se encuentran las globulinas, albúminas, glutelinas,

faseolíinas y prolaminas (González-Flores, 1990); en cuanto al contenido de lípidos se ha encontrado que éstos varían del 1 al 3%, mientras que el contenido de carbohidratos totales se ha encontrado entre el 57-67%. Así mismo el frijol posee algunos minerales como calcio, fósforo, magnesio, hierro y zinc, aportando una considerable cantidad de éstos a la dieta humana (Taggart y col, 1983). La composición química del frijol puede variar dependiendo de varios aspectos, tales como la especie, origen, localización, clima, estación del año y el tipo de suelo (Valenzuela, 1988).

Entre los factores que influyen primordialmente en la calidad del frijol se encuentra su patrón de aminoácidos y el grado de digestibilidad de sus proteínas, lo cual depende de factores como la estructura proteica y la presencia de compuestos antifisiológicos (Sathe y col, 1984), tales como inhibidores de tripsina, lectinas, polifenoles, fitatos, oxalatos, inhibidores de amilasa e inhibidores de proteasas. Estos factores antifisiológicos, en particular las lectinas, han recibido mucha atención en los últimos años, no solo por sus características toxicológicas hacia el consumidor, sino también por las posibilidades de uso en otras áreas de la ciencia y la tecnología.

Desde hace algunas décadas se ha incrementado el interés por el estudio de nuevos métodos de tratamiento, diagnóstico y prevención para las diversas afecciones que sufre el ser humano, entre ellos el cáncer. Dentro de algunos de los estudios que se han realizado en el cáncer se encuentran aquéllos en los cuales se emplean productos de origen natural, tales como las lectinas, las cuáles han sido empleadas en diversos estudios con el fin de buscar alternativas de uso para estas proteínas en diversos

tipos de cáncer, promoviendo citotoxicidad de células transformadas, diagnóstico de ciertos tipos de cáncer, así como en la inhibición de la proliferación celular, entre otros.

En el presente trabajo se realizó la caracterización integral de las lectinas del frijol tépari. Esta caracterización incluye tanto la determinación de parámetros bioquímicos como la afinidad por carbohidratos. Así mismo también se estudió el efecto citotóxico de las lectinas en células malignas, con el objeto de encontrar posibles usos de las lectinas de frijol tépari en el diagnóstico y terapia de ciertas enfermedades.

ANTECEDENTES

Lectinas Vegetales: Características, Diversidad, Estructura

Las lectinas son proteínas que se caracterizan por su habilidad de unirse a carbohidratos, son de origen no inmune y además con la capacidad de aglutinar células, precipitar polisacáridos y glicoproteínas (Goldstein y col, 1980; Sharon y Lis, 1972). El concepto de lectinas como una clase de proteínas o glicoproteínas con sitios de unión hacia carbohidratos es relativamente nuevo; sin embargo la existencia de las lectinas en materiales biológicos, especialmente en las semillas de plantas se conoce desde hace varias décadas (Kocourek, 1986).

Las lectinas han sido detectadas en cientos de especies de plantas, siendo las semillas maduras las fuentes más ricas en estas proteínas, en donde pueden constituir hasta el 10% de la proteína total de la semilla, localizándose en los cotiledones contenidos en organelos conocidos como cuerpos proteicos (Sharon y Lis, 1989; Sharon y Lis, 1990).

Las lectinas son moléculas polivalentes, cada una de ellas tiene por lo menos dos sitios de unión hacia azúcares en cada subunidad (Liener, y col, 1986), permitiendo formar entrecruzamientos entre las células o entre otras macromoléculas que contengan azúcares. Las lectinas representan una clase heterogénea de proteínas o glicoproteínas, las cuales poseen diferentes actividades biológicas tales como hemaglutinación, transformación

de linfocitos, además de presentar efectos tóxicos sobre células de vertebrados (Vierbuchen, 1991).

Estas proteínas varían en tamaño molecular, composición de aminoácidos, requerimientos metálicos y estructura tridimensional. En cuanto a la diversidad estructural, las lectinas son similares a las enzimas, pero carecen de actividad catalítica (Hankins y Shannon, 1978), de hecho basándose en esta variación, pueden ser agrupadas en familias de proteínas estructuralmente homólogas. Muchos estudios han demostrado que la mayoría de las lectinas presentes en leguminosas son glicoproteínas conteniendo hasta un 10% de carbohidratos. Se ha encontrado que algunas de las lectinas de leguminosas contienen Ca^{+2} y Mn^{+2} los cuales parecen ser esenciales para su actividad biológica. Un ejemplo típico es el de la concanavalina A, la cual requiere de estos iones para que puedan ejercer su actividad biológica (Liener y col, 1986; Sharon y Lis, 1990; Drickamer y Taylor, 1993).

Debido a las múltiples fuentes de obtención de las lectinas (plantas, animales, bacterias, virus, etc.), éstas se han clasificado con base en su especificidad por unir carbohidratos, usualmente con estructura D-piranosas. Estos grupos son: Las lectinas que unen manosa/glucosa, las lectinas que unen N-acetilgalactosamina/galactosa, las lectinas que unen N-acetilglucosamina, las lectinas que unen fucosa y lectinas que unen ácido siálico (Goldstein y Poretz, 1986). Esta clasificación en muchos casos se ha basado en función a los monosacáridos que funcionan como inhibidores de

la aglutinación de eritrocitos (Sharon y Lis, 1989; Laitinen y col, 1990; Nakanishi y col, 1993).

En organismos vegetales, la función biológica de las lectinas ha sido debatida por muchos años y se han formulado varias hipótesis. A pesar de esto, dicha función no se conoce con certeza, sin embargo, entre las funciones que se le han atribuido a las lectinas en plantas se encuentran: Transporte, almacenamiento e inmovilización de carbohidratos; anticuerpo para contrarrestar a bacterias del suelo; mecanismo de defensa contra patógenos; protección contra el ataque de insectos; sitio de unión y reconocimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* a las raíces de las leguminosas; posible función en la maduración y germinación de semillas; así como posible función durante la acumulación de las demás proteínas de reserva en la semilla (Etzler, 1986; Van Driessche, 1988; Peumans y Taylor, 1995a; Peumans y van Damme, 1995b).

Existen muchas razones para el incremento en el estudio de las lectinas; entre ellas se encuentra su utilidad en la detección y estudio de carbohidratos en solución y sobre la superficie celular; además las investigaciones sobre la interacción de lectinas con carbohidratos proveen información de los detalles moleculares de la reacción entre proteínas y carbohidratos, así como entre células (Kik y col, 1989; Leuven y col, 1993; Bourne y col, 1994). La interacción de las lectinas con biopolímeros, puede ser tomada como una evidencia de que estos contienen carbohidratos. Así mismo la interacción con lectinas es ampliamente usada para demostrar la

existencia de receptores en la membrana celular y organelos celulares, hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores y toxinas, los cuales frecuentemente también son glicoconjugados (Eckhardt y col, 1982; Walker, 1989; Rindele y col, 1989).

La interacción de las lectinas con las células depende de algunos factores, tales como las características moleculares de las lectinas, las propiedades de la superficie celular, el estado metabólico de las células, la concentración celular, concentración de las lectinas, la temperatura, el pH, el tiempo de exposición (Van Driessche, 1988).

Las propiedades hemaglutinantes de las lectinas, hacen sencilla su detección, facilitando considerablemente la purificación de una gran cantidad de ellas. Esta capacidad hemaglutinante es inhibida por ciertos carbohidratos, desde monosacáridos hasta polisacáridos o glicoconjugados, dependiendo del tipo de lectina (Rini, 1995b); Sin embargo, casi siempre, las lectinas presentan mayor afinidad por carbohidratos con estructuras más complejas que aquellos con estructuras simples (monosacáridos y disacáridos). Estas estructuras complejas en pocos casos han sido caracterizadas, permaneciendo desconocidas para muchas lectinas (Cummings y Kornfeld, 1982). Por esto, el estudio de la interacción lectina-carbohidrato, así como elucidación de las estructuras de los carbohidratos implicados en la interacción es de gran importancia, ya que tiene aplicaciones en diversos campos de la ciencia (Sharon, 1975; Watkins, 1980; Lis y Sharon, 1986; Sharon y Lis, 1989).

Algunos ejemplos relacionados con la aplicación de las lectinas son: La caracterización de diversos grupos sanguíneos humanos; su uso como matriz para el aislamiento, purificación y caracterización de glicoproteínas y glicopéptidos también se han empleado como sondas para detección de oligosacáridos específicos *in situ* (Anesi y col, 1994; Matsubara y col, 1994; Sarker y col, 1994); en caracterizaciones histológicas, histoquímicas e inmunológicas (Li y col, 1993); en la tipificación de células y bacterias, en el fraccionamiento de linfocitos y células de médula ósea (Sharon y Lis, 1990; Alvarez-Fernandez y col, 1990; Barral-Netto y col, 1992; Nakanishi y col, 1993); También han sido empleadas para la estimulación de linfocitos y para el análisis de cromosomas en citogenética humana (Sharon y Lis, 1989). Varias lectinas se han utilizado para estudiar los cambios que ocurren en la superficie celular durante los procesos fisiológicos y patológicos tales como la diferenciación celular y como marcadores para el diagnóstico de cáncer (Shoham y col, 1970; Cummings y Kornfeld, 1982; Lotan y col, 1991; Kim y Clifton, 1993; Endo, 1996; Rak y Miller, 1993; Sarker y col, 1994; Mody y col, 1995).

Efecto de Lectinas Vegetales Sobre Células Malignas

Debido a la unión que presentan con los carbohidratos, las lectinas representan una herramienta valiosa en investigaciones biológicas y médicas; en áreas tan diversas como la separación, y caracterización de glicoproteínas, glicopéptidos y glicolípidos, en estudios de seguimiento de los cambios que se presentan en la superficie celular durante los procesos

fisiológicos y patológicos, desde la diferenciación celular hasta el cáncer (Shoham y col, 1970; Lotan y col, 1991; Kim y Clifton, 1993). También se utilizan en estudios de histoquímica de células y tejidos, en estudios de diferenciación de células, en tipificación de células y bacterias, en el fraccionamiento de linfocitos y células de médula ósea, así como en el trasplante de médula ósea (Sharon y Lis, 1990; Alvarez-Fernandez y col, 1993; Barral-Neto y col, 1992; Nakanishi y col, 1993). También se han empleado para la estimulación de linfocitos, en el mejoramiento del sistema inmune, para el análisis de cromosomas en citogenética humana (Sharon y Lis, 1989).

Gracias a la disponibilidad de hoy en día de las lectinas, se ha hecho posible detectar residuos específicos de azúcares y secuencias de carbohidratos, así como obtener mayor información sobre la localización y estructura de glicoconjugados específicos. Esto ha permitido que las lectinas sean cada vez mayormente empleadas en investigaciones citológicas para conocer más sobre la estructura de la membrana, los procesos intracelulares de glicosilación proteínica y los posibles cambios que ocurren en los glicoconjugados durante la diferenciación, crecimiento y desarrollo celular.

Debido a que algunas de las modificaciones en los glicoconjugados extracelulares están a menudo asociados con procesos patológicos, se han realizado numerosos esfuerzos en investigar el potencial de las lectinas como un compuesto de diagnóstico en procesos clínicos, y su posibilidad de ser utilizadas como un instrumento que permita elucidar mecanismos de transformación celular (Sharon y Lis, 1989).

Las lectinas han sido particularmente útiles en el estudio de las modificaciones que sufren las células durante el proceso de carcinogénesis. Entre éstos, se encuentran los cambios en el contenido de glicolípidos y glicoproteínas en la membrana celular, o en organelos celulares o bien en ciertos tejidos dependiendo de la estructura de los carbohidratos presentes en sus células. Las alteraciones neoplásicas que presentan las células están asociadas con alteraciones de la membrana celular, particularmente en la composición de carbohidratos. Estos cambios influyen ampliamente en las características de las células neoplásicas, tales como adhesión, invasibilidad, expresión de antígenos, inhibición de supervisión inmunológica, entre otras (Hohenberger y col, 1990).

Como resultado de los estudios mencionados anteriormente, las lectinas son cada vez más empleadas hoy en día en la clínica y así mismo, están comenzando a ser utilizadas en la práctica médica para detectar los cambios durante la diferenciación celular que se llevan a cabo durante algunos procesos carcinogénicos y para desarrollar tecnologías para el diagnóstico de algunos tipos de cáncer.

En años recientes se han realizado numerosos estudios sobre los patrones de unión de las lectinas hacia las células malignas en contraste con lo que sucede en las células normales. Estas investigaciones han contribuido al conocimiento de los cambios estructurales que se presentan en los carbohidratos de la superficie celular y que se suscitan durante la transformación celular, así como los cambios que ocurren durante los procesos de metástasis.

Las investigaciones han aumentado la posibilidad de que los receptores de las lectinas puedan ser utilizadas como marcadores discriminatorios de células y tejidos neoplásicos (Damjanov, 1987; Tsubura y col, 1991; Soutter y col, 1993), sin embargo a pesar de los avances que se han tenido con relación a las lectinas y la unión de éstas con células malignas, su aplicación en el área de la clínica continúa siendo muy limitado, principalmente debido a la gran heterogeneidad celular de las neoplasias y tumores, lo cual implica que existan grandes variaciones en los patrones de interacción lectina-célula sin embargo, dada la cada vez mayor disponibilidad de lectinas, que reconocen una variedad cada vez mayor de estructuras, con el desarrollo de metodologías analíticas moleculares mas sensibles y rápidas (de alto flujo), será posible desarrollar tecnologías analíticas exitosas para la detección temprana de varios tipos de tumores.

Diversas lectinas obtenidas de fuentes vegetales han sido estudiadas y muchas de ellas analizadas con el fin de probar su posible actividad antitumorigénica, así como actividad anticarcinogénica. *In vitro* e *In vivo*, las lectinas vegetales han mostrado actividad inhibitoria sobre diferentes células malignas.

Lectina de Concanavalina A (Con A).

Una de las lectinas mas estudiadas es la concanavalina A (Con A), la cual es purificada de la *Canavalian ensiformis*, posee alta afinidad hacia estructuras oligosacáridas altas en manosa. Esta lectina ha mostrado interactuar con carcinomas sólidos y foliculares de medula tiroidea, además de presentar

una típica fluorescencia citoplásmica granular (Sobrinho-Simoes y col, 1990; Damjanou y Sobrinho-Simoes, 1991). En adenoma de glándula pituitaria se observa que la Con A se unía de manera diferente que al de células normales, además de mostrar una correlación en la unión de Con A y acromegalia (Behncken y Saeger, 1991).

En células cancerosas de páncreas humano, se ha observado que Con A reacciona únicamente con el citoplasma supranuclear de las células, y por otro lado, estudios de microscopía electrónica mostraron que la lectina reacciona a nivel del aparato de Golgi y gránulos secretorios (Nishimura y col, 1993). En cáncer colorectal se ha observado que la lectina se une a extractos de estas células, lo cual inhibe la inducción de proliferación celular en linfocitos (Ashabtaí y col, 2002). Estudios para la determinación de antígeno carcinoembriológico (CEA) en saliva, extracto de hígado e íleo, empleando Con A, reportaron que el 71% de CEA en saliva e hígado cirrótico, se une fuertemente con la Con A, mientras que en hígado con hepatoma metastático y en íleo solamente el 30 y el 34% de CEA se unió fuertemente a la lectina (Bychkov y col, 1992).

Lectina de Lenteja (LL).

La lectina de lenteja (*Lens culinaris*), es una lectina que reacciona con sacáridos simples, tales como glucósidos y manósidos. Esta lectina ha mostrado unirse a ciertos carbohidratos de la membrana de células normales de la mucosa oral, mientras que en leucoplaquia bucal esa unión se ve disminuida considerablemente (May y Sloan, 1991). Se ha observado que

esta lectina actúa como un útil biomarcador en el diagnóstico de carcinoma hepatocelular (Song y col, 2002).

Lenteja de Ricino (LR).

Las lectinas de ricino, obtenidas de semillas de *Ricinus communis* que reconocen estructuras terminadas en galactosa beta, han mostrado inhibir el desarrollo de carcinomas ascíticos (Lin y col, 1970). En tejidos de carcinoma medular tiroideo sólido y folicular, se observó que esta lectina reacciona con algunos de estos tejidos (Sobrinho-Simoes y col, 1990). En casos de hígado metastásico y cáncer colorectal esta lectina no mostró un patrón constante de unión, mientras que en el caso de tumores primarios si se observó un patrón de unión más constante y uniforme, sin observar unión de la lectina con tejidos normales (Hohenberger y col, 1990).

En estudios *in vivo* en tumores ascíticos producidos por células cancerosas de páncreas (HuP-T3, HuP-T4) se observó que la lectina de ricino se une a nivel de la superficie luminal y a nivel del citoplasma supranuclear de las células, así como a nivel de las microvellosidades, plasmalema apical, gránulos secretorios, aparato de Golgi y plasmalema basolateral de las células (Nishimura y col, 1993).

Lectina de Germen de Trigo (LGT).

La lectina de germen de trigo (LGT) es una lectina extraída de las semillas de *Triticum vulgare*, presenta afinidad hacia glicanos con alto contenido de β -Nacetylglucosamina. Se ha probado el efecto de esta lectina en carcinoma

de vejiga humana mostrando una menor unión en la membrana y citoplasma de células de tumores invasivos en comparación con tumores no invasivos, por otro lado, se observó que la unión de la lectina se perdió gradualmente al aumentar el grado de atipia de las células (Langkilde y col, 1989).

La LGT ha mostrado efecto inhibitorio considerable sobre la proliferación de algunas líneas celulares de mama malignas, tales como MCF-7, T47D, HBL100 y BT20 (Valentiner y col, 2003), así mismo se ha observado un amplio patrón de unión hacia células de leucemia causando un efecto citotóxico en ellas, así como en linfocitos normales (Ohba y Bakalova, 2003). Isolectinas I, II, III de germen de trigo presentan efecto citotóxico sobre líneas celulares de linfocitos normales y cancerosas, reaccionando dichas isolectinas de manera similar linfocitos normales, mientras que en las células cancerosas el grado de unión fue mayor para LGT-III que para LGT-I (Izyckay Jablonska, 2002).

En carcinoma embrional humano, la LGT ha mostrado reaccionar positivamente (Malmi y Söderström, 1991), mientras que en carcinoma embrional tiroideo, la LGT reaccionó con especificidad en la membrana y en el citoplasma del aparato de Golgi de células epiteliales (Sobrinho-Simoes y col, 1990), así mismo esta lectina presenta afinidad hacia residuos de carbohidratos presentes en el citoplasma supranuclear, micro vellocidades, plasmalema apical, aparato de Golgi, gránulos secretorios y plasmalema basolateral de líneas celulares de cáncer pancreático (HuP-T3, HuP-T4) (Nishimura y col, 1993). En suero sanguíneo de pacientes normales y con cáncer se han observado diferencias en los patrones de unión de la lectina y

los glicoconjugados presentes en el suero (Shengle y col, 1990), reportándose que esta lectina se une a células de la mucosa oral normal, y ha mostrado unión hacia células superficiales de carcinoma de células escamosas de la mucosa oral en labios de tumores primarios (Meier y col, 2001).

En tumores de células de Sertoli-Leydig, la LGT ha mostrado unirse a algunas células tumorales, pero debido a que se une tanto a tumores del estroma como a células epiteliales esta lectina no puede ser empleada para la diferenciación de estos dos tipos de neoplasias (Bychkov y col, 1992). En células de timo la LGT presenta un efecto citotóxico marcado sobre células tumorales, además de inhibir el crecimiento de tumores en animales de laboratorio (Ganguli y Das, 1994). En mucosa de colon normal la LGT presenta un patrón de unión constante, mientras que en cáncer primario de colon se presentó este patrón e incluso en algunos casos de carcinoma no se detectó unión de la lectina (Hohenberger y col, 1990). En estudios con animales de laboratorio han reportado que la LGT previene el cáncer de colon, sin embargo en un estudio con ratas F-344 no se observó tal efecto protector cuando a los animales se les indujo cáncer de colon vía la administración de azoximetano (Zalatnai y col, 2001).

Lectina de *Dolichos biflorus* (DBA).

La lectina de *Dolichos biflorus* (DBA) es una lectina con unión a residuos de α -N-acetilgalactosamina. Se ha observado que en mucosa oral normal y maligna se asocia a carbohidratos de la membrana de células normales,

mientras que en leucoplaquia bucal se presenta una unión considerable en las capas de las células superiores (May y Sloan, 1991). En células de leucemia se ha observado que esta lectina se une ligeramente a las células y que la unión aumenta al incrementar la concentración de la lectina, sin presentar efecto citotóxico contra dichas células cancerosas, así mismo no se presentó efecto citotóxico de las lectinas contra células normales (Ohba y Bakalova, 2003).

DBA muestra afinidad hacia las membranas plasmáticas de células basales de piel, así como a la cubierta de la raíz externa e interna de los folículos pilosos y a la cubierta de la raíz externa de los ductos sebáceos, sin mostrar unión en la parte mas profunda de la dermis normal. En el caso de tejidos tumorigénicos, la DBA mostró unión en los folículos pilosos y en carcinoma de glándulas sebáceas (Tsubura y col, 1992). En líneas celulares de páncreas la lectina no muestra unión con las células estudiadas, siendo estos resultados opuestos a los obtenidos con otras lectinas estudiadas (Nishimura y col, 1993). En células Sertoli de ovario, se observa que la DBA solamente reacciona a nivel del oviducto ampular de células normales, mientras que en células tumorales se observa una reacción dispersa a nivel del citoplasma (Stoica y O'leary, 1989). En un estudio sobre el efecto de DBA en células de queratinocitos se observó que la lectina se une de manera limitada al aparato de Golgi de dichas células (Hrdlickova-Cela y col, 2001).

Lectina de Cacahuete (LC).

La lectina de cacahuete (LC) (*Arachis hypogaea*) es una lectina con afinidad hacia carbohidratos con grupos terminales β -galactosil, así como para el disacárido Gal β 1-3GalNAc. La LC ha sido empleada como marcador tumoral en algunos tipos de cáncer, reconociendo específicamente antígeno T de dichos tipos de cáncer (Chaco y Appukuttan, 2001). La LC ha presentado efecto inhibitorio en células tumorales Krebs II, carcinoma humano de mama y adenocarcinoma humano de colon (HT29, CaCo2, LoVo, HCT-15, SW837) (Pryme y col, 1994; Bardocz y col, 1994; Marth y Daxenbichler, 1988; Ryder y col, 1992; Ryder y col, 1994; Kiss y col, 1997). En células de vejiga humana, se observó que la LC presenta una menor unión a la membrana de células atípicas que en las células normales, además de perderse dicha unión al aumentar el grado de atipia celular (Langkilde y col, 1989). En estudios sobre diversas líneas celulares de mama malignas (Mcf-7, T47D, HBL100, BT20) no se observó efecto inhibitorio sobre la proliferación celular por estas lectinas (Kim y col, 2003).

Se ha observado que esta lectina se une a células normales así como en células de carcinoma escamoso de la mucosa oral (Meier y col, 2001). Por otro lado, se ha reportado que la LC puede ser empleada como un marcador histoquímico en los casos de carcinoma de túbulo distal, túbulo colector, y en varios carcinomas de células renales (Nagamot y col, 2001), así como en la diferenciación de células neoplásicas de ovario (Bychkov y col, 1991).

En carcinoma embrional testicular la LC presenta poca uniformidad de unión a las células (Malmi y Söderström, 1991), en tejidos de carcinoma embrional tiroideo sólido y folicular se ha observado que la LC reacciona con los dos tipos de carcinomas localizándose la unión en la membrana de las células epiteliales, en el citoplasma y en la región del aparato de Golgi (Sobrinho-Símoes y col, 1990). La LC presenta un patrón de unión muy localizado en las capas basales de epitelio queratinizado de células escamosas de la mucosa oral, esto mismo se observó en hiperplasia epitelial, mientras que en displasia epitelial severa, la lectina se unió específicamente al citoplasma con variaciones en la intensidad de unión en los bordes de la célula. En el caso de carcinoma en células escamosas, las células bien diferenciadas presentaron una fuerte relación con la lectina, mientras que en células con baja diferenciación no se presentó unión (Saky y Okabe, 1989). En el caso de leucoplaquia y carcinoma de células escamosas de la cavidad oral, la LC se unió a las células espinosas y granulares del epitelio bucal normal, además de mostrar una secuencia sialilada en células de la capa superior del epitelio queratinizado (May y Sloan, 1991).

