



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO**

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHAVEZ

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS

**“LECTINAS DE LA FLOR DE MANITA (*Chiranthodendron
pentadactylon*) PURIFICACION Y SU FUNCION VASORELAJADORA”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA:

QFB. JOSE ALFREDO ALEMAN PONCE

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. BERTHA FENTON NAVARRO

MORELIA, MICHOACAN JULIO, 2010

COMITE TUTORAL:

- M. C. Víctor Manuel Farías Rodríguez
- M. C. Humberto Ruiz Vega
- M. C. Héctor Urquiza Marín

INDICE GENERAL

	INDICE DE FIGURAS	i
	INDICE DE TABLAS	ii
	INDICE DE ABREVIATURAS	iii
	RESUMEN	iv
I	INTRODUCCION	1
1	PLANTAS MEDICINALES	1
2	DESCRIPCIÓN DE LA FLOR DE MANITA	2
2.1	Usos en la medicina tradicional	4
2.2	Propiedades farmacológicas	4
2.2.1	Acción anti-colinérgica	4
2.2.2	Acción anti-protozoaria	4
2.2.3	Acción anti-bacteriana	5
2.2.4	Actividad antidiarreica	5
2.2.5	Actividad antiviral	6
2.2.6	Efecto vaso-relajador	6
2.2.7	Toxicidad	6
2.3	Componentes activos	6
2.4	Flavonoides	7
3	LECTINAS	9
3.1	Definición	9
3.2	Descripción	9
3.3	Clasificación	10
3.3.1	Lectinas animales	10
3.3.2	Lectinas vegetales	13
3.3.3	Lectinas de microorganismos	15
3.4	Funciones	16
3.5	Aplicaciones	17
4	HIPERTENSION ARTERIAL	18
4.1	Definición	18
4.2	Descripción	18
4.3	Clasificación	18
4.4	Incidencia	19
4.5	Causa de hipertensión arterial	19
4.6	Tratamiento	19
4.7	Efectos adversos	20
II	SITUACION	22

III	HIPOTESIS	23
IV	OBJETIVO GENERAL	23
V	OBJETIVOS PARTICULARES	23
VI.	MATERIAL	24
VII	METODOS	24
	Obtención del extracto crudo	24
	Ensayo de hemaglutinación	24
	Cuantificación de proteínas	25
	Determinación de carbohidratos	25
	Reacción de Benedict	25
	Reacción Fehling	25
	Determinación de carbohidratos método de Dubois	26
	Precipitación salina	26
	Diálisis	26
	Liofilizado	27
	Cromatografía de exclusión molecular	27
	Electroforesis en SDS-PAGE (Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio).	27
	Electroelusión de proteína a partir de gel de poliacrilamida.	28
	Isoelectroenfoque	28
	Afinidad para carbohidratos	29
	Dicroísmo circular (CD)	29
	Actividad biológica	30
	Análisis de la actividad vaso relajante	30
	Análisis estadístico	31
VIII	RESULTADOS	32
IX	DISCUSIÓN	74
X	CONCLUSIONES	81
XI	PERSPECTIVAS	82
XII	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	83

INDICE DE FIGURAS

1	Hojas y del árbol de manita	2
2	Flor de manita	3
3	Frutos y semillas	3
4	Representación esquemática de glicoproteínas	10
5	Actividad hemaglutinante del extracto crudo	33
6	Actividad Hemaglutinante del intervalo 0-20% de sulfato de amonio	36
7	Actividad Hemaglutinante del intervalo 20-40% de sulfato de amonio	37
8	Actividad Hemaglutinante del intervalo 40-60% de sulfato de amonio	38
9	Actividad Hemaglutinante del intervalo 60-80% de sulfato de amonio	39
10	Actividad Hemaglutinante del intervalo 80-100% precipitado de sulfato de amonio	40
11	Actividad de la concentración 80-100% sobrenadante con sulfato de amonio	41
12	Cromatografía de hidrofóbica	42
13	Cromatografía de exclusión molecular	43
14	Electroforesis SDS-PAGE	43
15	Punto isoeléctrico	44
16	Dicroísmo circular	45
17	Termoestabilidad de lectinas del extracto crudo	57
18	Termoestabilidad de lectinas de la fracción 0-20%	57
19	Termoestabilidad de lectinas de la fracción 20-40%	58
20	Termoestabilidad de lectinas de la fracción 40-60%	58
21	Termoestabilidad de lectinas de la fracción 60-80%..	59
22	Termoestabilidad de lectinas de la fracción 80-100%	59
23	Termoestabilidad de lectinas de la lectina purificada	60
24	Evaluación del extracto crudo (EC) en arteria torácica	67
25	Evaluación del extracto crudo (EC) en arteria abdominal	67
26	Evaluación de los pigmentos en arteria torácica	68
27	Evaluación de los pigmentos en arteria abdominal	68
28	Evaluación de la fracción proteica (FP) en arteria torácica	69
29	Evaluación de la fracción proteica (FP) en arteria abdominal	70
30	Evaluación de la lectina CPL en arteria torácica	71
31	Evaluación de la lectina CPL en arteria abdominal	71
32	Evaluación de la Concavalina A segmento torácico	72
33	Evaluación de la Concavalina A segmento abdominal	73
34	Determinación de oxido nítrico en arterias	73