En piel normal y tumorigénica, la LC reacciona en los folículos pilosos, sebositos de las glándulas sebáceas y en la epidermis, así mismo se presentó reacción en tumores de folículos pilosos y glándulas sebáceas (Tsubura y col, 1992). En carcinoma de vejiga, esta lectina se une en menor grado en comparación con células normales y ligeramente anormales. Por otro lado, la unión de LC fue menor en la membrana de tumores invasivos en

comparación con los no invasivos, así mismo se encontró que la unión de la lectina disminuye gradualmente al incrementarse el grado patológico de las células de vejiga (Niels y col, 1989).

Se han observado diferencias en los patrones de unión de LC con células de ameloblastoma intraóseo, ameloblastoma periferal y carcinoma de células basales cutáneas (Vigneswaran y col, 1993). En nódulos linfáticos metastáticos la LC se une ampliamente a dichas células; pudiendo actuar como un posible factor predictivo de metástasis de nódulos linfáticos de pulmón (Suzuki y col, 2002). En glándula pituitaria normal y con adenoma se ha encontrado que la LC presenta diferentes patrones de unión entre los dos tipos de tejidos permitiendo de esta manera emplear esta lectina para diferenciar la distribución de glicoconjugados en estos dos tipos de tejidos celulares (Behncken y Saeger, 1991).

Estudios *in vivo* empleando ratones con problema de cáncer de colon, se observó que bajas dosis de LC en la dieta durante un periodo largo no causó cambios significativos en la carcinogénesis, sin embargo se presentó un aumento significativo en el peso de páncreas de los animales tratados (Kelsall y col, 2002).

Lectina de Soya (LS).

La lectina de soya (LS) es obtenida de la semilla de *Glycine max*, es una lectina altamente específica para α - o β -N-acetilgalactosamina y en menor grado hacia D-galactosa y sus derivados oligosacáridos. La LS se ha propuesto como un posible marcador para carcinomas de células renales

(Nagamoto y col, 2001). Esta lectina ha sido ampliamente empleada en estudios para la diferenciación entre células normales y malignas. En estudios de mucosa oral se ha observado que la LS se une preferentemente a carbohidratos de la membrana normal, mientras que cuando las células han sido dañadas, la asociación se ve disminuida (May y Sloan, 1991).

En células de leucemia se presentó una ligera unión de la lectina, la cual incrementó al aumentar la concentración de la lectina; además de presentar un ligero efecto citotóxico contra líneas celulares tales como Junktat, RPMI-8402, HPB-ALL y CCR-HSB-2, mientras que en las líneas celulares Raji y Daludi el efecto citotóxico fue mucho mas marcado (Chandrasekaran y col, 2003).

En estudios *in vivo* se ha encontrado que el tratamiento de células tumorigénicas con LS, previo a ser inoculadas intraperitonealmente a ratones; produjo una considerable disminución en la progresión del crecimiento tumoral (Ganguly y Das, 1994). En carcinoma colorectal y normal, no se encontraron diferencias marcadas en los patrones de unión de la LS con las células (Hohenberger y col, 1990). En líneas celulares pancreáticas se ha encontrado unión de LS con las líneas HuP-T3 y HuP-T4 pero no con células del ducto pancreático (Nishimura y col, 1993). También se ha encontrado que la LS presenta efecto inhibitorio sobre células tumorales de linfoma murina y de tumor linfático ascítico murina (Mukhopadhyay y col, 1994; Ganguly y Das, 1994). En líneas celulares malignas de mama se ha observado que la LS presenta un efecto inhibitorio

considerable sobre la proliferación de dichas células siendo menor el efecto a altas concentraciones de la lectina (Valentiner y col, 2003).

Lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA).

Las lectinas de frijol común (PHA) es una mezcla de cinco isolectinas, las cuales han sido purificadas de diversas líneas de *Phaseolus vulgaris*. Esta lectina es inhibida por N acetilgalactosamina, sin embargo presenta mayor afinidad hacia oligosacáridos bi- y triantenarios compuestos de manosa, N-acetilglucosamina y galactosa (Borberg y col, 1968; Cummings y Kornfeld, 1982; Yamashita y col, 1983).

En algunos casos de carcinoma medular tiroideo, la PHA se unió a casi todos los carcinomas, independientemente del tipo histológico (Sobrinho-Simoes y col, 1990). L-PHA ha mostrado unirse a células de tejido con adenocarcinoma de pulmón, pudiendo actuar como un indicador predictivo para este tipo de carcinomas (Laack y col, 2002).

En suero de pacientes con cáncer y sanos, se observó una unión considerablemente mayor en el grupo de pacientes con cáncer que en el de sanos (Shengle y col, 1990). Ganguli y Das (1994) reportaron que el tratamiento de células tumorales de timo con PHA antes de ser inoculadas intraperitonealmente en ratones sanos, se observó un decremento en el nivel de células tumorales en el huésped, lo cual indicó un efecto terapéutico, ya que se inhibió el crecimiento y la progresión del tumor. En un estudio con diversas líneas celulares malignas de mama la L-PHA presentó un efecto inhibitorio importante sobre dichas líneas celulares (Valentiner y col, 2003).

mientras que por otro lado pueden estimular la proliferación de células de carcinoma colorectal (Shabtai y col, 2002)

En un estudio realizado *in vivo* por Pryme y colaboradores (1994) en el cual a ratones con tumores ascíticos causado por células Krebs II, se le suministró una dieta a base de PHA, observándose una disminución en la proliferación de células tumorales; sin embargo, a pesar de que los animales alimentados con esta dieta exhibieron una disminución de peso, el crecimiento de los tumores no fue totalmente abolido. Cuando otro grupo de animales sanos fueron alimentados con una dieta libre de lectina por algunos días y después fueron inoculadas las células Krebs II y se continuó con una dieta a base de lectina, se observó un ligero crecimiento del tumor en comparación con el grupo de ratones anteriormente mencionado, lo cual hace evidente que la exposición del tracto gastrointestinal con las lectinas tiene un efecto rápido en la inhibición de la proliferación de células tumorigénicas en la cavidad peritoneal.

En tejido hepático humano normal y anormal se ha encontrado que PHA se une fuertemente a la superficie sinusoidal y a la superficie canicular biliar, pero con una débil unión en algunas partes de la superficie lateral, además de unirse a las células sinusoidales (Células Kuffer, endotelio sinusoidal y células Ito). En hígado cirrótico, la PHA se unió débilmente a la superficie celular de los hepatocitos y con poca uniformidad en la cubierta citoplásmica de la canícula biliar (Murakami y col, 1992).

Se han estudiado extractos de frijol común, el cual contiene lectinas, sobre células Hela, observándose que el extracto inhibía la proliferación

celular en un 20%, así mismo se observó una disminución en la formación de colonias celulares al incrementarse la concentración de extracto proteico y una disminución en la síntesis de ADN, producto de la inhibición de la proliferación celular (Rocha y col, 1999).

Además de las lectinas anteriormente mencionadas, muchas otras lectinas han sido estudiadas con la finalidad de observar su efecto, tanto *in vivo*, con animales de laboratorio, como *in vitro*; en diversos tipos de células algunas de las lectinas que se han estudiado son, la lectina de *Viacum album*, *Griffonia simplicifolia*, *Ulex europaeus* y *Helix pomatia*, entre otras. En muchos de los estudios reportados, se ha encontrado que las lectinas pueden ser capaces de inhibir la proliferación o la viabilidad celular. *In vitro* se ha observado efecto inhibitorio sobre polioma de hámster, cáncer de pulmón, mieloma, linfoma de Dalton, carcinoma epitelial de cervix, linfoma de AKR, carcinoma embrional, carcinoma de colon, mama y ovario, leucemia, tumor nasal (Vilarem y col, 1978; Warner y Kruegerm 1979; Pasad y Sadhi, 1981; Yawata y col, 1983; Abdullaev y González de Mejía, 1996; Leibovici y col, 1986; Draber y Stanley, 1984; Marth y Daxenbichler;1988; Devine y Harada; 1991; Ryder y col, 1992; Ryder y col, 1994; Werner y Kissel, 1996; Miyoshi y col, 2001; Dwek y col, 2001; Suzuki y col, 2002; Laack y col, 2002; Kim y col, 2003; Hostanska y col, 2003; Fernandez y col, 2003).

Características del Frijol Tépari.

En México, el principal cultivo para consumo de leguminosas lo representa el frijol común (*Phaseolus vulgaris*). En todos los Estados de la República se siembra y se cosecha frijol, sin embargo dependiendo del lugar será la variedad cultivada y consumida. En el norte del país, por ejemplo, se prefieren los frijoles bayos, pintos o bien de tonalidades claras, mientras que en el centro se consume preferentemente la variedad flor de mayo y el canario, mientras que en la parte sur del país se prefieren los frijoles negros. En el mercado nacional, se puede encontrar una gran diversidad de frijol, las cuales difieren en color, tamaño, forma, tiempo de cocción y características culinarias; sin embargo en el noroeste de México existen antecedentes que desde hace varios siglos se cultiva y se consume una especie en particular de frijol llamado tépari o frijol del desierto, perteneciente al género *Phaseolus* (*Phaseolus acutifolius*) (Wyllys, 1931).

El frijol tépari es una leguminosa comestible, la cual se ha adaptado a regiones áridas. La actividad de sus estomas parece jugar un papel significativo en la capacidad del frijol tépari para crecer en condiciones de baja humedad y calor, además de ser muy resistente a altas concentraciones de sales. Este frijol presenta una gran tolerancia hacia plagas, insectos, microorganismos y a diversas enfermedades que normalmente afectan al frijol común. Se ha observado que en condiciones de sequía, el frijol tépari alcanza una buena producción, viéndose ésta mejorada bajo condiciones de irrigación. Estas características hacen del frijol

tépari un cultivo muy atractivo para zonas áridas o para regiones en donde no existen sistemas modernos de irrigación (González-Flores, 1988). Sin embargo, a pesar de su alto potencial para cultivo y consumo, se ha encontrado que crudo o mal cocido es altamente tóxico. Así mismo, se ha observado que, extractos de esta leguminosa presentan alta capacidad de aglutinar diversos tipos de células (González-Flores, 1990).

Actualmente se han identificado dos variedades de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*): La variedad *tenuifolius* A. Gray y la variedad *latifolius* Freeman, la cual incluye genotipos silvestres y cultivados, éstos últimos con hojas ovales, semillas ligeramente más grandes y de germinación inmediata (Kaplan, 1965). Este frijol crece desde el oeste de Texas hasta Arizona en los Estados Unidos y de ahí se extiende hacia el norte de México, hasta el este de Jalisco. Sin embargo en el sur del país se sabe que existen otras líneas de frijol tépari conocidos como escumite, el cual es consumido desde hace muchos años y pertenece a la variedad *latifolius*.

Se han realizado diversos estudios con el fin de elucidar las características bioquímicas del frijol tépari, se han empleado líneas de frijol procedente de diversas localidades, tales como Chiapas, Querétaro, Puerto Rico, entre otros. Los resultados obtenidos en estos estudios son diversos, lo cual puede deberse a la línea de frijol empleada en cada uno de dichos estudios, así mismo como a las condiciones bajo las cuales fueron cultivadas. Entre los resultados que se han obtenido se ha observado que esta variedad de frijol presenta un contenido de fibra entre 3 y 8%, del 57 a 67 % de carbohidratos totales (Robertson, 1978; Valadez Vega, 1993), entre

1.0 y 4% de lípidos (Valenzuela, 1988; Valadez Vega, 1993), del 19 al 22 % de proteína (Waines, 1978; Valadez Vega, 1993), además de presentar algunos minerales tales como calcio, magnesio, manganeso, hierro, fósforo, zinc (Taggart y col, 1983). Por otro lado, se ha reportado la presencia de algunos compuestos antifisiológicos, tales como taninos, inhibidores de tripsina, lectinas (G de Mejía, y col, 1990; Valadez-Vega, 1993). Dentro de estos compuestos a las lectinas se les ha puesto mucha atención, realizándose diversos estudios en los cuales se ha observado variabilidad en sus resultados. Entre estos resultados se reportó un peso molecular de 83 kDa para lectina de frijol procedente de Chiapas (vargas Albores, 1987), 117 kDa para lectina de frijol procedente de Puerto Rico (Pusztai y col, 1987), 129-146 kDa para lectina de frijol de Querétaro (Valadez Vega, 1993) mientras que por otro lado Reynoso-Camacho y col (2003) reportaron un peso molecular en el rango de 115-120 kDa para una línea de frijol tépari blanco. Por otro lado, se han reportado puntos isoeléctricos que van de 4.5 a 5.5 (Vargas Albores, 1987; Pusztai y col, 1987). En cuanto a la composición de aminoácidos Vargas Albores (1987) reportó niveles mayores de ácido aspártico, serina, treonina, leucina y fenilalanina, mientras que Pusztai y col (1987) encontraron principalmente asparagina, treonina, serina, ácido glutámico, glicina, alanina, valina, leucina e histidina. Por otro lado, Pratt y col (1990) reportaron la secuencia del extremo amino para lectina de frijol tépari proveniente de Arizona, observándose una gran homología entre la fracción terminal de la lectina leuco aglutinante de frijol tépari y las subunidades de fitohemaglutinina de frijol común.

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo del presente proyecto es caracterizar a detalle las Propiedades bioquímicas y bioactivas de las lectinas de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*).

Objetivos Específicos

1. Determinar las características químicas y bioquímicas de las lectinas de frijol tépari, tales como peso molecular, punto isoeléctrico, determinación de subunidades, composición de aminoácidos
2. Determinar la actividad mitogénica de la lectina pura de frijol tépari
3. Probar el efecto citotóxico de lectinas de frijol tépari en células malignas humanas
4. Determinar la dosis inhibitoria 50 (DI₅₀) de lectinas de frijol tépari en 13 líneas celulares malignas humanas.
5. Estudiar el efecto de las lectinas de frijol tépari sobre la proliferación en cuatro líneas celulares malignas humanas
6. Estudiar el efecto post-incubatorio de lectinas en cuatro líneas de células malignas humanas

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Material Biológico

- a. El frijol tépari blanco (*Phaseolus acutifolius*) fue adquirido en el mercado Municipal de Hermosillo, en donde se compró el lote necesario para la realización de la investigación.
- b. Se emplearon eritrocitos humanos del grupo sanguíneo A y O, provenientes de dos donadores y siempre que fue necesario se extrajeron muestras de las mismas personas.
- c. Líneas de células malignas (ver Tabla 1), las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Alejandro García Carrancá del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y por el Instituto Nacional de Cancerología.

Métodos

Purificación de Lectina

Extracción y purificación de lectinas. Las semillas de frijol fueron molidas en que molino para granos (Thomas Wiley Cutting Mill) y pasadas por una malla # 60. La extracción de la fracción hemaglutinante del frijol tépari se realizó según la metodología reportada por González de Mejía y col (1990), con algunas modificaciones. Para este procedimiento, la harina de frijol se

extrajo con una solución reguladora de fosfato de potasio (10 mM, pH 7.2) salina (NaCl 0.15 %) (PBS) en una relación 1:10 (W/V), en agitación constante por 18 h a 4 °C; posteriormente la muestra se centrifugó a 20 000 r.p.m. a 4°C durante 60 min, en una centrífuga refrigerada, desechando el precipitado.

La purificación de las lectinas se efectuó de acuerdo a lo reportado por González Flores (1990) con algunas modificaciones. A partir del extracto crudo, previamente preparado, se precipitaron las proteínas empleando sulfato de amonio al 70 %. El precipitado fue separado por centrifugación a 20,000 r.p.m. durante 60 min a 4 °C. Posteriormente el precipitado se resuspendió y se dializó contra PBS por 24 h con dos cambios; Después la muestra se centrifugó a 20,000 r.p.m. por 60 min y el sobrenadante se empleó para la purificación de la lectina.

La purificación se realizó en un equipo de cromatografía de líquidos de presión intermedia FPLC (Amersham Pharmacia Biotech. Uppsala, Suecia), empleando la columna de afinidad de mini-leak-fetuína previamente preparada (ver abajo); la elusión de la lectina se efectuó con una solución de glicina-HCl (50 mM), pH 2.8 y la detección de la lectina se hizo mediante un monitor de absorbancia UV a 280 nm. La lectina una vez purificada se dializó

Tabla 1. Líneas Celulares Malignas Humanas Empleadas en los Estudios Biológicos

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	CARACTERÍSTICAS	CONCENTRACION DE LECTINA EMPLEADA (µg/mL)
HeLa	Cervix	Carcinoma epitelial cervical	0 - 300
SiHa	Cervix	Carcinoma escamoso de cervix	0 - 200
Ca_Ski	Cervix	Carcinoma cervical epidermoide	0 - 200
C33-A	Cervix	Carcinoma cervical	0 - 400
MCF-7	Mama	Adenocarcinoma de mama	0 - 300
Mda-Me-231	Mama	Adenocarcinoma de mama (sin receptores para esteroides)	0 - 300
Hep G2	Higado	Hepatoma	0 - 300
Sw480	Colon	Adenocarcinoma	0 - 300
293	Riñón	Línea primaria trasformada de riñón humano embrional	0 - 300
Sknsh	Medula ósea	Neuroblastoma	0 - 300
Sw13	Glándula suprarrenal	Adenocarcinoma cortical	0 - 300
A431	Vulva	Carcinoma epitelial	0 - 200
T24	Vejiga	Carcinoma de células transicionales	0 - 100

contra tres cambios de agua desionizada. Posteriormente la lectina purificada fue liofilizada y conservada en refrigeración para los experimentos posteriores (Mejía y col, 1989).

Preparación de la columna de Mini-Leak – fetuína. La matriz de Mini-Leak, se preparó de acuerdo al manual de kem en tec (Research Diagnostics Ind. Copenhagen, Din). La resina Mini-Leak se lavó dos veces con agua destilada bajo filtración. Se preparó una solución de 2 mg/mL de fetuína (Sigma Chem. Co. St. Louis, Mo. USA) en NaCl (0.1 M) y se mezcló con 22 mL de solución de polietilenglicol (Sigma Chem. Co. St. Louis, Mo. USA) al 30 %; la mezcla fue agitada durante la noche a temperatura ambiente y posteriormente se lavó con NaCl (0.1 M) para eliminar la fetuína no acoplada. A continuación, a la mezcla de acoplamiento se adicionaron dos volúmenes de etanolamina 0.2 M, pH 9.0 y se dejó durante 3 h a temperatura ambiente para bloquear el exceso de grupos activos en la matriz.

La matriz minileak-fetuína se pasó a una columna de 1.5 cm X 5.0 cm (Sigma Chem. Co. St. Louis, Mo. USA), equipada con un adaptador de flujo, donde se lavo varias veces con soluciones reguladoras de pH 11 y pH 3 para eliminar la proteína no unida. Finalmente la matriz fue lavada y almacenada en solución reguladora de fosfatos (10 mM, pH 7.2) con azida de sodio (15 mM).

Electroforesis en gel desnatralizante de poloacrilamida (SDS PAGE). Se realizó de acuerdo con la técnica de Laemmli (1970). Se empleó un gel de corrida al 12 % en una cámara para electroforesis vertical mini-protean II (Bio Rad, Richmond, Ca. USA.). Se aplicaron muestras de aproximadamente 10 μ l en cada pozo del gel y se realizó la electroforesis a temperatura ambiente a una corriente de aproximadamente 20 mA, 120 v a temperatura ambiente. La proteína fue teñida con una solución de azul Coomassie R-250 (0.1 %) (Bio Rad, Richmond, Ca. USA.) (10 % ácido acético, 40 % metanol). El peso molecular de la lectina se estimó empleando una mezcla marcadores de peso molecular: miosina, β -galactosidasa, fosforilasa B, sero albúmina bovina, anhidrasa carbónica e inhibidor de tripsina de soya (200, 116, 97, 66, 31, 21 kDa) (Sigma Chem. Co. St. Louis, Mo. USA.).

La electroforesis en geles nativos (nativo-PAGE) se realizó de acuerdo al método de Laemmli (1970) en un gel de poliacrilamida al 11 % y se emplearon β -galactosidasa, fosforilasa B, sero albúmina bovina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, como estándares de peso molecular (116, 97, 66, 45, 31 kDa respectivamente) (Sigma Chem. Co. St. Louis, Mo. USA.). Para la separación de la proteína, la corrida se realizó a 20 mA, 120 v a 4 °C y las bandas separadas fueron teñidas con azul Coomassie R-250.

Caracterización Bioquímica de la Lectina de Frijol Tépari

Determinación de peso molecular. El peso molecular de la lectina purificada se estimó por cromatografía de exclusión por tamaño empleando una columna Superosa 12 (Supelco, Phennsylvania,USA). La lectina fue

inyectada en la columna (en porciones de 100 μg disueltas en 0.5 ml de eluyente) y la cromatografía se realizó bajo dos sistemas de soluciones reguladoras a un flujo de 0.5 mL/min. Un ensayo fue llevado a cabo con una solución reguladora de baja fuerza iónica (MES 25 mM, pH 6.0) y otro ensayo fue realizado empleando una solución reguladora de MES (25 mM, pH 6.0) de alta fuerza iónica empleando NaCl (1 mM) (Anderson, 1985). La proteína eluida se detectó mediante un monitor ultravioleta en línea a una longitud de onda de 280 nm.

Para calcular el peso molecular se realizó una interpolación del tiempo de retención determinado para la proteína eluida, con los tiempos de retención correspondientes a estándares de peso molecular conocido: ferritina, catalasa, sero albúmina bovina, ovoalbúmina (440, 232, 66, 44 kDa respectivamente) (Amersham Biosciences, Upsala Suecia).

También se determinó el peso molecular empleando las técnicas de electroforesis nativas y desnaturalizantes, descritas anteriormente (Laemmli, 1970), empleando estándares de peso molecular. Se realizaron curvas de calibración y por interpolación se calculó el peso molecular aparente de la lectina.

Por otro lado, se realizó la determinación de peso molecular por espectrometría de masas de tipo Matrix assisted Laser Description/Ionization con detector Time of Flight (MALDI-TOF) en un equipo Hewlett Packard G2025A LD-TOF. Una muestra de lectina se disolvió en 500 μl de agua desionizada, se tomó una alícuota entre 1 y 5 μL y se mezcló con ácido sinapínico. Entre uno a dos microlitros de mezcla anterior fueron colocados

en una sonda de oro de 10 canales, la muestra en la sonda se secó al vacío y se introdujo al espectrómetro de masas. Las lecturas espectrométricas fueron transmitidas y procesadas en una computadora, analizándose los datos para calcular el peso molecular.

Determinación de punto isoeléctrico. El punto isoeléctrico (PI) se realizó por dos métodos, el primero fue empleando la técnica de separación número 100 del equipo PhastSystem (Amersham Pharmacia, Upsala, Suecia), el cual es un sistema automatizado que emplea 500 Vh, por un periodo aproximado de 25 min; se emplean geles para punto isoeléctrico con anfólinas a un pH entre 4.0-6.5 y 5 % de poliacrilamida.

El segundo método empleado fue de acuerdo al manual de Hoefer (Hoefer Scientific Products), preparando un gel de gradientes con pH entre 3.5 a 10. El gel fue previamente pre-corrído por 30 min a 200 v, posteriormente se aplicó la muestra de lectina en el gel y se corrió a 400 v, a 4 °C por 4 h. Las bandas separadas fueron visualizadas por tinción con plata (nitrato de plata 0.1%, etanol 20%, formaldehído 0.027%) y el PI fue calculado empleando estándares con PI conocidos (Sigma, Chem. Co. St. Louis, Mo. USA): lectina de lenteja básica, lectina de lenteja media, lectina de lenteja ácida, mioglobina básica, mioglobina ácida, anhidrasa carbónica humana, anhidrasa carbónica bovina, β -lactoglobulina A, inhibidor de tripsina, glucosa oxidasa, amiloglucosidasa (PI: 9.3, 8.65, 8.45, 8.15, 7.35, 6.85, 6.55, 5.85, 5.2, 4.55, 3.5 respectivamente).

Electroforesis en dos dimensiones. La primera dimensión se corrió en geles de enfoque isoeléctrico de acuerdo a la técnica descrita anteriormente. En el gel de enfoque isoeléctrico se identificó la línea correspondiente a la lectina, se cortó y se colocó en la parte superior de un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (Laemmli, 1970), el gel fue sellado con agarosa (1 %) y se corrió a 25 mA. Las bandas de proteínas separadas fueron detectadas por tinción con plata.

Composición de aminoácidos. El análisis fue realizado empleando una modificación del procedimiento descrito por Altmann (1992) y Vazquez-Ortiz y col. (1995). La lectina se mezcló con 2 mg de antioxidante (tioglicolato de sodio) y 3 mL de HCl 6M. La hidrólisis se realizó calentando el tubo a 64 °C por 6 h, posteriormente la muestra se evaporó a sequedad empleando presión reducida. La fracción hidrolizada fue disuelta en 500 µL de agua y evaporada dos veces bajo una corriente de nitrógeno para remover el ácido remanente en la muestra. Posteriormente se adicionaron 2 mL de solución reguladora de citrato de sodio (0.2 M, pH 2.2) y la muestra se almacenó a 4 °C hasta su análisis.

Para el análisis de aminoácidos, una alícuota de muestra hidrolizada fue ajustada a un volumen de 250 µL con solución reguladora de citrato de sodio y después fue mezclada con 250 µL de reactivo de O-phtalaldehído (OPA) (10 mg de OPA en 250 µL de metanol), 37.5 µL 30 % Brij 35, 25 µL de 2-mercaptoetanol y 3 mL solución reguladora de citrato de potasio pH 10.1. Después de 2 min de reacción, la muestra derivatizada fue filtrada en

un filtro de Acrodisc (Water Corp. Molford, MA), con una jeringa (0.45 μm), inmediatamente, la muestra fue inyectada a una columna LC-18 supelcosil (5 μm , 4.6 X 100 mm, Supelco, Pennsylvania, USA) de un equipo de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) (Hewlett Packard serie 1100) con un detector fluorométrico. Antes de la inyección, la columna fue equilibrada con solvente A (solución reguladora de acetato de sodio 0.1 M, tetrahidrofurano 1 % pH 6.2) por 15 min. Después de la inyección se continuó aplicando con una serie de gradientes lineares incrementándose la concentración de metanol (solvente B): 0.0 a 0.5 min, gradiente lineal a 10 % B; 0.5 a 3.0 min, elusión isocrática a 10 % B, 3.0 a 7.0 min gradiente lineal 11 % de B; 7.0 a 7.5 min, gradiente lineal a 15 % de B; 7.5 a 14 min elusión isocrática a 15 % de B; 14.0 a 14.2 min, gradiente lineal a 30 % de B; 14.2 a 16 min, gradiente lineal a 40 % B, 16.0 a 24 min, gradiente lineal a 60 % B; 16 a 27 min, elusión isocrática a 60 % de B. Al final de los gradientes, la columna fue lavada con 100 % de B por 5 min y re-equilibrada a las condiciones iniciales para la siguiente inyección. Durante la corrida de HPLC, los aminoácidos derivatizados con OPA fueron identificados en un detector de fluorescencia conectado al equipo de cromatografía, a una longitud de onda de excitación de 330 nm y 418 nm de emisión.

Al final de los gradientes la columna fue lavada con metanol al 100 % durante 20 min y re-equilibrada a las condiciones iniciales para la siguiente inyección. Los aminoácidos de las muestras fueron identificados comparando con los tiempos de retención de una muestra de aminoácidos de composición conocida (Pierce Chem. Co. IL. USA).

Contenido de carbohidratos totales. Para su realización se empleó la técnica cuantitativa de Dubois (1956) en la cual los carbohidratos son convertidos a furfural y compuestos homólogos por acción del ácido y del fenol, produciendo un complejo colorido.

En un tubo de ensaye se mezclaron 200 μ L de la muestra de lectina, previamente disuelta en agua (1 mg/mL), con 200 μ L de solución de fenol al 5 % (w/v), a la mezcla se le adiciona 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y se deja reaccionar por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente el tubo de reacción se agita y se deja reposar por 30 min; transcurrido ese tiempo se lee la absorbancia a 490 nm.

La concentración de carbohidratos en la muestra se calculó por interpolación en la curva de calibración empleando glucosa como estándar.

Determinación de metales. La lectina fue disuelta en NaCl (0.5 %) y se dializó contra la misma solución durante 12 h, posteriormente se dializó por 12 h contra una solución de EDTA (50 mM). La lectina dializada fue digerida con una solución de ácido nítrico al 38 % en horno de microondas Q wave (Perkin Elmer) y los metales fueron detectados en un espectrómetro de plasma (Plasma ICP-OES, optima 3000XL).

Se realizaron curvas de calibración para cada uno de los metales empleando estándares de Ca, Cu, Cr, Cd, Fe, Mg, Mn, Zn (Perkin Elmer) y la concentración de ellos en la lectina fue calculada en partes por millón (ppm).

Secuenciación de fragmentos tripticos de lectina . En primera instancia la lectina fue sometida a una electroforesis de enfoque isoeléctrico para separar los diferentes fragmentos. Posteriormente se realizó una segunda electroforesis en dos dimensiones y colocadas en un sistema robotizado Ettan Spot Handling Workstation (Amersham Biosciences, Upsala Suecia) en este sistema se cortaron secciones del gel de dos dimensiones correspondientes a las lectinas purificadas mismos que fueron digeridos con tripsina como describe Shevchenko y col (1996). Posteriormente los péptidos obtenidos se inyectaron en un sistema de HPLC equipado con una columna C-18 de diámetro reducido (microbore) acoplado mediante una interfase de nano-electroaspersión (nano-electrospray) a un aparato de espectrometría de masas en tandem (MS/MS) cuadrupole-Time of Flight (Q-TOF) marca Micromass MS Technologies (Milford, Massachssets). Para obtener las secuencias de los péptidos, los datos obtenidos mediante MS/MS se analizaron mediante el programa MassLynx versión 5.0 y la base de datos MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

Propiedades Bioactivas de la Lectina de Frijol Tépari.

Actividad Hemaglutinante de la lectina.

Preparación de eritrocitos. Se empleó sangre humana fresca de tipos sanguíneos A y O de dos donadores sanos. La sangre se colectó en tubos con EDTA (2%) como anticoagulante, se centrifugó (2000 r.p.m., por 10 min) con el fin de separar los eritrocitos del plasma sanguíneo. Los eritrocitos fueron lavados dos veces con dos volúmenes de PBS. Posteriormente,

alícuotas de 250 μL de eritrocitos fueron tratados con una solución de tripsina (Sigma Chem. Co. St. Louis, Mo. USA) (0.6 mg/mL) en 10 mL de PBS por una hora a 37 $^{\circ}\text{C}$ con agitación constante. Posteriormente los eritrocitos fueron lavados tres veces con PBS y finalmente fueron resuspendidos a una concentración de 2 % en PBS.

Prueba de hemaglutinación. Se realizó empleando el método de diluciones seriadas con una solución de eritrocitos (Jaffé, 1980). Para la prueba de hemaglutinación se tomaron 50 μL de la muestra de lectina y se efectuaron diluciones seriadas de orden 2 con PBS, posteriormente se agregaron 50 μL de la suspensión de eritrocitos, dejándose en reposo durante una hora a temperatura ambiente; finalmente se determinó la última dilución que presentó aglutinación y con esto se obtuvo el título de aglutinación.

Las unidades de hemaglutinina se definen como el inverso de la última dilución que presenta aglutinación positiva (Thompson y col, 1986). La actividad hemaglutinante de lectinas se calculó dividiendo el título de aglutinación entre los miligramos de proteína soluble presente en los 50 μL de la muestra determinada por el método de Bradford (1976).

Estudios de inhibición de la hemaglutinación. En estas pruebas, se determinó la capacidad de varias glicoproteínas, glicopéptidos, oligosacáridos y carbohidratos simples para inhibir la reacción de hemaglutinación. Durante la prueba de hemaglutinación se adicionan 50 μL de una muestra de carbohidrato en solución.

Las glicoproteínas empleadas fueron: fetuina, fibrinógeno, tiroglobulina, ovoalbúmina, conalbúmina, las cuales fueron utilizadas a concentraciones de 10 mg/mL, los glicopéptidos empleados fueron obtenidos por hidrólisis enzimática de las glicoproteínas.

Los glicopéptidos fueron preparados a partir de digestión proteolítica con Tripsina porcina (Tipo XIII, Sigma) o con Termolisina (Pierce Chemical Co, IL, USA) a partir de diversas glicoproteínas y aislados de los péptidos no glicosilados por cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 30 (26 X 700 mm, Amersham Biosciences, Upsala, Suecia), eluyéndose con una solución reguladora de bicarbonato de amonio 100 mM, pH 7.5 conteniendo 1 % de butanol. Siendo detectadas las fracciones glicopeptídicas mediante la técnica de fenol-sulfúrico. Posteriormente los glicopéptidos obtenidos fueron secados por rota-evaporación y liofilización.

Los glicopéptidos empleados fueron derivados de fetuina bovina (Sigma) digerida con termolisina (glifetu), de tiroglobulina porcina (Sigma) digerida con tripsina (tirotrip), o termolisina (trifiter), de ovoalbúmina (Sigma) digerida con tripsina (ovotrip) y de fibrinógeno de bovino (Sigma) tratado con termolisina (fibter) los cuales se emplearon a concentraciones de 1 mg/mL.

Los oligosacáridos que se emplearon fueron quitooligosacáridos y oligosacáridos de leche humana provenientes de la colección del Dr. Gerardo Alvarez Manilla a una concentración de 1 mg/mL. Por último los carbohidratos simples (trisacáridos, disacáridos monosacáridos metilglucosidos y alditoles) fueron rafinosa, lactosa, maltosa, glucosa,

galactosa, manosa, fucosa, metilglucopiranosido, glucosaminitol y galactosaminitol, a una concentración de 0.5 M.

Partiendo de las concentraciones mencionadas para cada compuesto, se determinó la concentración mínima que fue necesaria para inhibir la hemaglutinación; los eritrocitos aglutinados, sin efecto de los compuestos carbohidratos formaron aglomerados mientras que cuando ocurre inhibición de la aglutinación, los eritrocitos se mantienen en suspensión (Sharon y Lis, 1989).

Cromatografía de afinidad.

Acoplamiento de lectinas. Para la realización de las pruebas de especificidad hacia carbohidratos, se utilizó una columna de afinidad generada con una matriz de Fractogel-Azlactona (Merck. Co. Inc. MJ. USA). Para la reacción de acoplamiento se disolvieron 10 mg de la lectina de frijol tépari en 2 mL de solución reguladora de Fosfato-Citrato (Fosfato monobásico de sodio 0.05 M, Citrato de sodio 0.6 M, pH 7.5), a esta suspensión se agregaron 290 mg de Fractogel-Azlactona. La reacción se incubó por 4 h a temperatura ambiente con agitación lenta y constante. Transcurrido ese tiempo se adicionaron 500 μ L de etanolamina 3 M pH 9.0 para detener la reacción, esta mezcla se incubó 3 h más en iguales condiciones. Terminada la incubación la matriz fue lavada con 10 volúmenes de solución reguladora TBS (Trisma base 100 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0.2 mM, azida de sodio 0.02 %). Finalmente la matriz se empacó en una columna cromatográfica y se equilibró con TBS.

Cromatografía de afinidad. Se utilizaron los glicopéptidos obtenidos de tiroglobulina por hidrólisis enzimática con termolisina que fueron utilizados en los estudios de inhibición de aglutinación (ver arriba). Estos glicoconjugados, fueron aplicados a la columna de afinidad, previamente equilibrada con 10 volúmenes de solución reguladora de tris (50 mM, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 5 mM MgCl, TBS), a un flujo de 0.5 mL/min. Una vez aplicada la muestra, la columna se lavó con 10 volúmenes de la solución de TBS para recuperar el material excluido y el retardado. Para la elusión del material adsorbido a la lectina, se aplicaron 10 volúmenes de una solución de glicina 50 mM y NaCl 150 mM, pH 2.5. Los péptidos eluidos fueron detectados por un monitor UV en línea a una longitud de onda de 280 nm y el material recuperado de la columna fue colectado en fracciones de 1 ml durante toda la corrida cromatográfica.

Los glicoconjugados fraccionados por esta metodología fueron secados bajo presión reducida y posteriormente las muestras secadas fueron aplicadas a una columna sephadex G-15 para ser desaladas, empleando una solución reguladora de NH₄HCO₃ (100 mM); se monitoreó el contenido de carbohidratos separados en las fracciones mediante la reacción con fenol sulfúrico, empleando glucosa como estándar (ver arriba). Posteriormente las muestras fueron secadas a vacío en un equipo Speedvac (Termo Savant, Holbrook, NY. USA), para posteriormente ser analizadas en su composición de carbohidratos.

Análisis composicional de carbohidratos. Las muestras secadas se hidrolizaron con metanol-HCl (0.625 M) durante 16 h a 70 °C. La muestra se dejó enfriar y se le agregó alcohol terbutílico a 20 %, se evaporó a sequedad con una corriente de nitrógeno y se adicionó 5 µL de metanol 5 µL reactivo de piridina (30 g KOH + 500 mL piridina) y 5 µL de anhídrido acético, se dejó reaccionar por 15 min a temperatura ambiente y se evaporó a casi sequedad en corriente de nitrógeno, se continuó después evaporando a sequedad total pero ahora en vacío en presencia de P₂O₅.

Los azúcares liberados fueron derivatizados con reactivo de silanización (Tris-Sil[®], Pierce Chem. Co, IL.USA) y se inyectó a un cromatógrafo de gases equipado con una columna Econo Cap EC-1 (Alltech, Deerfield, ILL.USA.), empleando helio como gas acarreador de acuerdo con el programa de elusión descrito en (Chaplin, 1994).

Estudio *In vitro* Sobre el Efecto Mitogénico de Lectinas en Linfocitos Humanos. Para el ensayo se emplearon linfocitos humanos normales, los cuales fueron purificados de sangre fresca. La sangre fue diluida con PBS en relación 1:1, y se dejó caer lentamente en un tubo con ficol (Histopaque 1077, Sigma) para formar un gradiente de purificación, consiguiéndose de esta forma la separación de los componentes de la sangre. La fracción correspondiente a los linfocitos se extrajo cuidadosamente con una pipeta pasteur y se pasó a un tubo donde fue lavada tres veces con 7 ml de PBS bajo centrifugación por 10 min. Los linfocitos extraídos fueron resuspendidos en un volumen conocido de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco)

conteniendo SFB inactivo al 10 % y antibióticos (estreptomycin y penicilina G sódica) al 1 %. Los linfocitos fueron contados y sembrados en microplacas de 96 pozos, colocando 200,000 células/pozo; en un volumen de 150 μ L, inmediatamente se agregó a cada pozo por separado la solución de lectina de frijol tépari, o de lectina de frijol común o de concanavalina A, cada una previamente disuelta en PBS. Las concentraciones de lectina que se emplearon fueron 0, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 25, 50 μ g/mL, en donde cada concentración se trabajó por quintuplicado y dejándose en incubación en atmósfera de CO₂ (4 % CO₂, 7 % humedad, 37 °C) durante 48 h para probar la actividad mitogénica.

Después de 42 h de los linfocitos con lectina se les agregó medio de cultivo conteniendo timidina tritlada (Amersham, Pharmacia), de tal modo que la concentración final de [³H] timidina fuera de 3 μ Ci/mL. Una vez agregada la radiomarca, los linfocitos se dejaron incubando por 6 h mas hasta cubrir 48 h de incubación con lectina. Posteriormente los linfocitos fueron transferidos a microtubos donde fueron centrifugados y lavados tres veces con PBS, prosiguiendo a realizar la lisis de los linfocitos con EDTA-SDS (10mM, 0.1%). A continuación se prosiguió con la técnica de timidina tritlada como se describe más abajo.

La mitogenicidad es expresada como la capacidad de la lectina de promover la proliferación de linfocitos, la cual es directamente proporcional a la cantidad de [³H] timidina incorporada por la célula (DPM).

Los resultados de este estudio fueron analizados estadísticamente empleando el paquete estadístico Statgraphics Plus para windows versión 4.0.

Determinación de proliferación celular mediante la técnica de timidina tritiada ($[^3\text{H}]$ timidina). Para la determinación de proliferación celular mediante la Técnica de timidina tritiada ($[^3\text{H}]$ timidina), a las células previamente expuestas a la lectina se les eliminó el medio y se agregó medio de cultivo conteniendo $3 \mu\text{Ci/mL}$ de timidina tritiada (Amersham, Pharmacia) y se dejó incubar por 30 min para permitir la incorporación de la radiomarca. Posteriormente se eliminó el medio radiactivo y las células fueron lavadas tres veces con PBS para eliminar el exceso de timidina. Después se agregaron $500 \mu\text{L}$ de EDTA-SDS (10 mM, 0.1%) y se dejó en reposo durante 20 min a temperatura ambiente para lisar las células. Una vez transcurrido este tiempo se adicionaron $500 \mu\text{L}$ de ácido tricloro acético (TCA) frío al 10 % y la mezcla se dejó reaccionar 50 min en un baño de hielo para la precipitación de lisados celulares.

Por otro lado, un trozo de membrana de nitrocelulosa (0.45μ de aproximadamente 12 X 8 cm) (BioRad) se mojó con TCA 10 % frío y se colocó en un dispositivo de filtración para membranas de 25 plazas, donde se realizó la filtración de los lisados celulares. Una vez transcurrido el tiempo para la precipitación de los lisados celulares, el contenido de cada uno de los pozos de la microplaca fue filtrado en el dispositivo mencionado

anteriormente, realizando la transferencia de los lisado con ayuda de una micropipeta; una vez aplicados al dispositivo, cada uno de los lisados fue lavado con 3 mL de TCA frío al 5 %. Ya que se lavaron las muestras, las membranas fueron secadas a temperatura ambiente hasta eliminar toda la humedad.

Ya secas las muestras, los filtros fueron cortados y cada muestra se colocó en viales de centelleo a los cuales se les agregan 4 mL de líquido de centelleo (Beckman). Los viales son llevados al contador de centelleo líquido (Beckman LS 6500) y la radiación de las muestras producidas por la timidina tritiada es cuantificada en DPM, cuyo valor es directamente proporcional a la proliferación celular.

Estudios Biológicos: Estudios *in vitro* Sobre el Efecto de Lectinas de Frijol Tépari en Células Malignas

Estudio de viabilidad celular. Para estos estudios se utilizaron 12 líneas celulares malignas de diferentes tejidos y orígenes (Tabla 1) para cada una de estas líneas, se realizaron curvas de dosis-respuesta donde fue determinada la viabilidad, la cual es expresada en porcentaje de viabilidad.

Las concentraciones de lectina empleadas fueron determinadas de manera independiente para cada línea celular, dichas concentraciones fueron establecidas de acuerdo a estudios preliminares (datos no mostrados), variando de 0 $\mu\text{g/mL}$ hasta 400 $\mu\text{g/mL}$ con la finalidad de conseguir la concentración que fuera capaz de disminuir la viabilidad hasta un 50 % como mínimo.

Cultivo de células. Las células fueron descongeladas y transferidas a cajas petri (P100), provistas con 10 mL de medio de cultivo DMEM alto en glucosa (Gibco, México), suero fetal bovino (SFB) (Gibco, México) al 10 % y antibióticos (estreptomina y penicilina G sódica) al 1 % (el cual en los sucesivos será referido como medio completo), posteriormente las células fueron incubadas a 37 °C en atmósfera de CO₂, y 7 % humedad. Una vez que las células se adherían a la base de la caja petri, se realizó un cambio de medio de cultivo y las células fueron dejadas en incubación para su propagación a una confluencia del 90 al 100 %.

Las células ya en confluencia eran despegadas de la base de la placa con 3 mL de una solución de PBS con 1mM de EDTA. Una vez despegadas las células se añadían 7 ml medio DMEM fresco para neutralizar el efecto del EDTA y evitar que las células fueran dañadas. Posteriormente las células eran transferidas a tubos estériles y centrifugados por 5 min a 1500 r.p.m. (Beckman TJ-6, rotor I-94) a temperatura ambiente. Una vez concluida la centrifugación, el paquete celular era resuspendido en una cantidad conocida de medio completo. De esta suspensión se tomaban alícuotas de 50 µL, cada una de las cuales se mezclaban con 200 µL de solución de azul tripán (0.1 %) y se contaban las células vivas (células no teñidas) al microscopio invertido con ayuda de un hematocitómetro, determinándose de esta manera la cantidad de células en la muestra inicial.

Una vez establecidas la cantidad inicial de células, se tomaba una alícuota que contuviera la cantidad necesaria de células para los ensayos con lectinas.

Determinación de viabilidad celular. Para los ensayos de viabilidad celular Se utilizaron microplacas de 96 pozos en donde a cada pozo se administraron 1.0×10^4 células en 200 μL de medio completo, las células fueron incubadas a 37 °C en atmósfera de CO_2 , y 7 % humedad por 24 h para permitir que las células se adhirieran a la placa. Ya que las células se adhirieron, el medio de cultivo era cambiado por la solución de la lectina a ensayar en medio completo. Las células expuestas eran mantenidas en incubación por 24 h y al término del periodo de incubación se prosiguió a la determinación de viabilidad.

La viabilidad celular se determinó mediante la técnica de Sladowski (1993), la cual fue modificada de la prueba inicialmente realizada por Mosman (1983), la cual se basa en la reducción de la sal de tetrasolium, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2 y l)-2-5-difeniltetrazolium (MTT, Sigma), a un colorante formazán insoluble formado por las enzimas mitocondriales en las células viables.

Para la realización de los ensayos de viabilidad en las microplacas a cada pozo con células previamente expuestas a la lectina, se le aplican 10 μL de MTT (5 mg/mL en PBS), se dejaban reaccionar durante 3 h en incubación, para posteriormente eliminar el medio con MTT. Posteriormente a cada pozo se aplicaban 100 μL de dimetil sulfóxido (DMSO) concentrado.

con SFB al 0.5%, y la microplaca se agitaba en un agitador orbital durante 15 min. Una vez transcurrido este tiempo se leía la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 540 nm en un contador ELISA para microplacas (Labsystem Multiskan MS, México).

La viabilidad celular se calculaba considerando al valor de absorbancia de la muestra celular control (0 mg/mL de lectina), como el 100% de viabilidad celular y a partir de éste se calcularon los datos restantes de viabilidad para los diversos cultivos del ensayo.

Los datos de dosis inhibitoria se determinaron realizando curvas dosis-respuesta (concentración de lectina vs viabilidad celular (%)) en las cuales se determinó el valor de concentración (en el eje de las abcisas) tomando un valor de viabilidad del 75% (en el eje de ordenadas), el cual equivale a una disminución del 25% de la viabilidad celular (DI_{25}).

Estudios de proliferación y de post-incubación celular. Para determinar el efecto de las lectinas sobre la proliferación celular se realizaron ensayos en los cuales se emplearon cuatro líneas celulares: células de medula ósea (Sknsh), células de mama (MCF-7), células de colon (Sw480) y células de cervix (C33-A). Las líneas celulares empleadas fueron seleccionadas con base en las dosis inhibitorias 25 (DI_{25}) que se observaron en las pruebas de viabilidad celular descritas anteriormente, de acuerdo con los siguientes criterios: La línea MCF-7 debido a que presentó mayor sensibilidad hacia la lectina, las líneas SKNSH y Sw480, por presentar sensibilidad intermedia y

la línea C33-A ya que fue la línea celular que mostró mayor resistencia hacia la lectina.

Cada una de las líneas células fueron cultivadas con medio de cultivo completo hasta una confluencia entre el 90 y 100 %, posteriormente, las células se despegaron con PBS-EDTA, se centrifugaron, se resuspendieron en medio completo y se contaron en presencia de azul tripán como se describe anteriormente. Posteriormente las células fueron diluidas y se tomaron alícuotas que contuvieran 1.0×10^5 células/mL las cuales se sembraron en una microplaca de 24 pozos, de tal manera que en cada pozo quedaran 5.0×10^4 células. Por otro lado, se tomaron alícuotas de la solución celular que contuvieran 2.5×10^4 células/mL las cuales fueron sembradas en una microplaca de 96 pozos, a una densidad de 5.0×10^3 células/pozo.