INDICE DE TABLAS

1	Clasificación de las lectinas animales	12
2	Clasificación de las lectinas vegetales de acuerdo a su especificidad	13
3	Clasificación de las lectinas vegetales de acuerdo a su estructura	14
4	Ejemplo de microorganismos y sus glicoproteínas	15
5	Actividad hemaglutinante del extracto crudo	32
6	Remoción de pigmento de extracto crudo	33
7	Cuantificación de carbohidratos reacción de Feheling	34
8	Actividad hemaglutinante con eritrocitos de animales	34
9	Actividad de la concentración 0-20% de sulfato de amonio	35
10	Actividad de la concentración 20-40% de sulfato de amonio	36
11	Actividad de la concentración 40-60% de sulfato de amonio	37
12	Actividad de la concentración 60-80% de sulfato de amonio	38
13	Actividad de la concentración 80-100% pp de sulfato de amonio	39
14	Actividad de la concentración 80-100% sb de sulfato de amonio	40
15	Glicosilación de lectina CpL.	45
16	Afinidad para carbohidratos extracto crudo	48
17	Afinidad para carbohidratos fracción 0-20%	48
18	Afinidad para carbohidratos fracción 20-40%	49
19	Afinidad para carbohidratos fracción 40-60%	49
20	Afinidad para carbohidratos fracción 60-80%	50
21	Afinidad para carbohidratos fracción 80-100%	50
22	Afinidad para carbohidratos de la lectina CpL	51
23	Comparación de afinidad a carbohidratos	52
24	Dependencia de cationes	54
25	Termoestabilidad del Extracto crudo	57
26	Termoestabilidad de la Fracción 0-20%	57
27	Termoestabilidad de la Fracción 20-40%	58
28	Termoestabilidad de la Fracción 40-60%	58
29	Termoestabilidad de la Fracción 60-80%	59
30	Termoestabilidad de la Fracción 80-100%.	59
31	Termoestabilidad de la Lectina CpL.	60
32	Dependencia del pH del extracto crudo	61
33	Dependencia del pH de la fracción 0-20 %	62
34	Dependencia del pH de la fracción 20-40 %.	63
35	Dependencia del pH de la fracción 40-60 %	63
36	Dependencia de pH de la fracción 60-80%	64
37	Dependencia del pH de la fracción 80-100 %	65
38	Dependencia del pH de Lectina CpL	66
39	Propiedades fisicoquímicas de la lectina CpL	67

LISTA DE ABREVIATURAS

cm	Centímetro
mg	Miligramos
Kg	Kilogramos
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
NA	Noradrenalina
M	Molar
IC	Concentración inhibitoria
GA	Acido gálico
Da	Daltons
LO	Lipoxigenasa
CO	Ciclooxigenasa
MPO	Mieloperoxidasa
XO	Xantina oxidasa
ERO	Especies reactivas del oxígeno
L-NAME	Clorhidrato del metilester de N ω -nitro-L-arginina
DRC	Dominio de reconocimiento a carbohidratos
EDRF	Factor relajante derivado del endotelio
RE	Retículo endoplásmico
ECA	Enzima convertidora de Angiotensina
SDS	Dodecil sulfato sódico
FE	Fenilefrina
ConA	Concavalina-A
DC	Dicroísmo circular
μ g	Microgramos
AE	Actividad específica
C	Concentración mínima
EC	Extracto crudo
ON	Oxido nítrico
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetil-galactosamina
GalAcet	Galactosa acetilada
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-acetil-glucosamina
Fuc	Fucosa
Man	Manosa
Fruc	Fructosa
Xyl	Xilosa
Sac	Sacarosa
Rib	Ribosa
NANA	Acido N-acetilneuraminico
Hg	Mercurio
HAS	Hipertensión arterial sistémica
Lac	Lactosa
PS	Presión sistólica
PD	Presión diastólica

RESUMEN

La flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) es ampliamente utilizada en la medicina tradicional para el control de diversas enfermedades en forma de te e infusión principalmente para controlar afecciones del corazón (regular la presión arterial). En estudios farmacológicos se ha determinado que el extracto de la flor de manita presenta acciones: antibacteriana, antiviral, antiparasitaria, anti-colinérgica y vasorrelajante.

Hasta el momento no se han reportado datos de toxicidad de esta planta por lo que de acuerdo a sus propiedades farmacológicas se considera una planta como una fuente potencial de productos terapéuticos de origen natural que puedan ser consideradas como alternativa en tratamientos.

Hasta la fecha solo se han identificado la presencia de flavonoides a los cuales se les atribuyen sus acciones farmacológicas, y hasta el momento no existen reportes de lectinas, por lo que en este trabajo se reporta por primera vez la identificación, purificación y caracterización de una lectina de la flor de manita, y la evaluación de la actividad biológica relacionada con la hipertensión.

La identificación de las lectinas del extracto crudo se realizó mediante ensayos de hemaglutinación obteniéndose como resultado mayor actividad con el grupo A₂, GalNAc-Gal-Fuc, una vez identificada la presencia de lectinas se procedió a purificarlas mediante precipitación fraccionada, presentando mayor actividad la fracción 60-80%. A esta fracción se le realizó cromatografía hidrofóbica seguida de cromatografías de exclusión molecular. A la lectina pura se comprobó el grado de pureza y se determinaron sus características fisicoquímicas como son peso molecular aparente, punto isoeléctrico, a ésta lectina pura se le denominó "Lectina de *Chiranthodendron pentadactylon* (CpL)" que presenta las siguientes características: PM 32,812; Punto isoeléctrico: 5.01, estructura secundaria con presencia de hélices alfa, grado de glicosilación de 19%, la especificidad de los carbohidratos es: Man > Gal > GalNAc > GalAcet > NANA > Lac > Glc, GlcNAc > Fruc > Fuc > Rib > Sac > Xyl. Presenta dependencia de los cationes Ca⁺⁺, K⁺ y Na⁺. Con estabilidad en un intervalo de pH de 5.8-7.6 y de temperatura de 17-60°C.

Respecto a la actividad biológica analizada (vasorrelajación) se analizó la actividad del extracto crudo obteniéndose como resultado un 100% de relajación del tejido arterial. También se analizó la actividad de sus componentes como son los pigmentos y la lectina, los pigmentos presentaron un 60% de relajación del tejido y para la lectina de un 40% de relajación. El mecanismo de acción de la lectina es mediante la activación de la vía óxido nítrico sintasa.

Los resultados confirman el uso de la flor de manita en la medicina tradicional para el control de la hipertensión arterial, lo que representa una potencial alternativa para controlar esta enfermedad que es de las más frecuentes de nuestro país y representa un problema de salud pública.

INTRODUCCION

1.-PLANTAS MEDICINALES

El uso de plantas y hierbas con propósitos medicinales se ha venido utilizando desde la antigüedad por nuestros antepasados para atender problemas, dolores y malestares de salud a nivel mundial, desde entonces su empleo a sido documentado y se siguen utilizando por razones históricas y culturales a pesar de la presencia de la medicina moderna (Sáenz, 2003).

Los primeros estudios científicos sobre las plantas mexicanas fueron realizadas en 1517-1586 por Francisco Hernández médico español enviado por Felipe II, estas investigaciones no pudieron ser publicadas al regreso a España, por lo que tuvieron que pasar 200 años para que se iniciara la investigación de nuevo de las plantas mexicanas especialmente de aquellas con usos medicinales: actualmente se estima que existen más de 26,000 especies de plantas en nuestro país de las cuales más de 6,000 son utilizadas con fines terapéuticos, pero solo el 10% han sido estudiadas a nivel farmacológico, microbiológico y fitoquímico (Pacheco C. 1888; Sánchez de L. 2000; Osegueda & col, 2005).