Las microplacas de 24 y 96 pozos sembradas con células se dejaron en incubación por 24 h para que se adhirieran las células a la microplaca. Una vez que las células se adhirieron, el medio de cultivo fue eliminado y sustituido por medio de cultivo completo, con diferentes concentraciones de lectina (0, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$) una vez expuestas a la lectina las células se dejaban en incubación por 24 h al término de los cuales se determinaba la proliferación.

Las células sembradas en las microplacas de 24 pozos se utilizaron para analizar la proliferación celular por incorporación de timidina tritiada (ver arriba), realizándose los ensayos con quintuplicado; mientras que las células cultivadas en microplaca de 96 pozos se utilizaron para analizar la

proliferación celular por metabolismo, empleando la técnica de azul de tetrazolium (MTT), siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Se realizaron estudios de post-incubación de lectinas en células malignas, para lo cual se prosiguió de manera similar a la descrita anteriormente con las cuatro líneas celulares; células de medula ósea (Sknsh), células de mama (MCF-7), células de colon (Sw480) y células de cervix (C33-A). En este estudio cada línea celular fue sembrada en dos microplacas de 24 pozos, en donde cada pozo tendría 5.0×10^4 células y por otro lado se sembraron dos microplacas de 96 pozos, en donde en cada pozo se sembraron 5.0×10^3 células.

Las microplacas de 24 y 96 pozos con células se dejaron en incubación por 24 h para que se adhirieran las células a la microplaca. Una vez que las células se adhirieron, el medio de cultivo fue eliminado y sustituido por las diferentes diluciones de lectina disueltas en medio de cultivo completo (DMEM, SFB y antibiótico), siendo las diluciones de lectina probadas: 0, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Una vez expuestas a la lectina las células se dejaban en incubación por 24 h. Al término de este periodo la solución de lectina fue sustituida por medio completo y las células se dejaron nuevamente en incubación por 24 y 48hr.

Después de cada uno de dichos periodos de incubación las células incubadas en microplacas de 24 pozos se utilizaron para analizar en efecto post-incubatorio de las lectinas por medio de la técnica de incorporación de timidina tritiada (ver arriba), realizándose los ensayos por quintuplicado. Las células incubadas en las microplaca de 96 pozos se utilizaron para analizar

el efecto post-incubatorio mediante metabolismo, empleando la técnica de azul de tetrazolium (MTT), siguiendo la metodología descrita anteriormente. La proliferación celular es calculada considerando que la muestra control (0 mg/mL de lectina) corresponde al 100% de proliferación y a partir de éste se calculó el índice proliferativo para los diversos cultivos del ensayo.

Análisis Estadístico de Datos.

Los resultados obtenidos en los estudios biológicos fueron analizados estadísticamente realizándose análisis de varianza y para analizar la diferencia entre medias se empleó la prueba de rangos múltiples de Tukey ($P < 0.05$), empleando el paquete estadístico Statgraphics Plus para windows versión 4.0.

RESULTADOS

Purificación de Lectina

La lectina de frijol tépari, fue purificada por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de afinidad, empleando fetuina inmovilizada en una matriz de agarosa (mini-leak, Kem en Tec, Dinamarca) de donde se obtuvo un solo pico al ser eluido con una solución ácida de glicina (50 mM, pH 2.5) (Figura 1). Dicho pico al ser probada su aglutinación en eritrocitos humanos se observó que correspondía a una proteína altamente hemaglutinante, que correspondía a una lectina.

En la Tabla 2 se presentan los datos de rendimiento y hemaglutinación obtenidos de la lectina durante su purificación. En esta Tabla se puede observar que los resultados de las pruebas cuantitativas de hemaglutinación con eritrocitos del grupo sanguíneo A y O mostraron que en esta fracción purificada de lectina se recuperó solamente el 10 % de la actividad hemaglutinante medida en el extracto crudo. Por otro lado, en la fracción no unida se observó que presentaba un alto título de hemaglutinación entre el rango de 65636 hasta 524288. Estos resultados sugieren que pueden existir otras fracciones con actividad hemaglutinante, las cuales no mostraron afinidad hacia la matriz de fetuina.

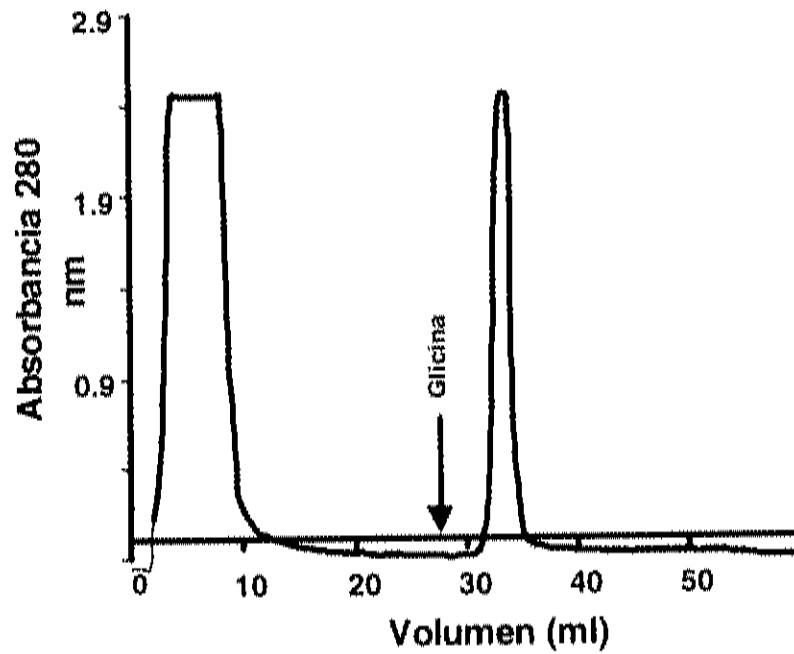


Figura 1. Patrón cromatográfico de lectina de frijol tépari en columna de afinidad con matriz de fetuína inmovilizada en una matriz de agarosa (minileak). La flecha vertical indica cuando la columna fue eluida con una solución ácida de glicina (50 mM, pH 2.5)

Tabla 2. Purificación de Lectina de Frijol Tépari

Fracción	Proteína Total (mg)	Actividad Hemaglutinante		Rendimiento (%)
		Actividad Total (Titulo)	Actividad Específica (titulo/mg proteína)	
Extracto Crudo	704.08	65536	57300	100
Cromatografía en Fetuína	20.22	8192	203000	10

Los eritrocitos fueron previamente tripsinizados

Para los objetivos de este estudio los experimentos realizados solamente se enfocaron a la descripción de la fracción que mostró afinidad hacia la fetuina.

En la Figura 2 se presenta el patrón electroforético realizado en condiciones desnaturalizantes y reductoras de la lectina de frijol tépari purificada, donde se puede observar solo una banda correspondiente a la lectina, lo cual muestra que la proteína hemaglutinante fue purificada sin la presencia de otras proteínas.

Caracterización Bioquímica de la Lectina del Frijol Tépari

Estimación de Peso Molecular

El peso molecular de la hemaglutinina purificada fue determinado por varios métodos. En primera instancia, SDS-PAGE en condiciones reductoras presentado en la Figura 2, donde se muestra únicamente una banda con un peso molecular de 31 kDa; sin embargo el análisis de la fracción de lectina purificada, por MALDI-TOF reveló la presencia de dos especies con pesos moleculares de 28 y 31 kDa.

La separación por electroforesis (PAGE) en condiciones nativas (Figura 3), presentó una banda amplia con peso molecular estimado en un rango de 132 y 153 kDa. Estos resultados sugieren que la lectina en su forma nativa forma un oligómero el cual está formado por al menos cuatro subunidades.

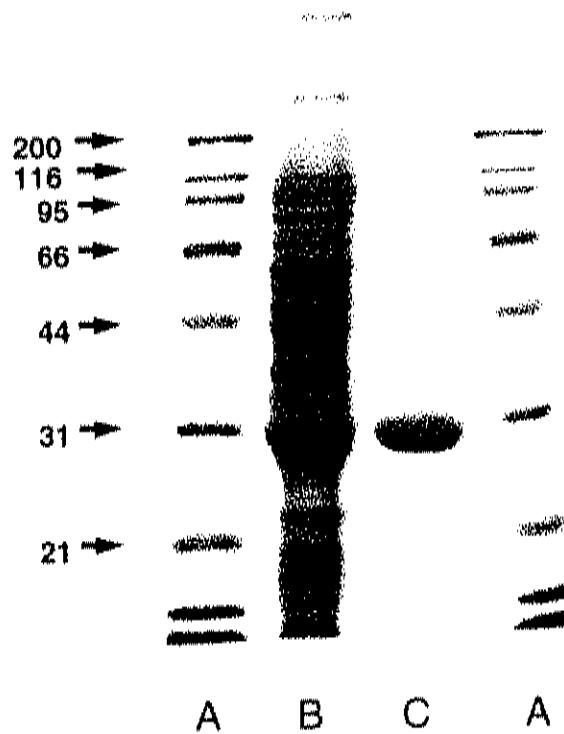


Figura 2. Perfil de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en condiciones desnaturalizantes y reductoras de lectina de frijol tépari. a.- marcadores de peso molecular, b.- extracto proteico de frijol, c.- lectina pura de frijol tépari.

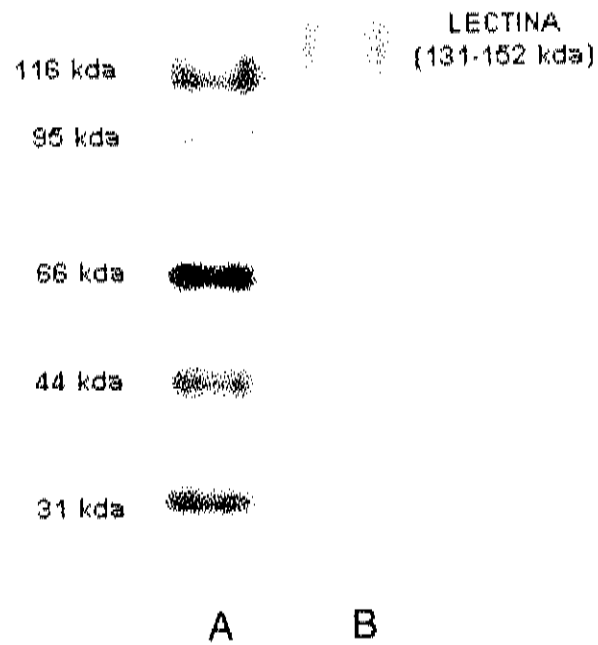


Figura 3. Patrón de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas. a. marcador de peso molecular, b. lectina pura de frijol tépari.

Para confirmar los resultados obtenidos en lo referente al patrón de oligomerización se prosiguió a realizar otra serie de estudios. Por un lado, una muestra de lectina fue inyectada a una columna TSK 3000 sw de exclusión por tamaño empleando PBS como solución de elusión y se obtuvo un peso molecular de 62 Kda, cuyo patrón cromatográfico es mostrado en la Figura 4. Contrastante a los resultados obtenidos por PAGE nativa, este resultado sugiere que la lectina, bajo estas condiciones se comporta como un dímero.

Con el objeto de resolver esta aparente contradicción de resultados, se probó el efecto de la fuerza iónica sobre la oligomerización de la lectina. Para este propósito se realizó una serie de ensayos de cromatografía de exclusión por tamaño en la lectina, con una columna Superose 12. La primera corrida se realizó empleando una solución reguladora de MES 25 mM, pH 6.0 con la cual fue eluida la lectina. Bajo estas condiciones se obtuvo un peso molecular de 123 Kda (Figura 4) con lo cual se corroboró el comportamiento tetramérico de la lectina oligomérica. En una segunda corrida en la cual a la solución reguladora de MES (25 mM, pH 6.0) se le agregó NaCl (1 M), con el cual los resultados cromatográficos arrojaron un peso molecular de 53 kDa, el cual es muy cercano a un comportamiento dímérico de la lectina. Estos resultados demostraron que la concentración de sales afecta la oligomerización de la lectina, disminuyendo el grado de oligomerización al aumentar la fuerza iónica del solvente.

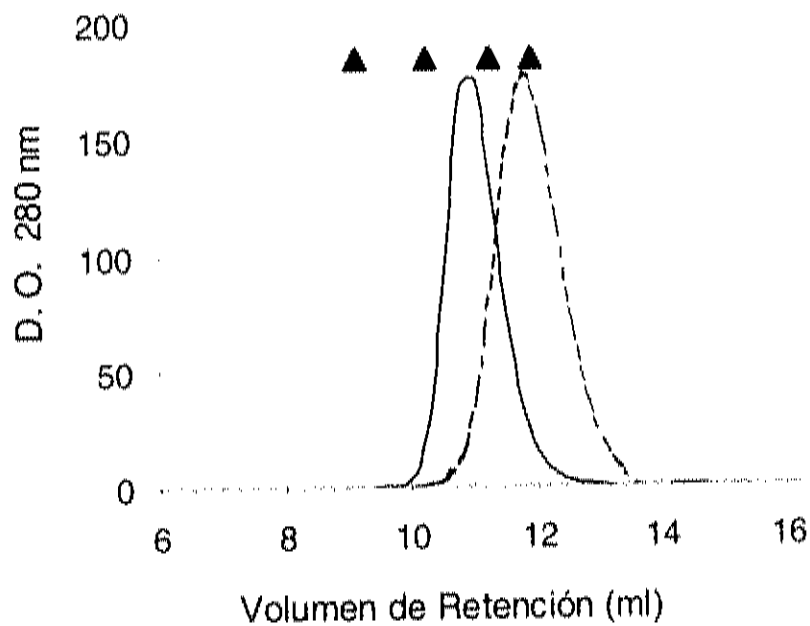


Figura 4. Cromatografía de exclusión en gel de la lectina de frijol tépari purificada la línea sólida corresponde a la muestra eluída con la solución de baja fuerza iónica (mes 25 mm, pH 6.0). la línea punteada corresponde a la lectina eluída con una solución de alta fuerza iónica (mes 25 mm, NaCl 1m, ph 6.0). ▲ Marcadores de peso molecular (440, 232, 66, 44 kDa).

Determinación del Punto Isoeléctrico (PI) y Electroforesis en Dos Dimensiones.

El análisis de la fracción hemaglutinante del frijol tépari mediante electroforesis de enfoque isoeléctrico mostró principalmente tres bandas con valores de punto isoeléctrico muy cercanos (4.2, 4.4 y 4.5), indicados como a, b y c respectivamente en el patrón densitométrico mostrado en la Figura 5a. De acuerdo a estas observaciones, el estudio de electroforesis en dos dimensiones (enfoque isoeléctrico en la primera y SDS-PAGE en la segunda) mostrado en la Figura 5b, reveló que estas diferentes especies (cuyos valores de PI concuerdan con los anteriormente mencionados) poseen el mismo peso molecular. A partir de este gel de dos dimensiones se cortaron diferentes secciones (indicadas en la Figura 5b), mismas que se digirieron con tripsina y se inyectaron a un aparato de Cromatografía de alta presión acoplado a un espectrómetro de masas/masas (LC/MS/MS) con el cual se obtuvieron porciones de la secuencia de aminoácidos de dichas especies (ver abajo).

Composición de Aminoácidos

En la Tabla 3 se muestran los resultados del estudio sobre la composición de aminoácidos, la cual fue determinada mediante hidrólisis ácida y derivatización con O-phtalaldehído, siendo detectados mediante cromatografía de líquidos de alta presión, empleando una columna C-18 de fase reversa. Los resultados muestran que entre los aminoácidos que se

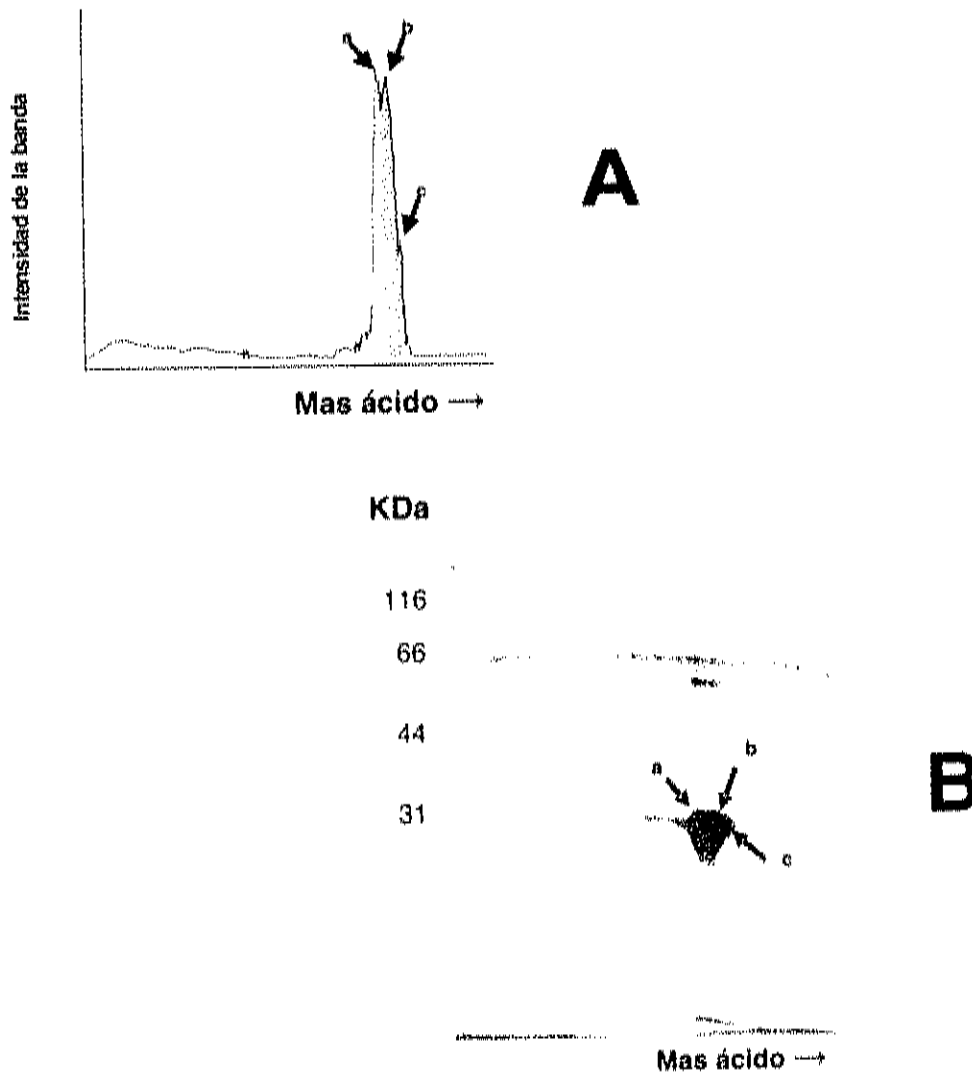


Figura 5. Separación de la lectina de frijol tépari en electroforesis de isoelectroenfoco y electroforesis de dos dimensiones. (a) patrón densitométrico del punto isoeléctrico de la lectina de frijol tépari (b) electroforesis de dos dimensiones donde dimensión horizontal corresponde al isoelectroenfoco y la vertical a la separación por peso molecular (SDS-PAGE). Las tres principales especies (pI 4.2, 4.4 y 4.5) se identifican con las letras a, b y c.

Tabla 3. Composición de aminoácidos de Lectina de Frijol Tépari

AMINOACIDOS	Concentración (ng)	PORCENTAJE
Lisina	10.91	0.24
Acido Glutámico	21.25	0.47
Alanina	34.53	0.77
Valina	52.22	1.17
Histidina	109.50	2.45
Tirosina	190.64	4.26
Arginina	190.92	4.27
Fenilalanina	257.31	5.75
Acido aspártico	269.82	6.03
Serina	347.55	7.77
Treonina	396.12	8.85
Isoleucina	401.79	8.89
Metionina	460.67	10.29
Leucina	472.22	10.55
Glicina	1259.25	28.14

encuentran en mayor cantidad esta la glicina, seguido por la leucina, metionina e isoleucina, mientras que por otro lado la lisina, ácido glutámico y alanina, fueron los que se encontraron en menor concentración.

Contenido de Carbohidratos

El análisis de fenol sulfúrico mostró que esta lectina es una glicoproteína con un contenido total de carbohidratos de 6.4%.

Contenido de Metales

Los resultados de análisis de metales en la lectina de frijol tépari realizado por espectrometría de plasma se presentan en la Tabla 4, donde la concentración de metales en la lectina se reportan en partes por millón (ppm). Los datos obtenidos muestran que el calcio fue el que se encontró en mayor concentración (10739.9 ppm), mientras que el cromo fue el que se encontró en más baja concentración (19.8 ppm); no encontrándose residuos de cadmio.

Secuenciación de Fragmentos Tripticos de Lectina

Los espectros de masas de los productos tripticos de las proteínas separadas mediante electroforesis de 2 dimensiones (datos no mostrados) mostraron patrones de fragmentación correspondientes a una misma proteína, cuya secuencia fue reportada originalmente por Mirkov y col (1994)

Tabla 4. Concentración ^a de Metales en Lectina de *Phaseolus acutifolius*

Metales	Concentración (ppm)
Ca	10739.9
Cu	2528.8
Zn	847.3
Mg	453.8
Fe	324.6
Mn	240.5
Cr	19.8

^a Determinados por espectrometría de plasma y la concentración fue calculada por regresión lineal empleando estándares de metales Perkin Elmer.

como un posible precursor de fitohemaglutinina L de *Phaseolus acutifolius* de lectina en estudios de secuenciación de ADN.

Propiedades Bioactivas de la Lectina del Frijol Tépari.

Actividad Hemaglutinante

En la determinación de la actividad hemaglutinante se emplearon eritrocitos humanos del grupo sanguíneo A y O, previamente tripsinizados. En estos ensayos, se comparó la actividad hemaglutinante de la lectina de frijol tépari con la lectina de *Canavalia ensiformis* (Concanavalina A).

En la Tabla 5, se muestran los resultados de hemaglutinación de la lectina purificada en comparación con aquellos obtenidos con Concanavalina A. Los resultados muestran que la lectina de frijol tépari tiene una actividad hemaglutinante específica 200 veces mayor que la Concanavalina A cuando es probada en eritrocitos humanos tripsinizados del tipo A, mientras que en los de tipo O esta actividad fue solamente 64 veces mayor.

Por otro lado, cuando se realizó la prueba de hemaglutinación empleando eritrocitos no tripsinizados se observó que la actividad hemaglutinante fue considerablemente menor que cuando eran tripsinizados (datos no mostrados).

Tabla 5. Actividad Hemaglutinante de Lectina Purificada de *Phaseolus acutifolius*

Lectina	Concentración de Lectina (mg/mL)	Eritrocitos humanos tripsinizados (Actividad Hemaglutinante)	
		Tipo A	Tipo O
Tépari	3.5	292.6	36.6
Concanavalina A	3.5	1.1	0.57

Inhibición de la Actividad Hemaglutinante

Para esta prueba se emplearon glicoproteínas, glicopéptidos, oligosacáridos y azúcares sencillos. La prueba de inhibición se realizó en microplacas de 96 pozos, empleando eritrocitos humanos tripsinizados. En estos experimentos se mantuvo constante la concentración de lectina, mientras que la concentración de glicanos o glicoconjugados fue variando, registrando la concentración correspondiente al carbohidrato que producía inhibición de la hemaglutinación.

Los resultados obtenidos mostraron que los glicopéptidos, oligosacáridos y azúcares sencillos no presentaron efecto inhibitorio de la aglutinación, mientras que como se puede observar en la Tabla 6, las glicoproteínas estudiadas fueron las que presentaron efecto inhibitorio tanto con eritrocitos del grupo sanguíneo A como en los del grupo sanguíneo O.