En nuestro país el uso de plantas medicinales constituye una tradición desde las culturas prehispánicas pues se estima que cerca del 70-80% de la población recurre a las plantas medicinales para curar padecimientos que van desde un simple resfriado, mal de ojo, enfermedades gastrointestinales, dermatitis, diabetes, dolor de cabeza, etc., (Pacheco C. 1888).

Algunos ejemplos de estas plantas son la *Ginkgo biloba* útil para la perdida de la memoria y flujo sanguíneo, gordolobo (*Gnaphalium*) útil como expectorantes. (Osegueda & col, 2005).

En la terapeuta actual algunas plantas son la principal fuente para la obtención de diferentes fármacos, es por ello que en algunos laboratorios farmacéuticos diversos materiales vegetales son sometidos a procesos químicos como la extracción, purificación evaluación de la actividad entre otros, después se preparan en diferentes formas farmacéuticas como; jarabes, cremas, tabletas etc., para ponerlos en el mercado. Entre algunos de los fármacos de origen natural tenemos a la morfina y codeína alcaloides obtenidos del opio, los glúcidos cardiotónicos: digoxina obtenidos de *Digitalis lanata*.

La cantidad de principios activos en las plantas es muy amplia por lo que se están realizando una gran cantidad de estudios comparativos en el que el uso de productos de origen natural resultan más favorables para el tratamiento y control de una gran cantidad de enfermedades en comparación con medicamentos farmacéuticos cuyos efectos adversos son más drásticos y dañinos.

2.- DESCRIPCIÓN DE LA FLOR DE MANITA

La flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) produce un árbol frondoso, de tronco ancho y gran altura entre 10 y 15 metros, se desarrolla en climas cálidos, semicálidos y templados en bosque mesófilo de montaña entre pinos y encinos, en alturas que van desde los 200 a 2,600 metros sobre el nivel del mar. Este árbol es originario de nuestro país pues se encuentra en los estados de: Guanajuato, Michoacán, Oaxaca Chiapas, Guerrero, Puebla, Estado de México y además en Centro América (Argueta & col, 1994; Brocca & col, 1997; Linares & col, 1986).

Sus hojas son simples, alternas grandes entre 12 a 30 cm de largo, anchamente ovada, con bordes puntiagudos, glabrescente en la cara superior, vellosa ferrugínea en la cara inferior, base cordada, peciolada, su terminación es en punta, ver figura 1. Las flores crecen solitarias miden de 3.5 a 4.5 cm de largo, son leñosas, cáliz acampanado, profundamente exertos, sus pétalos son carnosos de color café, tiene 5 estambres que se disponen de tal manera que asemejan a la de una mano extendida; ovario súpero, 5-carpelar, estilo exerto de la columna de estambres, el polen es de color amarillo presente tras los estambres figura 2, sus frutos tienen forma capsular leñoso, con 5 costillas de 10 a 15 cm de largo figura 3 (Argueta & col, 1994; Linares y col, 1986).



Figura 1. Hojas del árbol de manita. En la figura se observan los diferentes tamaños de las hojas, así como la cara superior e inferior.



Figura 2. Flor de manita. Imagen de la flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*).



Figura 3. Frutos y semillas. En la imagen se observa el fruto en forma de drupa, con una de sus costillas entre abierta observándose algunas semillas

Esta flor fue usada por los aztecas, quienes la llamaban Macpalxóchitl (Flor de palma de mano) y, desde antes de la independencia de México, despertó la curiosidad de naturalistas y exploradores extranjeros, como Alejandro von Humbolt. Actualmente, es el símbolo de la Sociedad Botánica de México, aunque aún no se han realizado suficientes estudios para determinar el tipo de sustancias curativas que contiene. (Argueta y col, 1994; Kung, S. 2007).

En nuestro país se le conoce como: árbol de las manitas, camxóchitl, canaco, canague, huiahuonahua, limaneshmu, macpalxochicuáhuatl, mano de dragón, palo de mecate, mano de león, mapasuchil, teyagua, teyeque. En Centro América se le conoce como: manita, cacpalxóchitl, canac, flor de manita, macpalxochitl, majagua, mano de león, mano de mico, mapilxochit, palo de tayyo, palo de yaco, palo de tayuco, papasuchil, ranac, tayuyo, teyagua (Quattrocchi, F.L.S. 2000; Linares & col, 1986).

A la flor de manita se le ha asignado la siguiente Clasificación científica: pertenece al Reino: Plantae, Subreino: Tracheobionta, División: Magnoliophyta, Clase: Magnoliopsida, Subclase: Dilleniidae, Orden: Malvales, Familia: Malvaceae, Subfamilia: Bombacoideae, Genero: *Chiranthodendron*, Especie: *pentadactylon* (Quattrocchi, F.L.S. 2000; Argueta & col, 1994; <http://es.wikipedia.org/wiki/Chiranthodendron>).

2.1 Usos en la medicina tradicional

Durante mucho tiempo la flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), se ha venido utilizando en la medicina tradicional debido a que tiene una amplia variedad de usos medicinales, esta se utiliza principalmente en forma de te e infusión para controlar afecciones del corazón (regular la presión arterial), y como tranquilizante del sistema nervioso. Además también para el tratamiento de úlceras crónicas, antiinflamatorio (inflamación de los ojos), dolor de dientes, hemorroides, pero, sobre todo, antiepiléptico, e insomnio, también para combatir el "vacío emocional" y para "clarificar la conciencia, además se utiliza como planta de sombra y ornato en parques y jardines, por su follaje y por la belleza de las flores (Argueta & col, 1994; Broca & col, 1997; Martínez & col, 2006; Kung, S. 2007; Linares & col, 1986).

2.2 Propiedades farmacológicas

Debido al amplio uso que se le ha dado a la flor de manita en la medicina tradicional se han realizado varios estudios científicos en los que se han determinado diversas acciones farmacológicas, las cuales se describen brevemente a continuación:

2.2.1 Acción anti-colinérgica

Se evaluó un extracto polar de las flores de manita, administrado por vía intraperitoneal en ratón a la dosis de 300mg/kg, el cual ejerció un efecto anticolinérgico, observándose piloerección, ligera pérdida del tono muscular, catatonía y aumento del diámetro pupilar (Argueta & col, 1994; <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7950>).

2.2.2 Acción anti-protozoaria

Otro de los estudios fue el análisis de la actividad antiprotozoaria de extractos metanólicos de *C. pentadactylon*, contra trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (HM1-IMSS) y *Giardia lamblia* (IMSS:1090:1) causantes de diarrea y disentería en nuestro país, en la cual se observó que tiene actividad específicamente contra *Entamoeba histolytica*, con una concentración

inhibitoria $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$, lo cual indica que efectivamente si tiene efectos cuando se utiliza en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (Calzada & col, 2006).

2.2.3 Acción anti-bacteriana

Respecto a ésta actividad, se estudiaron los efectos de 26 plantas medicinales entre las cuales se encuentra *Chiranthodendron pentadactylon*, contra ocho cepas de bacterias causantes de diarrea y disentería en la población mexicana. Las bacterias utilizadas en este estudio fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 0157:H7, dos especies de *Shigella sonnei*; dos especies de *Shigella flexneri*; y dos de *Salmonella sp* y *Escherichia coli* ATCC 25922 fue utilizada como control. Se evaluaron los extractos a una concentración de 8 mg/mL. Los resultados de estos estudios mostraron que los extractos metanólicos y acuosos de la flor de manita poseen efectos antibacterianos, obteniendo mayor actividad con extractos metanólicos, los resultados se presentan en porcentajes de inhibición bacteriana: *Escherichia coli* ATCC 25922 (56.8 %), *E. coli* 0157:H7 (59.0 %), *Shigella sonnei*-1 (73.3 %), *Sh. Sonnei*-2 (71.4%), *Sh. flexneri*-1 (42.9 %), *Sh. flexneri*-2 (51.5 %) *Salmonella sp*-1 (50.0 %), *S. sp*-2 (50.0 %) (Alanis & col. 2005).

2.2.4 Actividad antidiarreica

De acuerdo con lo indicado en la medicina tradicional se evaluó la actividad antidiarreica de 26 plantas incluyendo a la flor de manita, se utilizó un modelo de diarrea causada por la toxina de *Vibrio cholerae* en intestino de rata, los extractos que se emplearon fueron tanto acuosos como metanólicos a una dosis de 300 mg/kg los cuales se administraron por vía oral, obteniéndose como resultados de la flor de manita: con el extracto metanólico una inhibición de la diarrea del $87.6 \pm 15.3\%$ y del extracto acuoso $84.8 \pm 17.4\%$ (Velázquez & col, 2006).