Afinidad de la Lectina hacia Glicopéptidos

El análisis se realizó mediante cromatografía de afinidad empleando lectina inmovilizada en una matriz de poliacrilamida-azlactona a una densidad de 30 mg de lectina por mililitro de gel. Se empacaron 2 mL de la resina a una columna, donde se hicieron pasar glicoconjugados de tiroglobulina preparados por hidrólisis con tripsina y termolisina. La columna se lavo con 10 volúmenes de una solución de TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 5 mM MgCl) para recuperar el material excluido y el retardado. Para -

Tabla 6. Efecto de Carbohidratos sobre la Inhibición de la Hemaglutinación de Lectina

CARBOHIDRATO	Concentración inhibitoria de carbohidratos ^a (mg/mL)	
	Eritrocitos humanos ^b Tipo O	Eritrocitos humanos ^b Tipo A
GLICOPROTEINAS		
GNT V	1.7 X 10E-3	27.34 X 10E-3
Fetúina	78.1 X 10E-3	156.25 X 10E-3
Fibrinógeno	9.8 X 10E-3	39.1 X 10E-3
Tiroglobulina	4.8 X 10E-3	4.8 X 10E-3
Ovoalbúmina	1.25	1.25
Conalbúmina	1.2	5

^a Menor concentración que presento completa inhibición

^b Ensayo realizado empleando eritrocitos tripsinizados

la elusión del material adsorbido a la lectina se aplicó una solución de glicina 50 mM y NaCl 150 mM.

Para probar la efectividad de la columna y del perfil de elusión se utilizó fetuina bovina como referencia, observándose que ésta era adsorbida por la columna de afinidad y que así mismo era eluída por la solución de glicina-NaCl (50 mM-150 mM) (datos no mostrados). Así mismo, como control negativo, se aplicó seroalbúmina bovina, la cual no fue adsorbida ni retardada por la columna de afinidad (datos no mostrados). De esta manera, se utilizó el patrón de elusión de esta última proteína como referencia para indicar en las sucesivas corridas la posición de las fracciones excluidas (que no se unen a la lectina) con respecto a las fracciones retardadas (ver Fig. 6).

Mediante esta técnica se observó que los glicopéptidos de tiroglobulina poseen una fracción que fue retardada en la columna de afinidad. Basándose en las observaciones del perfil de elusión, el cromatograma fue dividido en 3 partes: Fracción 1, que son los glicopéptidos no unidos (determinados con respecto a la posición de elusión de la seroalbúmina bovina) y las Fracciones 2 y 3, que corresponden a los glicopéptidos que fueron retardados por la columna de afinidad. Posteriormente las muestras obtenidas fueron secadas bajo condiciones de presión reducida y aplicadas a una columna Sephadex G-15 para su desalado empleando un buffer volátil (100 mM NH_4HCO_3 , 1% n-butanol) y el contenido de azúcares fue medido por el método del fenol sulfúrico,

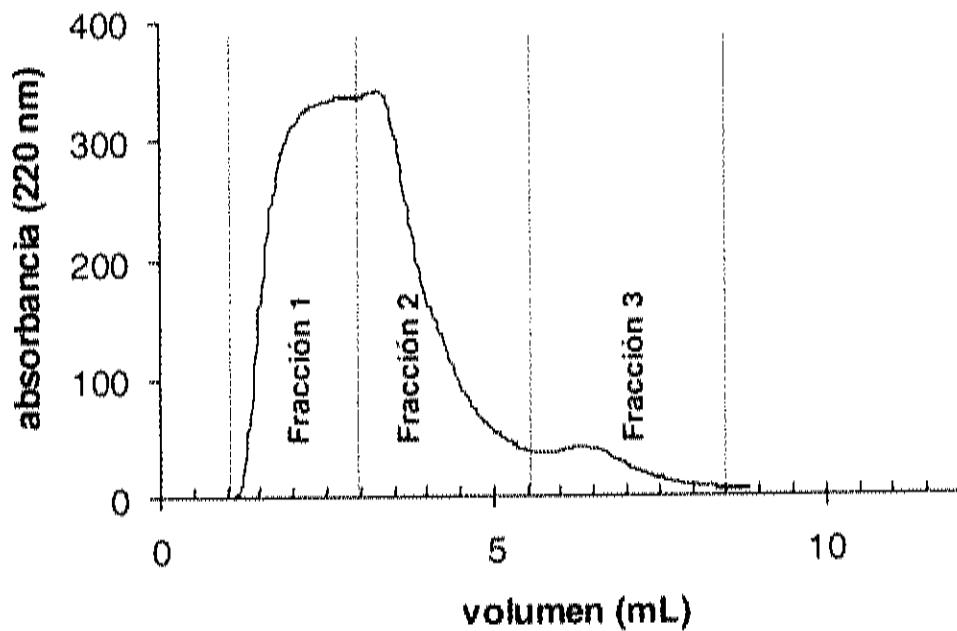


Figura 6. Cromatografía de afinidad de glicopéptidos de tiroglobulina separados en una columna de lectina de frijol tépari inmovilizada en una matriz de fractogel-azlactona. Las fracciones 1, 2 y 3 (indicadas en la figura) fueron colectadas por separado y analizadas para establecer su composición de monosacáridos (ver tabla 3).

empleando glucosa como estándar. Posteriormente las fracciones desaladas fueron derivatizadas con reactivo Tri-sil y analizadas por cromatografía de gases, para determinar su composición de carbohidratos.

En la Tabla 7 se muestra la composición de azúcares de las tres fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad, en donde puede observarse un aumento en la concentración de N-acetilglucosamina en la Fracción 3.

Actividad Mitogénica

El ensayo de la actividad mitogénica de las lectinas de frijol tépari (LT), frijol común (PHA) y concanavalina A (Con A), se llevó a cabo por cuantificación de la incorporación de timidina tritiada en linfocitos humanos.

En la Figura 7 se presentan los resultados obtenidos del estudio de mitogenicidad, realizado con las tres lectinas, (LT, PHA, Con A). Los estudios muestran que las lectinas son altamente mitogénicas, siendo PHA y Con A las que presentan mayor actividad mitogénica, observándose el punto de mayor estimulación mitogénica para éstas, a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$; mientras que la lectina de tépari requirió una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ para producir la máxima mitogenicidad en los linfocitos.

Tabla 7. Composición de Carbohidratos de Glicopeptidos con Afinidad hacia Lectina de *Phaseolus acutifolius*

Residuos de carbohidratos	Glicopéptidos de Tiroglobulina ^a		
	(moles %)		
	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3
Fucosa	5.8	5.5	3.9
Manosa	49.1	43.8	26.0
Galactosa	15.5	14.9	15.8
N-acetil glucosamina	22.6	29.6	40.5

^a glicopéptidos fueron obtenidos de tiroglobulina por hidrólisis enzimática con termolisina

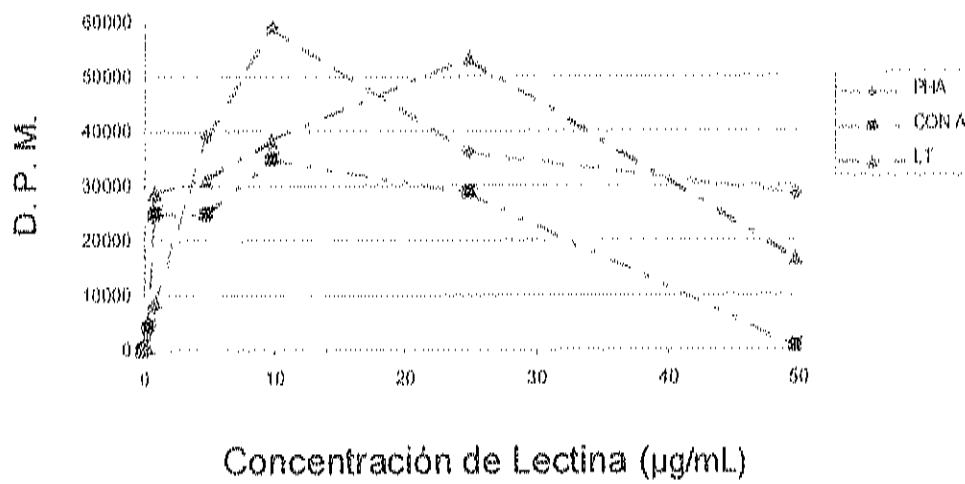


Figura 7. Efecto mitogénico de lectinas sobre linfocitos humanos
PHA - Lectina de frijol común, Con A - Concanavalina A, LT -
lectina de frijol tépari

Estudios Biológicos: Estudios *In vitro* Sobre el Efecto de Lectinas de Frijol

Tépari en Células Malignas

Los estudios biológicos fueron divididos en tres partes; en primer lugar se realizaron análisis de viabilidad celular empleando 13 líneas celulares malignas de diferentes orígenes. A partir de estos estudios se seleccionaron cuatro líneas celulares considerando su sensibilidad o resistencia a la lectina de frijol tépari y con estas cuatro líneas se realizaron estudios de proliferación celular. Por último se estudió el efecto post-incubatorio en las células después de haber sido primero expuestas por 24 h con lectina de frijol tépari y posteriormente incubadas por 24 y 48 h en medio de cultivo completo (DMEM, SFB y antibiótico).

Estudios de Viabilidad Celular

En el estudio de viabilidad celular se realizaron curvas dosis-efecto y se determinaron las DI_{50} para cada una de las 13 líneas celulares. A continuación se presentan los resultados obtenidos en este estudio de viabilidad celular. La Tabla 8 muestra las DI_{50} calculadas para las 13 líneas celulares malignas estudiadas, donde se puede observar que las líneas Mda, Hep-G2 y C33-A, mostraron una mayor resistencia al efecto citotóxico de las lectinas de frijol tépari; mientras que en el resto de las líneas celulares estudiadas las DI_{50} se encontraron entre el rango de 61 a 203 $\mu\text{g/mL}$ de lectina.

La Figura 8, se muestra seis gráficos de concentración de lectina vs viabilidad celular, en donde se presentan diferentes comportamientos de las líneas celulares. La línea T-24 (Figura 8-A) muestra una marcada disminución de la viabilidad celular hasta aproximadamente el 43% a una concentración máxima probada de 100 $\mu\text{g/ml}$. En las células 293 (Figura 8-B) se probó el efecto citotóxico de la lectina hasta una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$, obteniéndose una disminución en la viabilidad del 75%; la línea Sw13 presentada en la Figura 8-C, la cual se probó hasta 300 $\mu\text{g/mL}$ de lectina, se observó que a esta concentración la viabilidad celular se reducía hasta aproximadamente 22%. Para las células CaSki, probada hasta 200 $\mu\text{g/mL}$ de lectina, la viabilidad registrada fue de 40% a esa concentración, mientras que para las células HeLa y Mda (Figuras 8-E y 8-F) los datos de viabilidad observados fueron de 50 y 55% respectivamente, a una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$. Algo muy importante que se puede observar en la gráfica es que el comportamiento de cada una de las líneas celulares expuestas a la lectina es diferente, así mismo se puede ver que la sensibilidad y la resistencia de cada línea es muy variable, ya que algunas de ellas muestran mas sensibilidad a concentraciones relativamente bajas de lectina, como es el caso de la T-24, mientras que otras células, como es el caso de la Mda, C-33 y Hep-G2 a dosis considerablemente altas (300 $\mu\text{g/mL}$) no se observa un efecto marcado sobre la viabilidad celular y que aún a esa concentración no se logró calcular la DI_{50} .

Efecto de Lectinas Sobre la Proliferación Celular y Efecto Post Incubatorio de Lectinas en Células Malignas

Una vez calculadas las DI_{50} para cada línea celular y tomando en cuenta el comportamiento general de las curvas de concentración de lectina vs viabilidad celular, se seleccionaron cuatro líneas celulares, las cuales fueron empleadas para el estudio de proliferación celular y para el estudio de post-incubación. Así mismo considerando los datos obtenidos del estudio de viabilidad celular, se seleccionaron cuatro concentraciones de lectina, las cuales fueron empleadas en dichos estudios.

Las cuatro líneas celulares seleccionadas fueron MCF-7, por ser una de las más sensibles al efecto citotóxico de la lectina; las Sknsh y Sw480 debido a que presentaron efecto intermedio y la C33-A por ser la línea que presentó mayor resistencia al efecto de la lectina de Frijol tépari.

La elección de las concentraciones para los análisis de proliferación celular fueron: 0, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$, las cuales fueron elegidas considerando los datos de viabilidad celular, estimándose que entre este rango de concentración se encontraría aquella que mantuviera aproximadamente un 80% de la población celular viva y que así mismo estas concentraciones fueran suficiente para estudiar el efecto inhibitorio de la lectina sobre la proliferación celular.

A continuación se presentan los resultados de los estudios de proliferación celular para las cuatro líneas seleccionadas realizados tanto por

Tabla 8. Dosis Inhibitoria 50 (DI_{50}) Calculadas para 13 Líneas Celulares Malignas

LINEA	DI_{50}
MCF-7	61.8
T-24	89.9
293	104.2
SKNSH	115.8
Sw13	107.6
Siha	122.3
CaSki	137.4
A431	169.3
Hela	200.0
Sw480	203.2
MDA	>300
Hep-G2	>300
C33-A	>400

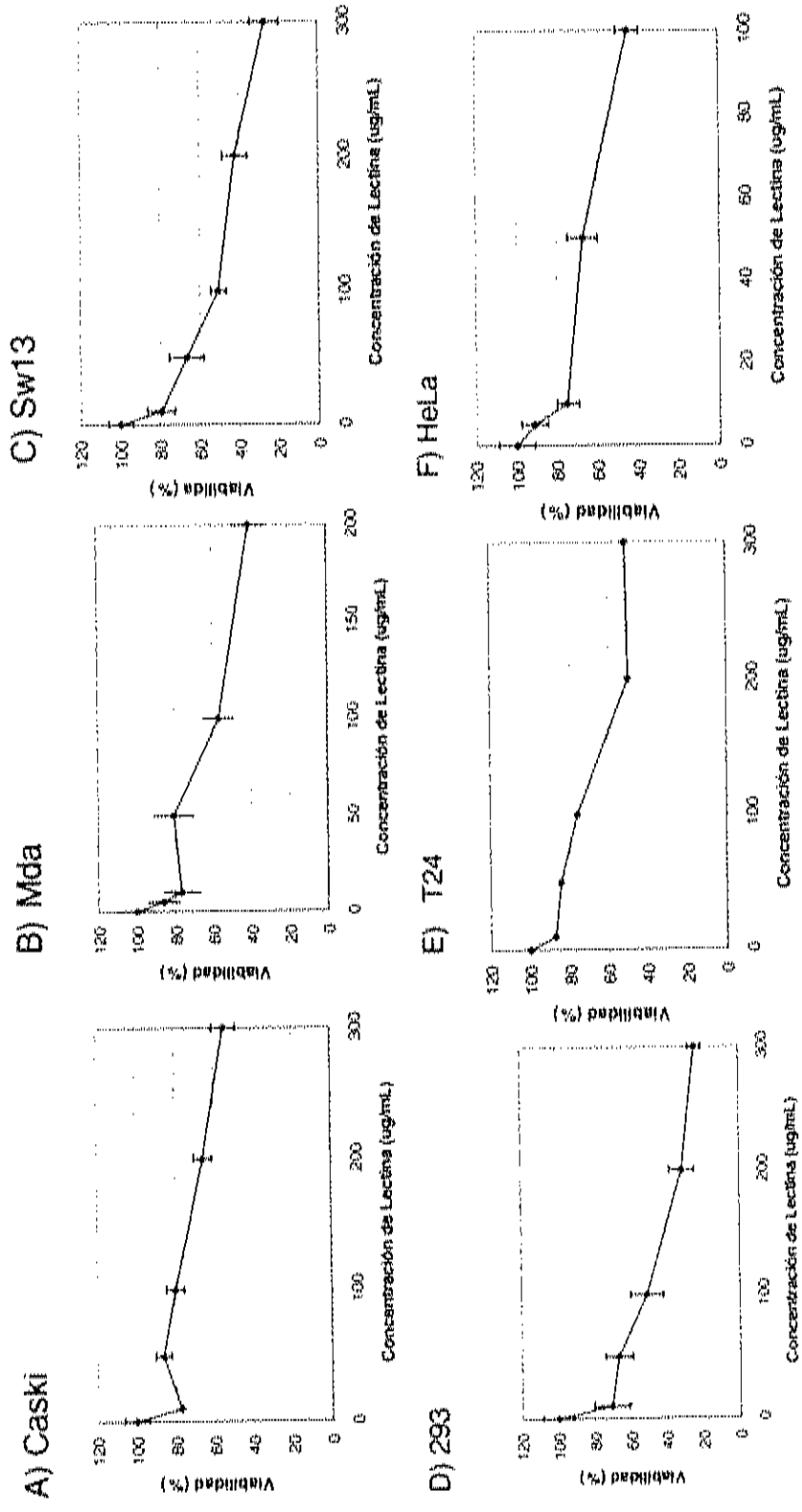


Figura 8. Efecto de las lectinas de frijol tepari sobre la viabilidad en células malignas.

la técnica de MTT como por la técnica de timidina tritiada ($[^3\text{H}]$ timidina), bajo las condiciones mencionadas en la sección de materiales y métodos.

Efecto de lectinas sobre la proliferación celular determinada mediante la técnica de MTT. En la Tabla 9 se presentan los resultados obtenidos siguiendo la técnica de MTT, para las concentraciones de lectina de 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se reportan en densidad óptica (D.O.) \pm error estándar; además se muestran los resultados del análisis estadístico realizado en donde se comparan tanto entre líneas celulares como entre concentraciones de lectina. El MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium) fue elegido ya que es un compuesto que por acción mitocondrial enzimática de las células vivas es metabolizado, transformando la sal de tetrazolium, de color amarillo, a un producto formazán colorido, el cual puede ser detectado y cuantificado en un espectrofotómetro y de esta manera determinar la proliferación celular de una manera relativamente sencilla.

En las primeras filas de la Tabla 9, se muestran los resultados del estudio de proliferación celular después de 24 h exposición e incubación de las células con lectina de frijol téparí. No se observó diferencia estadística entre las concentraciones de lectina para ninguna de las líneas celulares estudiadas; ahora bien, al comparar entre las líneas celulares para cada concentración de lectina, se observó que la única línea que mostró ser

Tabla 9. Efecto de Lectinas de Frijol Tépari Sobre la Proliferación Celular*
Determinado por la Técnica de MTT

LINEA CELULAR	CONCENTRACION DE LECTINA (µg/mL)			
	10	25	50	100
LECTINA 24 H				
Sknsh	0.1093±0.006 ^a _w	0.1125±0.009 ^a _w	0.0996±0.004 ^a _w	0.1047±0.007 ^a _w
Sw480	0.234±0.032 ^b _{xy}	0.1716±0.018 ^b _{xyz}	0.1706±0.025 ^b _{xyz}	0.1396±0.012 ^b _w
MCF-7	0.0967±0.003 ^a _w	0.0945±0.004 ^a _w	0.097±0.004 ^a _w	0.09656±0.007 ^a _w
C33-A	0.1299±0.015 ^a _w	0.1086±0.01 ^a _w	0.1269±0.014 ^a _w	0.1069±0.009 ^a _w
POST INC 24 H				
Sknsh	0.1627±0.013 ^a _w	0.1418±0.009 ^a _{xyz}	0.1423±0.011 ^b _{xyz}	0.1185±0.006 ^a _w
Sw480	0.2586±0.037 ^b _w	0.2475±0.025 ^b _w	0.2317±0.03 ^b _w	0.1805±0.025 ^b _w
MCF-7	0.116±0.026 ^a _w	0.1189±0.013 ^a _w	0.1137±0.01 ^a _w	0.1068±0.012 ^a _w
C33-A	0.1813±0.02 ^a _{xy}	0.1551±0.016 ^a _w	0.1312±0.011 ^a _w	0.1178±0.007 ^a _w
POST INC 48 H				
Sknsh	0.2371±0.019 ^{bc} _w	0.2443±0.033 ^b _w	0.2159±0.024 ^b _{xyz}	0.1628±0.011 ^b _w
Sw480	0.2895±0.027 ^b _w	0.2895±0.027 ^c _{xy}	0.1949±0.018 ^b _{xyz}	0.1588±0.021 ^b _w
MCF-7	0.1234±0.013 ^a _{xyz}	0.1356±0.019 ^a _{xyz}	0.1212±0.016 ^a _{xyz}	0.1086±0.016 ^a _w
C33-A	0.2218±0.031 ^b _w	0.1826±0.022 ^b _{xyz}	0.1276±0.011 ^a _w	0.1218±0.012 ^a _w

a,b,c,d diferencias estadísticas por línea celular

xy,y diferencias estadísticas por concentración de lectina

* Datos reportados en Densidad Óptica (D.O.)

diferente fue la Sw480 en todas las concentraciones, mientras que las otras tres líneas celulares hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$).

La Figura 9 muestra el gráfico correspondiente a los resultados del estudio de proliferación celular, para cada una de las líneas celulares. Como se puede observar en las líneas Sknsh, MCF-7 y C33-A no se muestran cambios en los valores de D.O. al incrementar la concentración de lectina hasta 100 $\mu\text{g/mL}$, esto indica que la lectina no está ejerciendo ningún efecto sobre la proliferación celular. La línea Sw480, como se puede apreciar, observa una clara tendencia decreciente de la D.O., lo cual se traduce en una disminución de la población celular, dependiente de la concentración de lectina.

Al comparar el efecto de la concentración de lectina sobre la proliferación celular, como se puede ver en la Figura 10, la única línea en la que presentó efecto inhibitorio fue en la Sw480, mientras que en las otras tres líneas no se observó efecto considerable sobre la proliferación celular.

Efecto post-incubatorio con lectinas sobre la proliferación celular determinado mediante la técnica de MTT. Una vez realizado el estudio de proliferación celular, otro grupo de células fue empleado para estudiar el efecto post-incubatorio; en el cual las células fueron expuestas por 24 h a cuatro concentraciones de lectina (10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$), después la lectina fue retirada del medio de cultivo y se continuó incubando las células

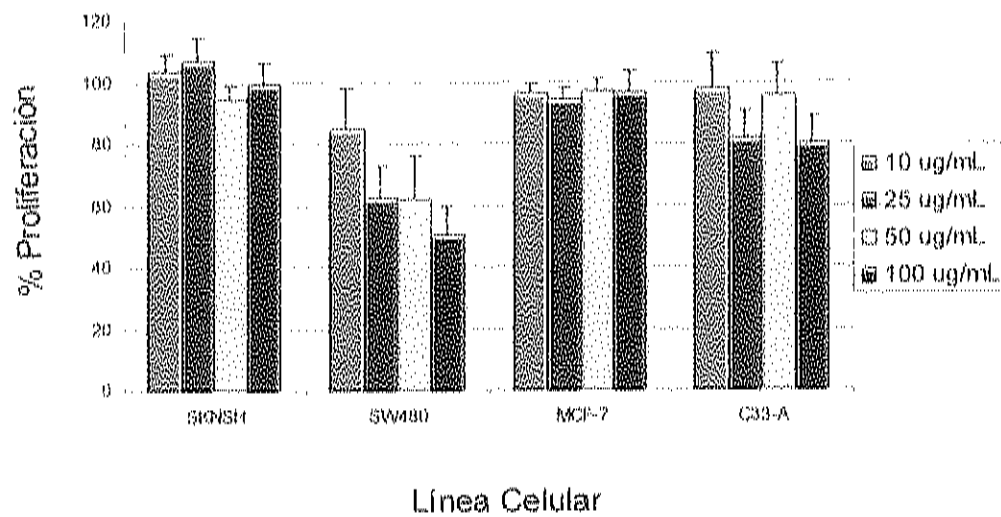


Figura 9. Efecto de lectinas de frijol tépari sobre la proliferación de células malignas, determinado por la técnica de MTT.

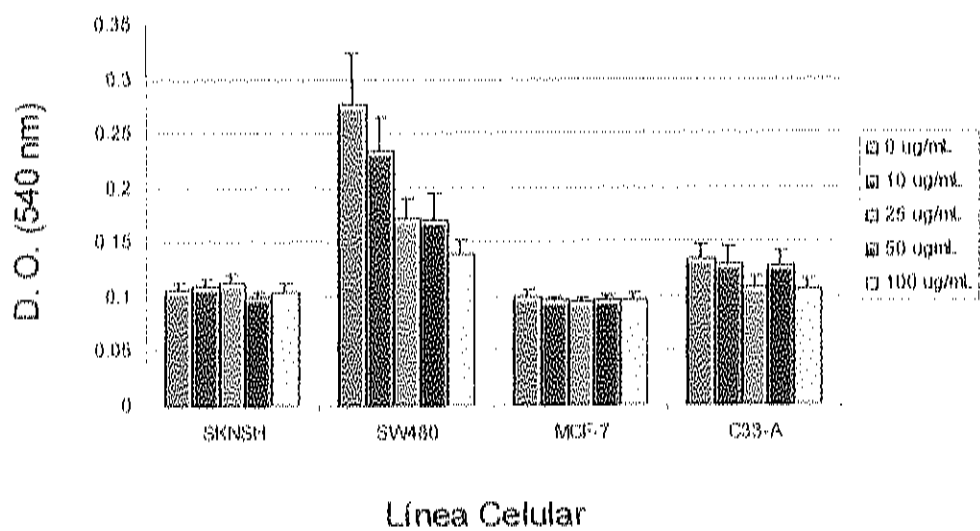


Figura 10. Efecto de lectinas de frijol tépari sobre la proliferación de células malignas después de 24 h de incubación determinado por la técnica de MTT.

por 24 y 48 h (post-incubación) únicamente con medio de cultivo completo. Seguido a la post-incubación, se determinó nuevamente la proliferación celular empleando la técnica de MTT, para que de esta manera se estableciera la capacidad de recuperación de las células o bien el efecto inhibitorio sostenido de las lectinas sobre la proliferación celular.