Siguiendo el mismo procedimiento en otro estudio se analizó la actividad inhibidora de la diarrea causada por la toxina *Vibrio cholerae* en intestino de ratas, evaluándose los flavonoides aislados de *Chiranthodendron pentadactylon*. En el análisis de los flavonoides se encontraron los siguientes compuestos que fueron evaluados; tirilosido, astragalina, quercetina 3-O-glucosa epicatequina y catequina, los cuales fueron analizados con una concentración de 10mg/Kg, teniendo solamente un mayor efecto antidiarreico la catequina 57.7%, epicatequina 56.07% y la quercetina-3-O-glucosa 54.6%, con lo que se explica en alguna medida su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de la diarrea y disentería (Velázquez & col, 2002).

2.2.5 Actividad antiviral

En este estudio se evaluó la actividad antiviral de los extractos etanólicos de 12 plantas utilizadas en la medicina tradicional entre ellas a la flor de manita contra el virus de la polio y el virus de la estomatitis vesicular VSV, obteniéndose como resultado la inhibición de la replicación del virus de la estomatitis vesicular VSV (Abad & col, 1997).

2.2.6 Efecto vaso-relajador

En particular, en un estudio científico con la flor de manita, se demostró el efecto vaso-relajador en arterias de aorta aisladas de ratas Wistar, utilizando un equipo con cámara para órgano aislado, las cuales fueron contraídas inicialmente con Noradrenalina (NA) 10^{-5} M, posteriormente se les administro el extracto acuoso (3.6 y 12 mg/mL) de *C. Pentadactylon*, observándose un efecto vaso-relajación en el órgano aislado, y de esta manera determinándose una concentración inhibitoria IC₅₀ de 18 mg/mL para el extracto acuoso de la flor de manita, con lo que se concluye que los componentes de la flor de manita principalmente los pigmentos (flavonoides) podrían estar relacionados con estos efectos (Perusquia & col, 1994).

2.2.7 Toxicidad

Con el objetivo de determinar el grado de toxicidad de la flor de manita se realizaron estudios donde se comprobó que las infusiones de flores no poseen toxicidad aguda en el ratón por vía oral en dosis superiores de 3g/kg (equivalente a 2 flores), este resultado indica que el uso en la medicina tradicional no causa ningún efecto toxico debido a que las personas en él te solo utilizan de 8 a 10 flores o un puñado de flores (Méndez, 2006).

2.3 Componentes activos

En la búsqueda de los componentes activos de la flor de manita que podrían estar participando en las actividades descritas anteriormente, se ha determinado que contiene grandes cantidades de mucílago (Argueta & col, 1994), pero principalmente altas concentraciones de pigmentos fenólicos entre ellos los flavonoides totales presentes en los extractos naturales de esta planta. Por lo que a continuación se describen brevemente a estos compuestos y sus acciones (Velázquez & col, 2002).

En uno de los estudios realizados en esta planta se determino la presencia de fenoles totales en el extracto de flor de manita, esta determinación se realizo utilizando una concentración estándar de acido gálico que se utiliza para la determinación e identificación de fenoles en este tipo de muestras, y para la determinación de flavonoides totales se utilizo una solución

+estándar de catequina. Obteniéndose como resultados una concentración de fenoles totales de 221.4 mg ácido gálico (GA)/g extracto y 164 mg/g de extracto de flavonoides totales, por lo que se ha propuesto que la alta concentración de estos componentes podrían ser los responsables de sus efectos en relación con el hombre en la medicina tradicional para el tratamiento de trastornos cardíacos, del sistema nervioso, actividades antibacterianas, antiparasitarias, efectos vaso-relajantes, entre otros (García, 2003; Fernández & col, 2007).

Como se mencionó anteriormente en el análisis de los componentes de la flor de manita se identificaron los siguientes flavonoides; tirilosido, astragalina, quercetina 3-O-glucosa epicatequina y catequina, (Velázquez & col, 2002). Por lo que a continuación se describen brevemente a estos compuestos (flavonoides) y algunas de sus acciones.