En la Tabla 9, en las filas intermedias, se presentan los resultados obtenidos después de 24 h de post-incubación, reportándose los datos obtenidos en unidades de densidad óptica (D.O.) para cada línea celular a las concentraciones de lectina estudiadas. Los resultados fueron analizados estadísticamente haciendo comparaciones entre las líneas celulares y entre las concentraciones para cada línea celular estudiada.

Las concentraciones de lectina de 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ para la línea Sknsh, fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) pero no para las demás concentraciones. En las líneas Sw480, MCF-7 y C33-A no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las concentraciones de lectina estudiadas. Ahora bien al comparar estadísticamente las líneas celulares a cada una de las concentraciones de lectina, se encontró que solamente la línea Sw480 presentó ser diferente a las otras tres líneas celulares en las cuatro concentraciones de lectina.

A las 48 h de post-incubación (Tabla 9) las concentraciones de lectina estudiadas no presentaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) en ninguna de las líneas celulares; así mismo al comparar las líneas celulares para cada concentración, tampoco hubo diferencias significativas entre líneas celulares en las concentraciones de lectinas.

En la Figura 11 se observa el efecto post-incubatorio para las cuatro líneas celulares. En las gráficas los resultados obtenidos después de la post-incubación son comparados con los datos obtenidos en el estudio de proliferación celular. La Figura 11-A correspondiente a la línea celular Sknsh muestra que la proliferación celular aumenta al incrementar el tiempo de incubación, lo cual demuestra que después de que las células han sido tratadas con lectina, estas son capaces de recuperarse una vez que la lectina es retirada; y que dicha recuperación incrementa al aumentar el tiempo post-incubatorio. En esta misma gráfica se puede ver que cuando las células han sido expuestas a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de lectina se presenta una disminución en la proliferación celular tanto a las 24 h como a las 48 h de post-incubación en comparación con las otras dos concentraciones estudiadas; esto muestra que a esa concentración, la lectina ha ejercido un mayor efecto citotóxico sobre las células, pero que a pesar de ello, las células son capaces de recuperarse una vez que la lectina es retirada del medio de cultivo.

En los datos post-incubatorios de las células Sw480 presentados en la Figura 11-B, donde se puede observar una tendencia hacia la recuperación de las células a las 24 h de post-incubación, viéndose aumentada la proliferación celular; por otro lado a 25 $\mu\text{g/mL}$ de lectina la recuperación de las células es mayor ya que la proliferación celular aumenta al incrementar el tiempo de post-incubación; mientras que a las concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ la proliferación es mayor a las 24 h que

a las 48 h, lo cual indica una mayor recuperación de las células a ese tiempo de post-incubación.

El efecto post-incubatorio de las células MCF-7 (Figura 11-C) mostró que independientemente de la concentración de lectina hay una recuperación de las células al aumentar el tiempo post-incubatorio y que dicha recuperación es superior a concentraciones menores de lectina.

El gráfico correspondiente a las células C33-A presentado en la Figura 11-D indica que a una concentración baja de lectina las células tienden a recuperarse al incrementar el tiempo post-incubatorio, mientras que a concentraciones mayores no hay efecto del tiempo post-incubatorio sobre las células, no observándose cambios importantes en la proliferación celular con respecto al tiempo.

Efecto de lectinas sobre la proliferación de células malignas empleando la técnica de timidina tritiada. Esta técnica fue seleccionada por ser mas precisa para la cuantificación de la proliferación celular, ya que al introducir un nucleótido radiactivo en el medio de cultivo, cuando las células proliferan introducen la timidina radiactiva en la cadena de ADN, permitiendo de esta manera determinar la concentración del nucleótido radiactivo y así determinar el índice proliferativo de las células de manera más exacta.

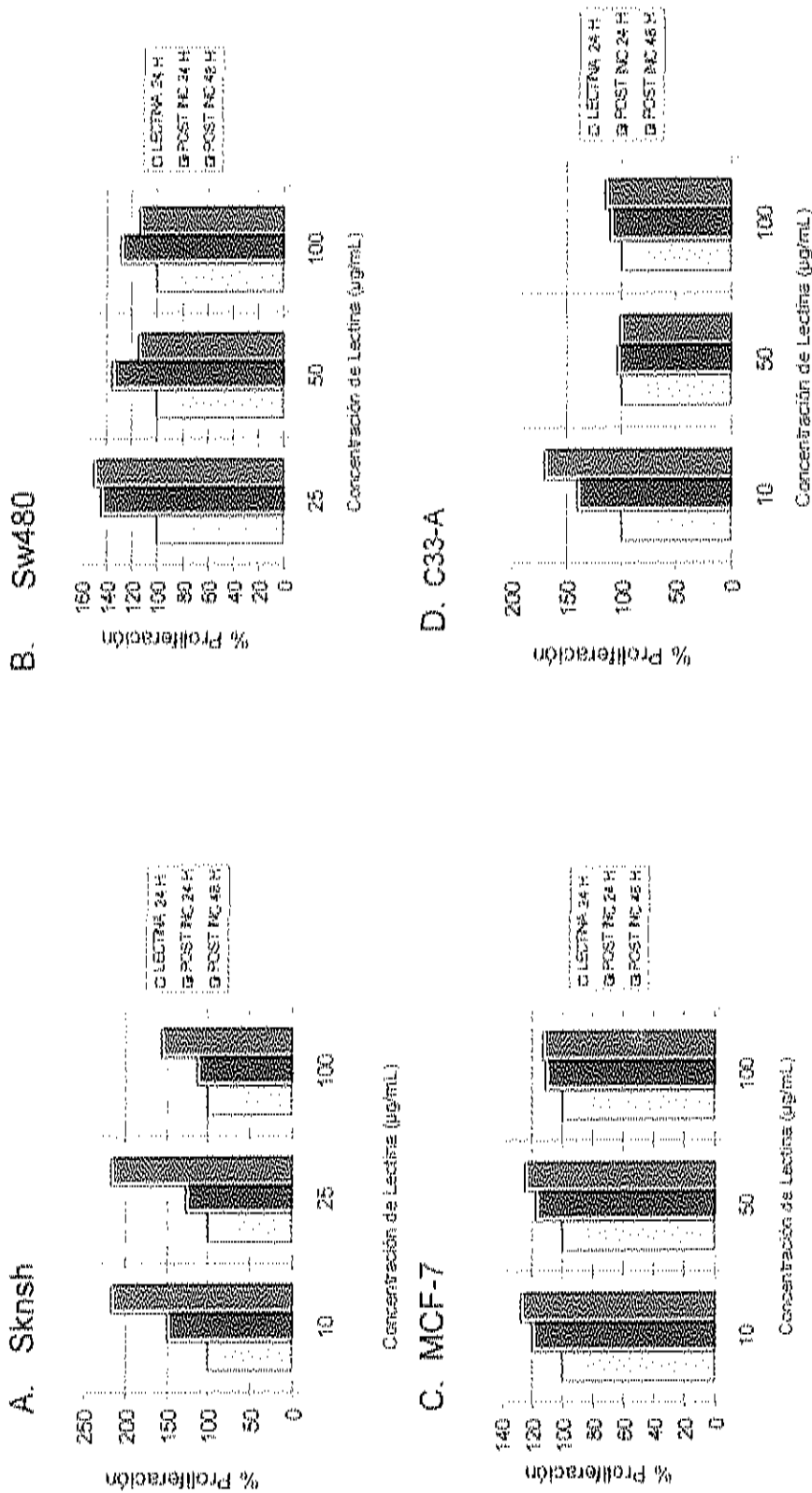


Figura 11. Efecto post-incubatorio de células malignas con lectinas de frijol tepari.

De los estudios de proliferación celular empleando esta técnica, se obtuvieron los resultados mostrados en las primeras filas de la Tabla 10, reportándose en desintegraciones por minuto, con sus respectivos errores estándar (DPM \pm error estándar). Estadísticamente no se observó diferencia en la mayoría de las concentraciones de lectina probadas para las cuatro líneas celulares ($P > 0.05$); solamente a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ se observó diferencia en las células Sw480.

Por otro lado, al comparar las líneas celulares a cada concentración, no se observaron diferencias entre líneas a 10 $\mu\text{g/mL}$; a 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$, las líneas Sknsh y Sw480 mostraron ser diferentes y a 100 $\mu\text{g/mL}$, las cuatro líneas fueron diferentes estadísticamente.

En la Figura 12 y 13 se muestran los resultados en DPM y en porcentaje de incorporación de [^3H] timidina para el ensayo de proliferación celular. En el gráfico de la Figura 12 se puede ver la tendencia que presentaron las líneas celulares a las concentraciones probadas. En la línea Sknsh, se observa un aumento en los valores de DPM, lo cual indica que las células continúan creciendo y que de algún modo la lectina ha estimulado hacia la proliferación de las células. En el caso de las células Sw480 se presenta una clara tendencia hacia inhibir la proliferación celular al incrementar la concentración de lectina; por otro lado en las células MCF-7 se observa una disminución en la proliferación a partir de la concentración mas baja (10 $\mu\text{g/mL}$) y dicha disminución, aunque ligera, continúa hasta la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo al incrementarse hasta 100 $\mu\text{g/mL}$,

Tabla 10. Efecto de Lectinas de Frijol Tépari sobre la Proliferación Celular*
Determinado por la Técnica de Timidina Triaada

LINEA CELULAR	CONCENTRACION DE LECTINA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	10	25	50
LECTINA 24 H			100
Sknsh	4156.3 \pm 324.5 ^{ab} _n	4876.8 \pm 259.9 ^{ac} _n	5749.3 \pm 545.7 ^c _n
Sw480	4467.8 \pm 265.3 ^b _n	4181.3 \pm 258.9 ^d _n	3742.1 \pm 203.4 ^e _n
MCF-7	2650.0 \pm 1016.3 ^{abc} _n	2476.5 \pm 194.2 ^{bc} _n	2464.3 \pm 86.2 ^{bc} _n
C33-A	3771.9 \pm 428.5 ^{abc} _n	2088.5 \pm 252.4 ^d _n	1879.6 \pm 253.2 ^d _n
POST INC 24 H			
Sknsh	3744.8 \pm 221.3 ^a _n	4254.5 \pm 243.0 ^d _n	4514.0 \pm 215.7 ^d _n
Sw480	2624.2 \pm 116.3 ^a _n	1843.8 \pm 79.4 ^b _n	884.3 \pm 45.1 ^e _n
MCF-7	3545.9 \pm 397.5 ^a _n	1298.6 \pm 51.1 ^e _n	1322.6 \pm 128.2 ^b _n
C33-A	7227.8 \pm 1132.5 ^a _n	2857.8 \pm 134.5 ^e _n	2026.8 \pm 105.6 ^e _n
POST INC 48 H			
Sknsh	1555.3 \pm 103.7 ⁿ	1634.3 \pm 189.4 ^{bc} _n	1617.3 \pm 209.9 ^d _n
Sw480	1679.8 \pm 108.5 ^a _n	858.6 \pm 54.7 ^a _n	553.1 \pm 36.16.5 ^a _n
MCF-7	6296.7 \pm 820.5 ^b _n	2952.7 \pm 232.2 ^{bc} _n	2222.8 \pm 116.2 ^c _n
C33-A	2128.9 \pm 167.1 ⁿ	2396.7 \pm 218.9 ⁿ	1928.1 \pm 95.8 ^{bc} _n

^{a,b,c,d} diferencias estadísticas por línea celular

^{n,x,y} diferencias estadísticas por concentración de lectina

* Datos reportados en Desintegraciones Por Minuto (DPM)

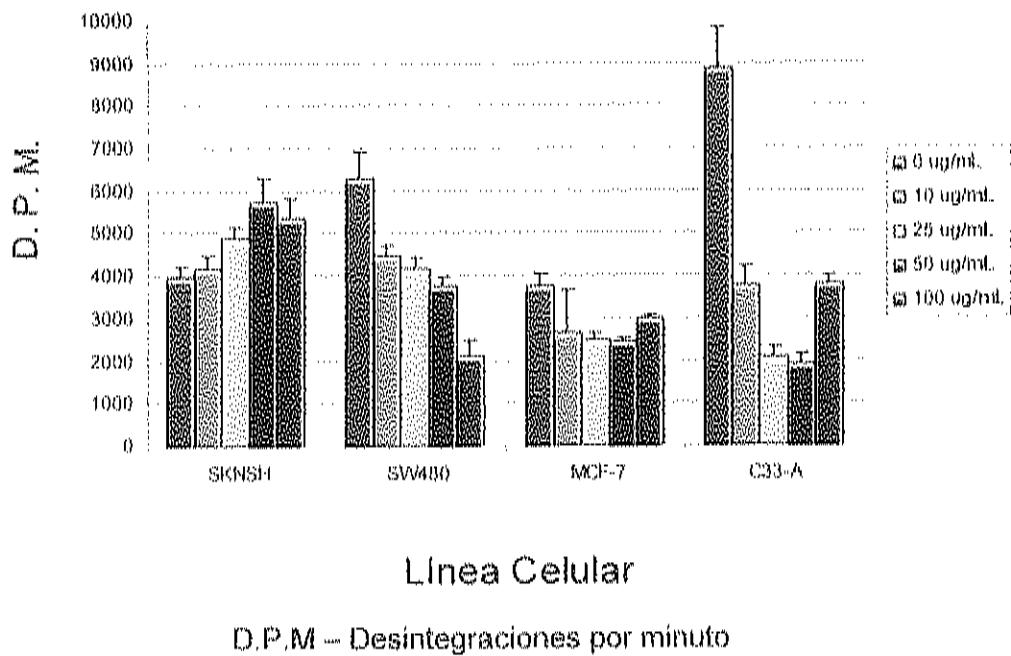


Figura 12. Efecto de lectinas de frijol tépari sobre la proliferación de células malignas, determinado por la técnica de [^3H] timidina.

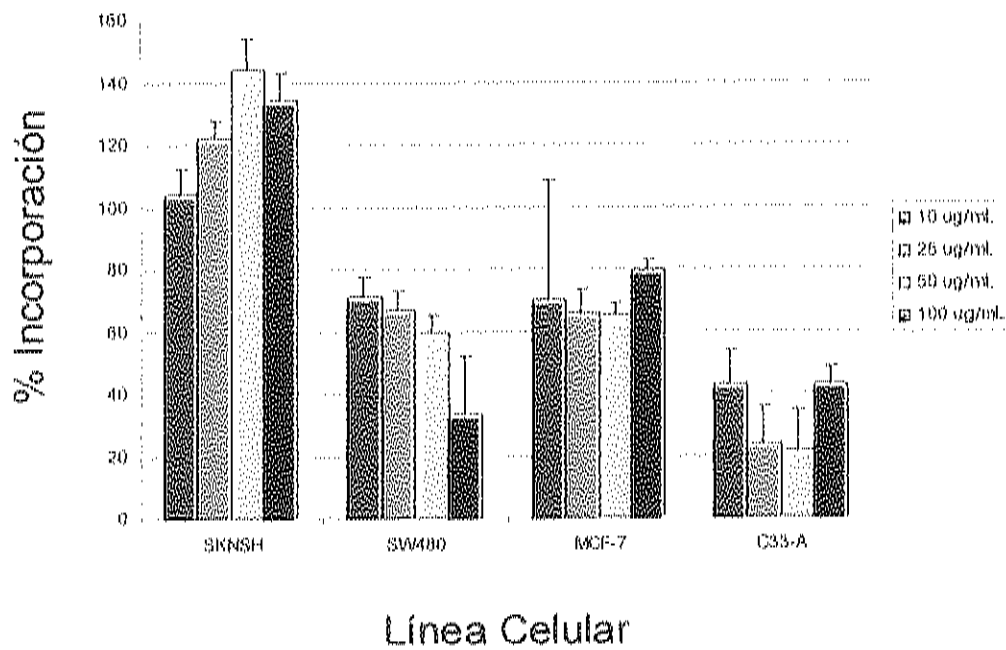


Figura 13. Efecto de lectinas de frijol tépari sobre la proliferación de células malignas después de 24 h de incubación, determinado por la técnica de $[^3\text{H}]$ timidina

se observa una ligera recuperación de las células, incrementándose la proliferación celular. En las células C33-A se puede ver una disminución notoria en la proliferación celular desde los 10 $\mu\text{g/mL}$ hasta los 50 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, al incrementar la concentración a 100 $\mu\text{g/mL}$, se observa una recuperación en la capacidad proliferativa de las células, hasta casi igualar la proliferación observada a la concentración más baja.

Los datos de incorporación de [^3H] timidina en las cuatro líneas celulares malignas se presentan en la Figura 13; se puede ver que en las células Sknsh al incrementar la concentración de lectina se aumenta la cantidad de [^3H] timidina incorporada en las células; lo cual se ve reflejado en el aumento de la proliferación celular. En las células Sw480, el incremento de la concentración de lectina produce una disminución de la incorporación de [^3H] timidina, lo cual indica una disminución en la proliferación celular. Las células MCF-7 no observan cambios considerables en la incorporación de [^3H] timidina al incrementar la concentración de lectina hasta 100 $\mu\text{g/mL}$; por otro lado la línea C33-A presenta una disminución en la incorporación de [^3H] timidina al aumentar la concentración de lectina de 10 hasta 50 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo al incrementarse a 100 $\mu\text{g/mL}$, se observa un aumento en la incorporación de [^3H] timidina, lo cual es un reflejo del incremento en la proliferación celular.

Efecto post-incubatorio con lectinas sobre la proliferación de células malignas empleando la técnica de [^3H] timidina. En la parte intermedia de la

Tabla 10 se presentan los resultados en DPM obtenidos para este estudio. Los datos obtenidos a las 24 h de post-incubación se analizaron estadísticamente y se observó que la línea Sknsh no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las concentraciones de lectina, mientras que para la línea Sw480, las concentraciones de 10 y 25 $\mu\text{g/mL}$ presentan diferencia estadística significativa entre las concentraciones ($P < 0.05$). En las células MCF-7 se observa que las concentración de 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ fueron iguales estadísticamente, las cuales a su vez presentan ser diferentes a las concentraciones de 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$, y en el caso de la línea C33-A se observa que los 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de concentración son diferentes a las concentraciones de 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$.

Por otro lado, al comparar entre las líneas celulares a cada una de las concentraciones estudiadas, se encontró que a 10 $\mu\text{g/mL}$ la única línea que fue diferente a las demás fue la C33-A. A las concentraciones de 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ las cuatro líneas fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) y a los 100 $\mu\text{g/mL}$ de lectina solamente la línea celular Sw480 fue significativamente diferentes ($P < 0.05$) comparado con las otras tres líneas.

A las 48 h de post-incubación, en la Tabla 10 se observa que las células Sknsh a 100 $\mu\text{g/mL}$ de lectina presentaron ser diferente estadísticamente con la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. En las células Sw480 la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, fue significativamente diferente ($P < 0.05$) a las demás concentraciones. Para las células MCF-7 la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ fue la que mostró ser diferente estadísticamente ($P < 0.05$) a las otras

tres concentraciones. Por otro lado, en la línea C33-A, la única concentración que presentó diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) fue la de $100 \mu\text{g/mL}$.

Al comparar las líneas celulares a las 48 h de post incubación, en las cuatro concentraciones de lectina probadas, se observó que a $10 \mu\text{g/mL}$ la línea MCF-7 es diferente estadísticamente ($P < 0.05$); a $25 \mu\text{g/mL}$ las líneas Sknsh y Sw480 fueron diferentes estadísticamente ($P < 0.05$) a las otras dos líneas. A la concentración de $50 \mu\text{g/mL}$ la línea Sw480 fue diferente a las otras líneas celulares, y por último a $100 \mu\text{g/mL}$ de lectina, las células Sknsh y SW480 mostraron diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

En la Figura 14 se muestran los gráficos de concentración de lectina vs incorporación de [^3H] timidina para las cuatro líneas celulares empleadas en el estudio de post-incubación. En la Figura 14-A se presentan los datos observados en la línea celular Sknsh, donde podemos ver que hay una disminución en la incorporación de [^3H] timidina al aumentar el tiempo de incubación y que este efecto es similar en las tres concentraciones de lectina, lo cual demuestra un efecto inhibitorio en la proliferación celular con respecto al tiempo, el cual es independiente de la concentración de lectina.

La línea celular Sw480 mostrada en la Figura 14-B, presenta una tendencia similar a la observada en las células Sknsh, donde se observa un efecto inhibitorio con respecto al tiempo post-incubatorio, viéndose disminuida la incorporación de [^3H] timidina. Para las células MCF-7, presentadas en la Figura 14-C se observa una clara recuperación de las

células después de 24 y 48 h de post-incubación, a una concentración baja (10 $\mu\text{g/mL}$), lo cual se ve reflejado en un incremento en la capacidad de incorporar [^3H] timidina en el ADN de las células; sin embargo a concentraciones mayores se observa que después de 24 de post-incubación la incorporación de [^3H] timidina decrece, disminuyendo la proliferación celular, pero sin embargo si estas células se continúan incubando hasta cubrir 48 h, las células son capaces de recuperarse y con ello proliferar e incorporar una mayor cantidad de [^3H] timidina en el ADN. En la Figura 14-D se presentan los resultados post-incubatorios de incorporación de [^3H] timidina para las células C33-A, observándose que a las 24 h de post-incubación, a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ las células se recuperan incorporando [^3H] timidina en su ADN; sin embargo al continuar incubándolas hasta 48 h las células presentan un decaimiento considerable en la proliferación celular. Por otro lado al incrementar la concentración de lectina a 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$, no se observan cambios en la incorporación de [^3H] timidina, manteniéndose casi igual la proliferación celular tanto respecto al tiempo de post-incubación, como al incremento en la concentración de lectina.

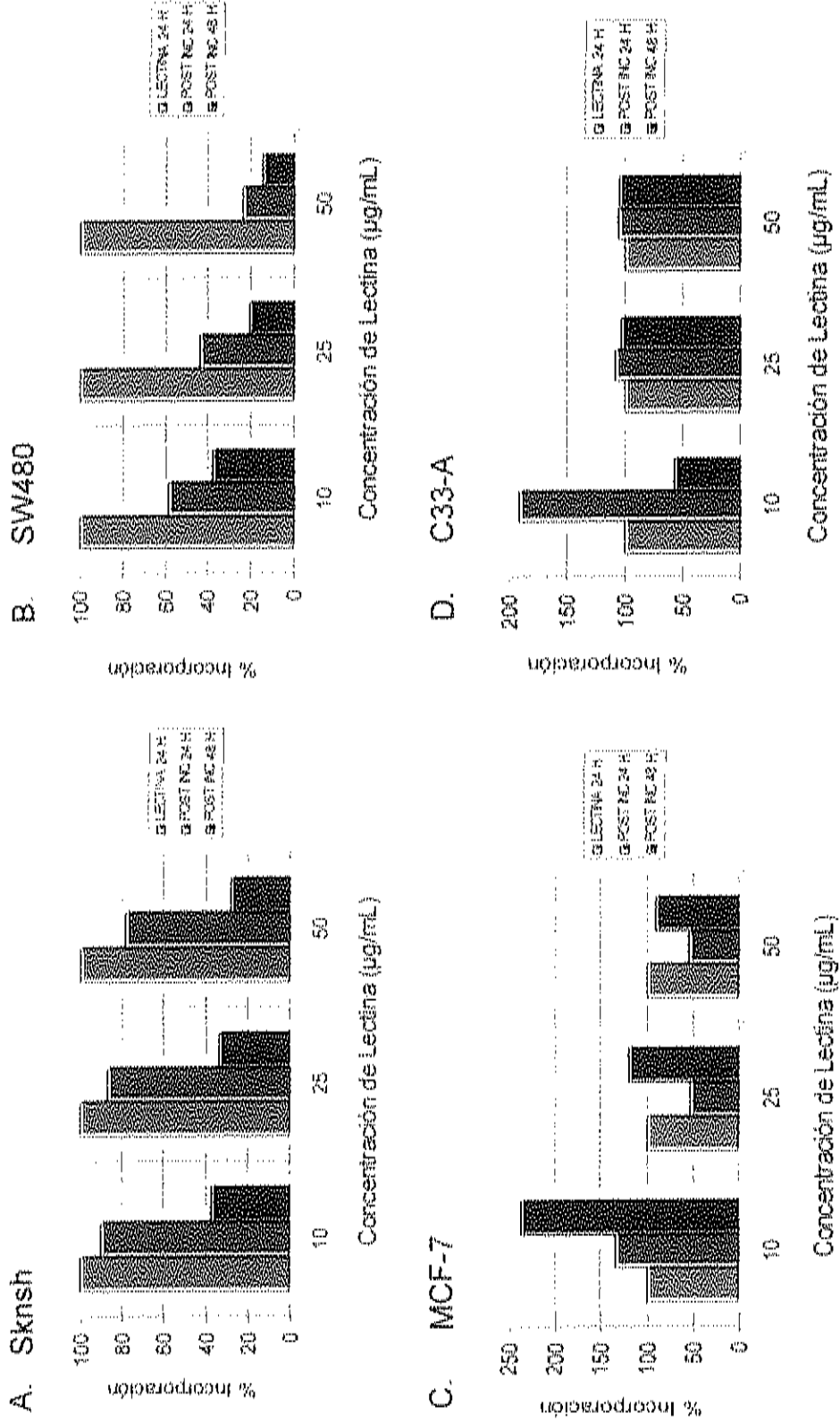


Figura 14. Efecto post-incubatorio de lectinas de frijol tépari sobre células malignas.

DISCUSIONES

Durante el proceso de purificación de la lectina por cromatografía de afinidad, se observó que aun después de varias purificaciones al extracto proteico, la fracción no retenida por la matriz aun presentaba aglutinación considerablemente alta, estos resultados indican que la matriz de fetuína posiblemente retuvo una o algunas de las lectinas que se encuentran presentes en el frijol, reteniéndose de esta manera solamente una fracción de las lectinas, sin embargo debido a que en este trabajo solo interesaba estudiar aquella fracción de lectina con afinidad a la fetuína se continuó purificando la lectina empleando dicha matriz.

Al analizar la lectina purificada por SDS-PAGE en condiciones reductoras se observó una sola banda con un peso molecular aproximado de 31 kDa, lo cual hacía pensar que únicamente se había purificado una proteína, pero al analizarla por PAGE en condiciones nativas se observó una banda difusa y gruesa con un rango de peso molecular entre 132 y 153 kDa, lo cual da un indicio de que posiblemente no solamente se había purificado una isoforma de la lectina, además de dar indicios de que muy probablemente la lectina purificada era una proteína tetramérica constituida de cuatro subunidades idénticas; posteriormente al determinar el peso molecular de manera mas precisa mediante MALDI-TOF se obtuvieron dos pesos moleculares 28 y 31 kDa, lo cual indica que la lectina purificada es una posible mezcla de al menos dos isoformas, además de confirmar de esta manera la sospecha de que la lectina es una proteína tetramérica.

Ahora bien los resultados obtenidos en estos estudios muestran que la lectina o lectinas purificadas son proteínas poliméricas cuyo monómero presenta un peso molecular de 28 y 31 kDa, mientras que la proteína polimérica (tetramérica) presenta un peso molecular de aproximadamente 112 y 124 Kda. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la lectina de tépari presenta un peso molecular similar al de otras líneas de *Phaseolus acutifolius*, González de Mejía y col (1990) quienes reportaron pesos moleculares en el rango de 115 a 120 kDa para lectinas de frijol tépari provenientes de California, EUA, Vargas-Albores (1987) reportó un peso de 83 kDa para lectinas de frijol tépari de Chiapas, Pusztai y col (1987) 117 kDa para las lectinas de frijol tépari de Puerto Rico y para lectina de frijol tépari de Querétaro se reportó un peso de 129 y 146 kDa (Valadez-Vega, 1993). Así mismo éstos trabajos muestran que las lectinas de frijol tépari son proteínas tetraméricas, lo cual concuerda con lo observado para la lectina de frijol tépari de Sonora estudiada en este trabajo.

Por otro lado, se observó que la fuerza iónica tiene un efecto sobre la capacidad de polimerización de la lectina, ya que al pasar la lectina en una columna de superosa 12 en condiciones de baja fuerza iónica, se obtuvo un peso molecular de 123 kDa, mientras que cuando la fuerza iónica es aumentada, el peso molecular de la lectina disminuye hasta 53 kDa, estos resultados muestran que a baja fuerza iónica la lectina se comporta como un tetramero, mientras que a una fuerza iónica alta la lectina se comporta como un dímero, esto es corroborado cuando la lectina es sometida a una columna TSK 3000 sw, empleando una solución reguladora de alta fuerza iónica,

observándose nuevamente que la lectina se comporta como un dímero bajo dichas condiciones.

En la lectina estudiada se encontraron tres puntos isoeléctricos, 4.2, 4.4 y 4.5, los cuales indicaron que esta proteína no era solamente una proteína, sino que se habían purificado varias especies de la lectina lo cual correspondía a tres distintas isoformas de la lectina. Estos resultados de PI concuerdan con los reportados por otros autores, quienes han reportado puntos isoeléctricos entre 4.5 y 5.5 para lectinas de esta misma especie de frijol (Vargas-Albores y col, 1987; Pusztai y col, 1987).

En relación a la composición química de esta lectina, se observa que la lectina es una glicoproteína con un contenido de 6.4% de carbohidratos, lo cual concuerda con lo reportado por Vargas-Albores y col (1987) y Pusztai y col (1987), así mismo con lo que se ha reportado para otras especies de *Phaseolus vulgaris* (PHA), para los cuales se ha reportado que estas lectinas son glicoproteínas (Miller y col 1975 Angelisová y Haskovec, 1978; Itoh y col, 1980; Ochoa y Kristiansen, 1982; Sharma y Salahuddin, 1993; Kamemura y col, 1993).

Por otro lado, la composición de aminoácidos muestra resultados muy parecidos a los reportados para otras lectinas de frijol tépari (Pusztai y col, 1987; Vargas-Albores, 1987), solo que en esta lectina se encontraron mayores concentraciones de glicina, leucina, metionina e isoleucina; además la lectina estudiada en este trabajo difiere con lo reportado por Vargas-Albores y col (1987) en el sentido que esta lectina presentó un contenido

considerable de metionina a diferencia de lo reportado en la lectina estudiada por los autores anteriormente mencionados.

Se ha reportado que diversas lectinas son metaloproteínas, las cuales dentro de su estructura presentan diversos iones metálicos, los cuales son de suma importancia para que las lectinas puedan ejercer su actividad biológica (Becker y col, 1976; Nowaková y Kocourek, 1974; Galbraith y Goldstein, 1970). En la lectina de tépari purificada en este trabajo se observó que ésta presenta algunos iones metálicos en su composición estructural tales como calcio, cobre, zinc, magnesio, hierro, manganeso y cromo, con lo reportado para otras lectinas ya que en su estructura se encuentran iones de calcio, manganeso y azufre, los cuales juegan un papel importante en su actividad biológica (Sharon y Lis, 1989). Por otro lado, Varga-Albores y col (1987) reportaron que la lectina de frijol tépari, proveniente de Chiapas, presenta una disminución en la actividad biológica cuando ciertos iones de la proteína son eliminados y solamente cuando los iones (calcio, magnesio y manganeso) son restituidos se recupera la actividad biológica de la lectina.

Los resultados obtenidos de la secuenciación de los fragmentos tripsinizados obtenidos de las isoformas de la lectina de frijol tépari mostraron analizados por espectrometría de masas, indicaron que ambas isoformas corresponden con una similitud de más del 95% a la de una secuencia previamente reportada, la cual correspondía a un precursor lectina de frijol tépari (Mirkov y col, 1994). Es importante mencionar que la secuencia reportada en ese trabajo se obtuvo mediante técnicas de aislamiento y secuenciación de ácidos nucleicos. Este resultado hace

suponer dos posibilidades: una de ellas que las isoformas separadas en electroforesis de electroisoelectroforesis y de dos dimensiones en el presente trabajo corresponden a dos proteínas cuya secuencia difiere en muy pocos aminoácidos, o que corresponden a dos variantes de una misma proteína con diferentes modificaciones post-traduccionales.

Las secuencias reportadas por dichos autores para la lectina de tépari mostraron estar estrechamente relacionadas a lectinas de frijol común (fitohemaglutinina PHA), lo cual es similar a lo observado para los fragmentos trípticos secuenciados en este trabajo.

Los estudios de afinidad a carbohidratos mostraron que esta lectina tiene mayor afinidad hacia glicoproteínas, mientras que no observó afinidad hacia azúcares simples, oligosacáridos ni glicopéptidos, lo cual concuerda con lo que se ha reportado por Vargas-Alborez y col (1987); Por otro lado, estos resultados muestran un indicio de su afinidad hacia oligosacáridos mas complejos, como los que se encuentran en la glicoproteínas a las cuales presento afinidad la lectina.

Por otro lado, para establecer la composición de oligosacáridos a los cuales la lectina tiene afinidad se realizó una cromatografía de afinidad con lectina inmovilizada, empleando glicopéptidos de tiroglobulina, glicoproteína a la cual presento afinidad la lectina. Dicho estudio mostró que la lectina presenta cierta afinidad hacia glicopéptidos que contienen en su estructura oligosacáridos con residuos de fucosa, manosa, galactosa y N-acetil glucosamina. Dichos resultados presentan similitud en su contenido de

residuos de carbohidratos, con los reportados para diversas lectinas de frijol común (Takahashi y col, 1968; Takahashi y Liener, 1967; Sela y col. 1973).

La lectina de tépari al igual que otras lectinas de *Phaseolus* (Lotan y col, 1973; Miller y col, 1975; Felsted y col. 1975; Dupuis y Le Clair, 1982, Kamemura y col, 1993) muestra actividad mitogénica hacia linfocitos. En este trabajo la máxima actividad mitogénica fue obtenida cuando se agregaron 25 mg/mL de lectina al cultivo de linfocitos, lo cual difiere en ser menos mitogénica que la lectina de tépari reportada por Vargas-Albores y col (1987) quienes reportaron una máxima actividad mitogénica a una concentración de 10 mg/mL de lectina.

Los estudios de viabilidad en células malignas realizados en el presente trabajo se observó que hay una variable actividad citotóxica de la lectina en las líneas celulares estudiadas, siendo mas susceptibles a la acción tóxica las líneas MCF-7, T-24 y 293, mientras que algunas líneas celulares altamente resistentes a la citotoxicidad de la lectina, como fueron las líneas C33-A, Hep-G2 y MDA.

Algunos estudios *in vivo* e *in vitro* han sido realizados, con el fin de observar el efecto de las lectinas en las células. En un estudio realizado por Kiss y col (1997) demostraron que la lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) tiene efecto disminuyendo la viabilidad, además de inhibir el crecimiento de tres líneas celulares de colon (HCT-15, LoVo, SW837). Por otro lado, Kopp y col (1993) reportaron el efecto de las lectinas de muérdago sobre diferentes líneas celulares malignas observándose que dichas lectinas tenían un efecto

citotóxico sobre las células, además de observarse unión entre las lectinas y las células.

Los estudios de proliferación celular realizados por la técnica de MTT y por incorporación de timidina tritlada ($[^3\text{H}]$ timidina), mostraron que la lectina de tépari inhibe considerablemente la proliferación de las células SW480, mientras que para otras líneas celulares estudiadas no se presentó efecto marcado sobre la inhibición en la proliferación; por otro lado, la línea Sknsh mostró un ligero incremento en la proliferación celular al incrementar la concentración de lectina en el medio de cultivo.

Por otro lado, estudios sobre células HeLa, mostraron que la lectina de frijol común (PHA) y extractos crudos *Phaseolus vulgaris*, presentan una considerable disminución en la formación de colonias de dichas células (Abdullaev y González, 1996), así mismo extractos de frijol tépari han mostrado un marcado efecto citotóxico sobre células HeLa, inhibiendo la formación de colonias y disminuyendo la proliferación de las células (Rocha y col, 1999).

Los estudios de Post-incubación realizados en este estudio mostraron diferencias en la proliferación celular dependiendo de la técnica empleada para su determinación (MTT y $[^3\text{H}]$ timidina); ya que por MTT la línea celulares empleadas en este trabajo Sknsh, Sw480, MCF-7 y C33-A, mostraron recuperarse considerablemente después que la lectina fue retirada del medio de cultivo, y que además dicha recuperación fue dependiente de la concentración de lectina empleada.

En los estudios de post-incubación realizados con [³H] timidina no se observó recuperación de las células, sino mas bien una disminución en la proliferación celular después de que la lectina fue retirada del medio de cultivo en las líneas celulares Sknsh y Sw480, lo que implica que el efecto de la lectina continuó ejerciendo su acción toxico sobre las células después de 48 hr de post incubación, mientras que para las líneas celulares MCF-7 y C33-A no se observó un efecto ni descendiente ni ascendente sobre la proliferación celular, lo cual indicó que el efecto causado por la lectina se mantenía constante después de la post incubación, independientemente de la concentración de lectina.

CONCLUSIONES

- El presente trabajo proporciona información valiosa sobre las características bioquímicas de la lectina de frijol tépari con afinidad hacia la matriz de fetuina, además de proporcionar información importante acerca del efecto citotóxico que dichas lectinas ejercen sobre algunas líneas celulares malignas; se muestra información sobre la capacidad de las lectinas para inhibir la proliferación de cuatro líneas celulares seleccionadas, así como sobre la capacidad de recuperación de éstas posterior a la exposición con lectinas.
- La purificación de las lectinas de tépari mediante la columna de afinidad compuesto por fetuina fue una buena opción para la purificación, sin embargo muy probablemente la purificación podría ser mejorada empleando alguna otra glicoproteína con mayor afinidad a la lectina de tépari, como es el caso de la tiroglobulina o fibrinógeno, con la finalidad de obtener un mejor rendimiento.
- La lectina es una glicoproteína tetramérica cuya capacidad de oligomerización depende de la fuerza iónica del medio en la que ésta se encuentre.
- La lectina purificada es una mezcla de al menos dos isoformas en donde cada una de sus subunidades tiene un peso molecular de 28 y 31 kDa respectivamente, por lo que el peso molecular de las lectinas íntegras es de 109 y 124 kDa, con puntos isoeléctricos de entre 4.2 y 4.5.

- La actividad hemaglutinante de la lectina fue mayor que el observado para Concanavalina A y dicha actividad varia dependiendo del tipo sanguíneo.
- La lectina presentó afinidad hacia glicoproteínas, siendo mayor su afinidad hacia GNT V, fibrinógeno y tiroglobulina y menor hacia fetuina, conalbúmina y ovoalbúmina, sin presentar afinidad hacia carbohidratos sencillos. Además de mostrar afinidad hacia glicopéptidos de tiroglobulina cuya composición de carbohidratos es de residuos de fucosa, manosa, galactosa y N acetil glucosamina.
- Glicina, leucina, metionina e isoleucina fueron los residuos de aminoácidos encontrados en mayor concentración en la lectina, además de encontrarse algunos iones metálicos tales como Ca, Cu, Zn, Mg, Fe, Mn como constituyentes en la estructura de la lectina.
- La lectina presentó ser menos mitogénica que las lectinas de frijol común y que la Concanavalina A.
- Los estudios de viabilidad celular mostraron que las células Mcf-7 y T-24 son mas sensibles a las lectinas, mientras que las líneas celulares Mda, Hep-G2, C33-A mostraron ser las mas resistentes.
- Se observaron diferencias en relación a las dos técnicas empleadas en la determinación de inhibición en la proliferación celular, así como en los estudios post incubatorios.
- Se observó un efecto marcado en la inhibición de la proliferación celular en la línea Sw480.

- Los resultados post-incubatorios determinados por la técnica de MTT mostraron que las cuatro líneas celulares estudiadas tuvieron la capacidad de recuperación después de 24 y 48 hr de la post incubación, y que además dicha recuperación varió dependiendo de la concentración de lectina a la cual fueron previamente expuestas las células.
- Los estudios post incubatorios determinados por la técnica de timidina tritiada mostraron que las líneas celulares Sknsh, Sw480, no fueron capaces de recuperarse del efecto causado por la lectina, mientras que las líneas Mcl-7 y C33-A mostraron oscilar entre la recuperación y la permanencia del daño de las lectinas, lo cual además fue dependiente de la concentración de lectina empleada.
- A pesar de que los resultados obtenidos en este trabajo, así como en otros en los cuales se ha caracterizado lectinas de frijol tépari, son muy valiosos, es importante mencionar que aun faltan otros estudios por realizar, como lo es la purificación de las isoformas de la lectina presentes en esta variedad de frijol y caracterizarlas de manera independiente, de tal manera que se tenga un registro de sus características químicas y bioquímicas. En cuanto a la lectina purificada en este trabajo aún queda mucho por hacer en relación a su composición de carbohidratos, así como afinidad hacia carbohidratos, ya que se requieren mas estudios que nos permitan identificar con mayor precisión los carbohidratos a los cuales es afín la lectina, y determinar la estructura de tales carbohidratos, así como realizar estudios que nos

permitan describir de manera precisa la composición y estructura de los carbohidratos que forman parte de la estructura de la lectina.

- En relación a los estudios de citotoxicidad, aún se requieren de más estudios, ya que éste es uno de los primeros trabajos que se hace en dicho contexto, con la lectina de frijol tépari. Algunos de los trabajos que quedan por realizar son: identificación de los sitios a los cuales se une la lectina en las células, identificar el punto durante la duplicación celular en el cual la lectina tiene mayor efecto, de tal manera que se éste interfiriendo en el proceso de proliferación celular.

BIBLIOGRAFIA

- Abdullaev, F. and Gonzalez de Mejia, E. 1996. Inhibition of Colony Formation of HeLa Cells by Naturally Occurring and Synthetic Agents. *Biofactors*. 5:135-138.
- Altmann, F. 1993. Determination of Amino Sugars and Amino Acids in Glicoconjugates Using Precolumn Derivatization with *o*-Phthalaldehyde. *Anal Biochem*. 204:215-219.
- Alvarez-Fernandez, E. y Carretero-Albiñana, L. 1990. Lectin Histochemistry of normal Bronchopulmonary Tissues and Common Forms of Bronchogenic Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 114 (5):475-481.
- Anderson, T. 1985. Agarose based media for high resolution gel filtration of biopolymers. *J. Chrom*. 326:33-44
- Anesi, A., Franciotta, D., Di Paolo, E., Zardini, E., Melzi d'Eril, G. V. y Zerbi, F. 1994, OHA-stimulated Cellular Immune Function and T-lymphocyte Subsets in Major Depressive Disorders. *Funct Neurol*. 9:17-22.
- Bardocz , S., Grant, G., Dugult, T. J., Sakhi, M., Puztai, A.J., Pryme, I.F., Chen, Y.F., Boland, C.R., Kraus, E.R. and Goldstein, I.J. 1994. The

lectin *Griffonia simplicifolia* I-A4 (GS I-A4) Specifically Recognized Terminal Alpha-linked N-acetylgalactosaminyI Groups and is Cytotoxic to the Human Colon Cancer Cell Lines LSII74I and SW1116. *Int J Cancer*. 57:561-567.

Barral-Neto, M., Santos, S.B., Barral, A., Morcira, L.I.M., Santos, C.F., Moreira, R.A., Oliveira, J.T.A. and Cavada, B.S. 1992. Human Lymphocyte Stimulation by Lectins from the *Dioclea* tribe. *Immun Invest*. 21:297-303.

Behncken, A. And Saeger, W. 1991. Lectin-Binding in Pituitary Adenoma and Normal Pituitaries. *Phat Res Pract*. 187:629-631.

Bourne, Y., Ayouba, A., Rouge, P. y Cambillau, C. 1994. Interaction of a Legume Lectin with two components of the Bacterial Cell Wall. *J. Biol. Chem*. 269(13):9429-9435.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein.dye binding. *Analyt. Blochem*. 72:248-254.

Bychkov, V., Dolan, J.R. and Reddy, V.B. 1991. Lectin Binding to Common Epithelial Tumors of Ovaries. *Gynecol Obstet Invest*. 31:166-171.

- Bychkov, V., Deligdisch, E., Taleman, A. And Reddy, V.B. 1992. Lectin Histochemistry of Sex Cord-Stromal Tumors and Small Cell Carcinoma of Ovaries. *Gynecol Obstet Invest.* 34:115-118.
- Chacko, B.K. y Appukuttan, P.S. 2001. Peanut (*Arachis hypogaea*) lectin recognizes alpha-linked galactose, but not N-acetyl lactosamine in N-linked oligosaccharide terminals. *Int J Biol Macromol.* 28(5):365-371.
- Chaplin, M. F. 1994. Monosaccharides. Pp. 1-41. In *Carbohydrate Analysis: A practical approach*. Chaplin, M. F. y Kennedy, J.F. Eds. 2nd. Ed. Oxford University Press. Oxford, UK.
- Clark, G.F. Krivan, H. C. Wilkins, T. D. and Smith, D. F., 1987. Toxin A from *Clostridium Difficile* Binds to Rabbit Erythrocyte glycolipids with Terminal Gal alpha 1-3 Gal beta 1-4GlcNAc sequences *Arch Biochem Biophys.* 257: 217-29.
- Cumming, R. D. y Kornfeld, S. 1982. Characterization of the Structural Determinants Required for the High Affinity Interaction of Asparagine-Linked Oligosaccharides with Immobilized *Phaseolus vulgaris* Leukoagglutinating and Erythroagglutinating Lectins. *J. Biol Chem.* 257:11230-4

- Damjanov, I. 1987. Lectin Cytochemistry and Histochemistry. Lab. Invest. 57:5-20.
- Damjanou, I. and Sobrinho-Simoes, M. 1991. Lectin Histochemistry of Human Thyroid Tumors. En: Gabius, S. And Gabius, H.J. 1991. Lectins and Cancer. P. 41-52. Ed. Springer-Verlag, Germany.
- Devine, P.L. and Harada, H. 1991. Reactivity of Mucin-specific Lectin from *Sambucus sieboldiana* with Simple Sugars, Normal Mucins and Tumor Associated Mucins. Comparison with other lectins. Biol Chem Hoppe Seyler. 372:935-942.
- Draber , P., and Stanley, P. 1984. Cytotoxicity of Plants Lectins for Mouse Embryonal Carcinoma Cells. Somat Cell Mol Genet. 10:435-443.
- Drickamer, K. y Taylor, M. E. 1993. Biology of Animal Lectins. Annu Rev Cell Biol. 9:237-64.
- Ducke, J.A. 1981. Handbook of Legume of World Economic Importance. Prenum Press. New York an London.
- Durigan, J. F., Sgarbieri, V. C. y Almeida, L. D. 1987. Antinutritional Factors and Toxicity in Raw dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) of 12 Brazilian cultivars. J. Food Blochem. 11:185-200.

- Dwe, M.V., Ross, H.A., Streets, A.J., Brooks, S.A., Adam, E., Titcomb, A., Woodside, J.V., Schumacher, U. Y Leatherm, A.J. 2001. Helix pomatia agglutinin binding oligosaccharides of aggressive breast cancer. *Int J Cancer*. 95(2):79-85.
- Eckhardt, A. E., Malone, B. N. y Goldstein, I. J. 1982. Inhibition of Ehrlich Ascites Tumor Cell Growth by *Griffonia simplicifolia* I Lectin *in vivo*. *Cancer Res*. 42:2977-2979.
- Endo, T. 1996. Fractionation of Glycoprotein-derived Oligosaccharides by Affinity Chromatography Using Immobilized Lectin Columns. *J Chromatogr A*. 720:251-261.
- Etzler, M. 1986. Distribution and Function of Lectins in Vegetables. En Liener, I. E., Sharon, N. Y Goldstein, I. J. 1986. *The lectins: Properties, Function and Applications in Biology and Medicine*. Ed. Academic press, INC. London.
- Fernandez, T., Cerda, Zolezzi, P., Aulicino, P., Caldas Lopez, E., Wagner, M., Ricco R., Hajos, S., Gurni, A. y Alvarez, E. 2003. Immunobiological features of the galactoside lectin L-Lc isolated from the Argentine mistletoe *ligaria cuneifolia*. *J. Ethnopharmacol*. 85(1):81-92.

- Ganguli, C. and Das, S. 1994. Plant lectins as Inhibitors of Tumour Growth and Modulators of Host Immune Response. *Chemother.* 40:272-278
- Goldstein, I. J. And Hayes. C. E.. 1978. The Lectins: Carbohydrate-binding Proteins of Plants and Animals. En *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Vol 35:127-340.
- Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. y Sharon, N., 1980. What Should be Called a Lectin. *Nature*. 285:66.
- Goldstein, I. J. y Poretz, R. D. 1986. Isolation, Physicochemical Characterization and Carbohydrate-binding Specificity of Lectins. *Arch. Biochem. Biophys.* 127:789-794.
- González de Mejía, E., Hanzkins, C. N., Paredes-López. O. Y Shannon, A. M. 1990. The Lectins and Lectins-Like Proteins of tepary beans (*Phaseolus acutifolius*) and Tepary-Common bean (*Phaseolus vulgaris*) Hybrids. *J. Food Biochem.* 14: 117-126.
- González-Flores, L. M. E. 1990. Caracterización Físicoquímica e Implicaciones Nutricias de las Lectinas de Frijol Tépari y sus Híbridos. Dr. Tesis. Centro de Estudios Avanzados del IPN. Irapuato, Gto.

Hankins, C. D. y Shannon, L. M. 1978. En Liener, I. E., Sharon, N. Y Goldstein, I. J. 1986. The Lectins: Properties, Function and Applications in Biology and Medicine, Ed. Academic press, INC. London.

Hofer. Protein Electrophoresis Application Guide. Hofer Scientific Instrument. San Francisco, Cal. U. S. A. 1994.

Hohenberger, P., Liewald, F. Schlag, P. And Herfarth, C. 1990. Lectins and Immunohistochemistry of Colorectal Cancer, its Recurrences and Metastases. *European J. Surg. Oncol.* 16:289-297.

Horejsi, V., and Kocourek, J. 1978. Studies on lectins XXXVI. Properties of some lectins prepared by affinity chromatography on O-glycosyl polyacrylamide gels. *Biochim Biophys Acta* 538, 299-15.

Hrdlickova-Cela, E., Plzak, J., Holikova, Z., Dorankova, B. Y Smetana, K. Jr. 2002. Postmitotic basal cells in squamous cell epithelia are identified with Dolichos biflorus agglutinin functional consequences. *AMPIS*. 109 (19): 714-720.

Hostanska, K., Vuong, V., Rocha, S., Soengas, M.S., Glanzmann, C., Saller, R., Bodis, S. Y Pruschy, M.. 2003. Recombinant mistletoe lectin

induces p53 independent apoptosis in tumor cells and cooperates with ionising radiation. *Br J Cancer*. 88(11):1785-1792.

Izycka, A. Y Jablonska, E. 2002. The role of adhesion molecules in cancer. *Pol Merkuriusz*. 13(76):345-348.

Jaffé, W. 1980. Hemagglutinins (lectins). Cap. 3. En *Toxic Constituents in Plant Foodstuff*. Liener, I. E. Ed. Academic Press. New York. N.Y. pp:73-102.

Kelsall, A., FitzGerald, A.J., Howard, C. V., Evans, R.C., Singh, R., Rhodes, J.M. y Goodlad, R.A. 2002. Dietary lectins can stimulate pancreatic grth in the rat. *Int J Exp Phathol*. 83(4):203-208.

Kem en Tec. Instruction Manual: Mini-Leak. Research Diagnostics Inc. Denmark.

Kik, M.J.L., Rojer, J. M., Mouwen, J.M.V.M., Koninkx, J.F.J.G., Van Dijk, J.E. y Van Der Hage, M.H. 1989. The Interaction Between Plant Lectins and the Small Intestinal Epithelium: A Primary Cause of Intestinal Disturbance. *Veter. Quart*. 11(2):108-115.

- Kim, N.D. y Clifton, K.H. 1993. Characterization of Rat Mammary Epithelial cell Subpopulation by Peanut Lectin and Anti-THY-1.1 Antibody and Study of Flow-Sorted Cells *in vivo*. *Exp. Cell Res.* 207:74-85.
- Kim, M.S., Lee, K.M., Yang, S.H., Cho, S., Chung, S.Y., Kim, T.Y. Jeong, W.H. and Park, R. 2003. Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin.II.induced apoptosi of myeloleukemic U937 cells. *Life Sci.* 73(10):1231-1242.
- Kim, N.D. and Clifton, K.H. 1993. Characterization of rat mammary epithelial Cell Subpoppulations by Peanut Lectin and anti-THY-1.1 Antibody and Study of Flow-sorted Cells in Vivo. *Exp cell res.* 207:74-85.
- Kiss, R., Camby, I., Duckworth, C., De Decker, R., Salmon, I., Pasteels, J.L., Danguy, A. And Yeaton, P. 1997. In vitro influence of *Phaseolus vulgaris*, *Griffonia simplicifolia*, Concanavalin A, wheat germ, and Peanut Agglutinins on HCT-15, LoVo, and SW837 Human Colorectal Cancer Cell Growth. *Gut.* 40:253-261.
- Kitamura, N., Guo, S., Sato, T., Hiraizumi, S., Taka, J. Ikekita, M., Sawada, S., Fujisawa, H. Y Furukawa, K. 2003. Prognostic significance of reduced expression of beta N-acetylgalactosaminilted N-linked oligosaccharides in human breas cancer. *Int J Cancer.* 105(4):533-541.

- Kocourek, J. 1986. En Liener, I. E., Sharon, N. Y Goldstein, I. J. 1986. The lectins: Properties, Function and Applications in Biology and Medicine. Ed. Academic press, INC. London.
- Laack, E., Nikbakht, H., Meter, A., Kugler, C., Jasiewicz, Y., Edler, L., Ossfeld, D.K. y Schumacher, U., 2002. Lectin histochemistry of resected adenocarcinoma of the lung: helix pomatia agglutinin binding is a independent prognostic factor. *Am J Pathol.* 160(3):1001-1008.
- Laemmli, U. K. 1970. Most Commonly Used Discontinuous Buffer System for SDS Electrophoresis. *Nature.* 227:680-685.
- Laitinen, L., Jusela, H. y Virtanen, I. 1990. Binding of Wheat and Peanut Lectins to Human Transitional Cell Carcinomas. *J. Amer Cancer Society.* 64(4)849-953.
- Langkilde, N. S., Wolf, H. and Orntoft, T.F. 1989. Binding of Wheat and Peanut Lectins to Human Transitional Cell Carcinomas. *J. of Amer Cancer Socieeety.* 64:849-957.
- Leavitt, R. D., Felsted, R. L., and Bachur, N. R. 1977. Biological and Biochemical Properties of Phaseolus vulgaris Isolectins. *J Biol Chem* 252:2961-6.

- Leibovici, J., Avichezer, D. and Gilbo-Garber, N. 1986. Effect of Lectins on Tumorigenicity of AKR Lymphoma Cells of Varying Malignancy. *Anticancer Res.* 6:1411-1415.
- Leuven, F. V., Torrekens, S., Van Damme, E., Peumans, W. y Van Den Berghe, H. 1993. Mannose-specific Lectins bind α -2-macroglobulin and Unknown Protein from Human Plasma. *Prot. Sc.*2: 255-263.
- Li, W. P., Zuber, C., y Roth, J. 1993. Use of *Phaseolus vulgaris* Leukoagglutinating Lectin in Histochemical and Blotting Techniques: a Comparison of Digoxigenin and Biotin Labeled Lectins. *Histochemistry.* 100:347-354
- Liener, I.E., Sharon, N. Y Goldstein, U.J. 1986. *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine.* Ed Academic press, INC. London.
- Lindon, J. C., Nicholson, J. K. y Wilson, I. D. 1996. The Development and Application of Coupled HPLC-NMR Spectroscopy. *Adv. Chromatogr.* 36:315-82.
- Lis, H. y Sharon, N. 1986. Lectins as Molecules and as Tools. *Annu Rev Biochem.* 55:35-67

- Lotan, R. Beattie, G., Hubbell, W. and Nicholson, G. L. 1991. Activities of Lectins and their Immobilized Derivatives in Detergent Solutions. Implication on the use Lectin Affinity Chromatography for the Purification of Membrane Glycoproteins. *Biochemistry*. 16:1787-1794.
- Lyu, S.Y., Choi, S.H. y Park, W.B. 2002. Korean mistletoe lectin induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Arch Pharm Res*. 25(1):93-101.
- Malmi, R. and Söderström, K. 1991. Lectin Histochemistry of Embryonal Carcinoma. *APMIS*. 99:233-243.
- Marth, C. and Daxenbichler, G. 1988. Peanut Agglutinin Inhibits Proliferation of Cultures Breast Cancer Cells. *Oncology*. 45:47-50.
- Matsubara, K., Tanabe, K., Akane, A., Nakamura, H., Takahashi, S. and Kimura, K. 1994. A Novel Assay for Typing Rh Antigens in Blood-Stains Using a Lectin Specific to the Bisecting N-acetyl-D-glucosamine Side Chain of Glycoprotein. *J. Immunol Methods* 173:175-180.

- May, D.P.J. and Sloan, P. 1991. Lectin Binding of Normal Mucosa, Leukoplakia and Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Med Lab Sci.* 48:6-18.
- Meier, B., Schirmacher, P. y Klesper, B. 2001. Expression of lectin binding sites as a prognostic parameter in mouth mucosa carcinomas. *Mund Kiefer Gesichtschir* 5(2):130-135.
- Mejia, E. G., Hanskins, C. N., Paredes-López, O. and Shannon, L. M. 1989. The Lectins and the Lectin CRMs of Tepary Beans (*Phaseolus acutifolius*) and Tepary-common Beans (*Phaseolus vulgaris*) Hybrids. *J. Food Biochem.* 14:117-126.
- Miyoshi, N., Koyama, Y., Katsumo, Y., Hayakawa, S., Mita, T., Ohta, T., Kaki, K. y Isemur, M. 2001. Apoptosis induction associated with cell cycle dysregulation by rice bran agglutinin. *J. Biochem.* 130(6):799-805.
- Mody, R., Josh, S. y Chaney, W. 1995. Use of Lectins as Diagnostic and Therapeutic Tools for Cancer. *J. Pharmacol Toxicol Methods.* 33:1-10.
- Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Met.* 65:55-63.

- Mukhopadhyay, P., Gupta, J.D., Sanyal, U. and Das, S. 1994. Influence of Dietary Restriction and Soybean Supplementation on the Growth of a Murine Lymphoma and Host Immune Function. *Cancer Lett.* 78:151-157.
- Murakami, I., Sarker, B. A., Hayshi, K. and Akagi, T. 1992. Lectin Binding Patterns in Normal Liver, Chronic Active Hepatitis, Liver Cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Jpn Soc of Path.* 42:566-572.
- Nagamoto, A., Kijima, H., Tsuchia, T., Nombra, S. y Kumagai, H. 2001. Collecting Duch carcinoma mixed with common renal cell carcinoma: análisis of morphological characteristic using lectin histochemistry. *Anticancer Res.* 21(1B):567-570.
- Nakanishi, K., Kawai, T. y Suzuki, M. 1993. Lectin Binding and Expression of Blood Group-Related Antigens in Carcinoma *in situ* and Invasive Carcinoma of Urinary Bladder. *Histopath.* 23:153-158.
- Niels, C. L., Hans, W., Torben, F. O. 1989. Binding of Wheat and Peanut Lectins to Human Transitional Cell Carcinomas. *Cancer.* 64:849-853.
- Nishimura, N., Saito, S., Kubota, Y., Moto-o, N., Taguchi, K., Yamazaki, k., Watanabe, A. and Sasaki, H. 1993. Newly Established Human

Pancreatic Carcinoma Cell Lines and their Lectin Binding Properties.
Int J. Pancreat. 13:31-41.

Ohba, H. And Bakalova, R. 2003. Relationships between degree of binding, cytotoxicity and cytoagglutinating activity of plant-derived agglutinins in normal lymphocytes and cultured leukemic cell lines. Cancer Chemother Pharmacol. 51(6):451-458.

Pasad, S.H. and Sadhi, A. 1981. Effect of Cis-dichlorodiammine Platinum (II) on the Agglutinability of Tumor and Normal Cells with Concanavalin A and Wheat Germ Agglutinin. Chem Biol Interact. 36:355-367.

Peumans, W. J. y van Damme, E. J. 1995a. Lectins as Plant Defence. Plant Physiol. 109:347-352.

Peumans, W. J. y van Damme, E. J. 1995b. The Role of Lectins in plant Defence. Histochem J. 27:253-271.

Pimentel, D. M., Dritojilo, W., Krumel, J. Y Kutzman. J. 1975 Energy and Land Constrains in Food Protein Production. Science. 60:197.

Pratt, R. C., Singh, N., Shade, R. E., Murdock, L.L. and Bressan, R. A. 1990. Isolation and Partial Characterization of a Seed Lectin from Tepary

- Bean that Delays Bruchid Beetle Development. *Plant Physiol.* 93(4):1453-1459.
- Pryme, I. F., Pusztai A.J. and Bardocz, S. 1994. A diet containing the lectin phytohemagglutinin (PHA) slows Down the Proliferation of krebs II Cell Tumors in Mice. *Cancer Lett.* 76:133-137.
- Pusztai, A., Watt, W. and Stewart, J. C. 1987. Erythro and Lymphoagglutinins of *Phaseolus Acutifolius*. *Phytochem.* 26(4):1009-1013.
- Rak, J. y Miller, F. R. 1993. Expression of L-PHA Binding Oligosacharides and Progression of Mammary Neoplasia are Unrelated (letter). *Ins J. Cancer.* 54:524-526.
- Reynoso-Camacho, R., Gonzalez de Mejia, E. y Loarca-Piña, G. 2003. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tépari bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food Chem Toxicol* 41(1):21-27.
- Rindele, S. J., Goldstein, I. J., Matta, K.L. y Ratcliffe, R. M. 1989. Isolation and Characterization of Amaranthin, a Lectin Present in the Seeds of *Amaranthus caudatus*, the Recognizes the T- (or Cryptic T)-Antigen. *J. Biol Chem.* 264(27):16123-16131

- Rini, J. M. 1995a Lectin structure. *Annu Rev Biophys Biomol struct.* 24:551-577
- Rini, J. M. 1995b X-ray crystal structures of animal lectins. *Curr Opin Struct Biol.* 5: 617-621.
- Rocha, N., Salazar-Olivo, L. A., Abdullaev, F. And Gonzalez de Mejia, E. 1999. The hemagglutinating and Cytotoxic Activities of Extracts from Mexican Legumes of Human Tumor Cells. *Food for Health in the Pacific RIM.* En: 3rd International Conference of Food Science and Technology. Whitaker, J. R., Haard, N. F., Singh, R. P. Food and nutrition press incc. Trumbull, Connecticut. P:420-426.
- Ryder, S. D., Smith, J. A., Rhodes, E. G., Parker, N., and Rhodes, J. M. 1994. Proliferative Responses of HT29 and Caco2 Human Colorectal Cancer Cells to a Panel of Lectins. *Gastroenterology.* 106:85-93.
- Ryder, S., Smith, J. A. y Rhodes, J. M. 1992. Peanut Lectin: A Mitogen for Normal Human Colonic Epithelium and Human HT29 Colorectal Cancer Cell. *J. Nat Can Inst.* 84(17):1410-1416.
- Sarker, A. B., Koirala, T. R., Aftabuddin, Jeon, H. J. Y Murakami, I. 1994. Lectin Histochemistry of Normal Lung and Pulmonary Carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol.* 37:29-38.

Sathe, S. K., Deshpande, S.S. y Salunkhe, D. K. 1984, Dry Bean of Phaseolus. A review part 1. Chemical Composition: Proteins. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 20

Sgarbieri, V. C. y Galeazzi, M.A.M. 1990. Quantification and chemical and biochemical characterization of nitrogenous substances from varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris*. L.) . J. Food Biochem.14:233.

Shabtai, M., Slanetz, C.A., Ye, H., Waltzer, W.C. y Malinowski, K. 2002. Inhibition of lectin induced peripheal blood lymphocyte proliferation by colorectal cancer extract: a preliminary report of three cases. Harefuah. 141(10):862-864.

Sharon. N. y Lis, H. 1972. Lectin: Cell agglutinating and Sugar-Specific Protein. Science. 177(4053):494-959.

Sharon, N. 1975. Complex Carbohydrates: Their Chemistry, Biosynthesis and Functions; A Set of lecture notes., Addison Wesley, London.

Sharon, N. y Lis, H. 1989. Lectins. Ed. Chapman and Hall, New York.

Sharon, N. y Lis, H. 1990. Legume Lectins-a Large Family of Homologous Proteins. Faseb J. 4(14):3198-3208.

- Shengle, Z., L., Jinglue, L., Yiram, D. And Di, H. 1990. Preliminary Studies of Serum Glycoconjugates in Patients with Cancer Using the Enzyme-Linked Lectin Assay. *Cancer Biochem Biophys.* 11:211-216.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 1996. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins Silver-stained Polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 68:850-858.
- Shoham, J., Inbar, M. y Sachs, L. 1970. Differential Toxicity on Normal and Transformed Cells *in vitro* and Inhibition of Tumour Development *in vivo* by Concanavalin A. *Nature.* 227:1244-1246.
- Smith, D.F. 1983. Glycolipid-lectin Interactions: Detection by Direct Binding of 125I- Lectins to thin Layer Chromatograms. *Biochem Biophys Res Commun.* 115:360-367.
- Sobrinho-Simoes, M., Sambade, C., Nesland, M., Holm, R., and Damjanov, I. 1990. Lectin Histochemistry and Ultrastructure of Medullary Carcinoma of the Thyroid Gland. *Arch Pathol Lab Med.* 114:365-375.
- Song, B.C., Suh, D.J., Yang, S.H., Lee, H.C., Chung, Y.H., Sung, K.B. y Lee, Y.S. 2002. Lens culinaris agglutinin reactive alpha-fetoprotein as a prognostic marker in patients with hepatocellular carcinoma

undergoing transcatheter arterial chemoembolization. *J. Clin Gastroenterol.* 35(5):398-402.

Soutter, A. D., Nguyen, M., Watanabe, H. and Folkman, J. 1993. Basic Fibroblast Growth Factor Secreted by an Animal Tumor is Detectable in Urine. *Cancer Res.* 53:5299-5299.

Stauder, H. Y Kreuser, E.D. 2002. Mistletoe extract standardised in terms of mistletoe lectins (ML-I) in oncology: current state of clinical research. *Onkologie.* 25(4):374-380.

Stoica, G. and O'leary, M. 1989. Lectin binding sites in normal rat ovary and ENU. Induced Sertoli Cell Tumors of the Ovaries. *Cancer Res.* 9:679.686.

Sudakevitz, D. Gilboa-Garber, N. Levene, C., Sela, T. y Bhattacharyya. 1991. Erythrina Lectins Detect the H/HI Blood Group. *Zbl. Bakt.* 275:343-350.

Suzuki, H., Kawaguchi, T., Higuchi, M., Fujii, K., Kanno, R., Ohishi, A., Motoki, R. Y Gotoh, M. 2002. Expression of peanut agglutinin-binding carbohydrates correlates with nodal involvement in human lung adenocarcinoma. *Cancer Lett.* 187(1-2):215-221.

- Taggart, R., Storey, R. Y Bower, N. 1983. Nutritional Evaluation of the Tepari Bean: Elementary Analysis of Seed. *J. Plant Nutr.* 6:983.
- Thompson, L. U., Tenebau, A. B. y Hui, H. 1986. Effect of Lectins and the Mixins of Proteins on Rate Protein Digestibility. *J. Food Sci.* 51:150-153.
- Tsubura, A., Morii, S. And Matsuzawa, A. 1991. Lectin-binding Patterns in Transplantable Mouse Mammary Tumors and their Metastases. *Anticancer Res.* 11:1719-1724.
- Tsubura, A., Fujita, Y., Sasaki, M. And Morii, S. 1992. Lectin-binding profiles for Normal Skin Appendages and their Tumors. *J. Cutaneous Path.* 19:483-489.
- Valadez-Vega, M. C. 1993. Adaptacion Agronómica, Calidad Química, Física, Toxicológica y Aceptabilidad de Lineas de Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) en el Estado de Querétaro. M en C Tesis. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qro.
- Valentine, U, Fabian S., Schumacher, U. y Leathem, A.J. 2003. Influence of dietary lectin on the cell proliferation of human breast cancer cell lines in vitro. *Anticancer Res.*61(7): 239-246.

- Valenzuela, I. A. 1988. Caracterización Química y Biológica de los Fenoles Condensados en Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) . Tesis Licenciatura. Universidad de Sonora.
- Van Driessche, E. 1988. Structure and Function of Leguminosae Lectins. En: *Advances in lectin Research*. Vol. 1 Harmut Franz (Ed) p. 73-134.
- Vargas-Albores, F., de la Fuente, G., Agundís, C. y Córdoba, F. 1987. Purification and Characterization of a Lectin from *Phaseolus acutifolius* var. Latifolius. *Prep. Biochem.* 17:379-396
- Vázquez-Ortiz, F. A., Caire, G., Higuera-Ciapara, I. y Hernández, G. 1995. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Amino Acids in Shrimp. *J. Liq. Crom.* 18(10):2059-2068.
- Vierbuchen, M. 1991. Lectin Receptors. En: Seifert, G. *Current Topics in Pathology Cell Receptors*. Ed. Springer-Verlay, New York. P. 271-361.
- Vigneswaran, N., Whitaker, S. B., Burnick, S. D. And Waldron, C. A. 1993. Expression Patterns of Epithelial Differentiation Antigens and Lectin-Binding Sites in Ameloblastomas: A Comparison with Basal Cell Carcinoma. *J. Hum. Pathol.* 24:49-57.

- Vilarem, M. J., Jouanneau, J., Le Francois, D. Bourrillon, R. 1978. Differential Effects of Lectins on the in Vitro Growth of Normal Mouse Lung Cells and Low- and High-Cancer-Derived Cell Lines *Cancer Res.* 38:3960-3965.
- Walker, R. A. 1989. The Use of Lectins in Histopathology. *Path. Res. Pract.* 185(6):826-835.
- Warner, T. F. and Krueger, R.G. 1979. Effect of Plant Lectins on Murine Myeloma Cells. *Br J Exp Pathol.* 60:460-465.
- Watkins, W. M. 1980. En *Advances in Human Genetics.* Harris, H., and Hirschorn, K. Plenum Press, New York. pp 1-136.
- Werner, U. and Kissel, T. 1996. In Vitro Cell Culture Models of Nasal Epithelium: A Comparative Histochemical Investigation of their Suitability for Drug Transport Studies. *Pharm Res.* 13:978-988.
- Wyllys, R. 1931. Padre Luis Velarde. *Pimeria alta.* 1716. Nuevo México. *Hist. Rev* 6-III-1576. En: *Desert Plant.* Vol I, Nabhan, G. P. Y Teiwes. H. H. 1983. University of Arizona

- Yawata, T., Hara, T., Tsukamoto, I. and Miyoshi, M. 1983. Toxic Effects of Kintoki Bean (*Phaseolus vulgaris*) Lectin on Cultured Animal Cells. *J. nutr Sci Vitaminol.* 29:65-74.
- Zalatnai, A., Lapis, K., Szende, B., Raso, E., Telkes, A., Resear, A. y Hidvegi, M. 2001. Wheat germ extract inhibits experimental colon carcinogenesis in F-344 rats. *Carcinogenesis.* 22(10):1649-1652.
- Zieske, L. R., Fu, D., Khan, S. H. y O'Neill, R. A. 1996. Multi-dimensional Mapping of Pyridylamine-Labeled N-linked Oligosaccharides by Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 720:395-407.