2.4. Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en cualquier parte de los vegetales (flores, hojas, semillas, raíces, tallos, frutas y verduras), son compuestos polifenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana y aun no se han reportado efectos tóxicos de estos componentes en las concentraciones presentes en plantas (D'Mello, 1997; Fernández & col, 2003; Martínez & col, 2002).

Pueden aparecer desde simples moléculas fenólicas de bajo peso molecular hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30,000 Da. La mayoría de los flavonoides se encuentran comúnmente unidos a metabolitos secundarios como: arabinosa, galactosa, glucosa y xilosa. Existen 13 subclases de flavonoides con un total de más de 5,000 compuestos, 10 de ellos presentando un esqueleto hidrocarbonado del tipo C6-C3-C6 (difencil-propano) derivado del ácido shiquímico y de 3 restos de acetato (García, 2003; Martínez, 2005; Pérez, 2007).

Una de las principales funciones por la cual se caracterizan los flavonoides es por su actividad antioxidante, pues su estructura química es especialmente adecuada para ejercer esta acción varios estudios han demostrado que estos componentes actúan inhibiendo oxidasas (enzimas), como la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO) evitando la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) *in vivo*, por otro lado se ha determinado que actúan como captadores de radicales libres y donadores de protones neutralizando peligrosas especies reactivas de oxígeno, así como también la quelación de iones metálicos (García, 2003; López L. 2002; Pérez, 2007; Ferrandiz & col 1991; Nijveldt & col, 2010).

Los flavonoides también tienen la capacidad de aumentar algunos antioxidantes endógenos como por ejemplo los flavonoides aislados de la *Solanum melongena* (Brinjal) ejercieron una potente actividad antioxidante,

elevando, de manera significativa, los niveles de GSH y la actividad de la CAT en ratas, luego de la administración intraperitoneal de 1 mg de flavonoides del Brinjal/100 g de peso corporal (Pérez, 2007).

También actúan inhibiendo sistemas enzimáticos relacionados con la funcionalidad vascular como: la catecol O-metil transferasa (COMT), con lo que aumentan la duración de la acción de las catecolaminas, incidiendo por tanto en la resistencia vascular; la histidina decarboxilasa, afectando por tanto a la acción de la histamina; las fosfodiesterasas, por lo que inhiben la agregación y adhesividad plaquetaria etc. (López L. 2002).

En otros estudios se ha comprobado que los flavonoides (4,5,7-trihidroxi-flavanona, quercetina, hesperidina y hesperetina) presentes en diversas plantas como la *P. caliculatus*, *C prunifolia* entre otras presentan un efecto vasorrelajante del músculo liso de arterias aortas aisladas de ratas Wistar dependiente de endotelio en el cual están involucrados la activación de la vía óxido nítrico sintasa (NO/GMPc), con el fin de determinar si los compuestos vasorrelajantes de estas plantas activan esta vía se utilizó clorhidrato del metilester de N ω -nitro-L-arginina (-NAME) un bloqueante de la enzima óxido nítrico (ON), observándose como resultado una reducción significativa del efecto vasorrelajador. En particular en el caso de la quercetina que es uno de los flavonoides presentes en la flor de manita se determinó que su mecanismo de acción involucra de manera importante la activación de la vía NO/GMPc (Martínez & col 2003; Onzaga & col 2008; Villagómez & col, 2003. Sancén & col 2003).

Por otro lado en los resultados obtenidos del estudio del Proyecto Ciencia, Vino y Salud sobre los efectos del consumo moderado y regular de vino tinto (alto contenido de flavonoides) sobre la función endotelial en hombres sanos que consumen dos dietas diferentes, muestran que el consumo moderado de vino protege la función endotelial de aquellos individuos alimentados con dieta hipergrasa y la mejora en los individuos alimentados con dieta rica en frutas y verduras (Leighton & col 1999).

Varios estudios han demostrado que la administración por vía oral de flavonoides, en el modelo del edema de la pata de los ratones inducido por carragenina, presentan un efecto antiinflamatorio, esta disminución de la inflamación se cree que es probablemente por el mecanismo de inhibición de enzimas como la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa presentes en los leucocitos disminuyendo de esta manera la producción de agentes quimiotácticos y de interleucinas mediadoras de la inflamación. En otro estudio se evaluó la actividad antiinflamatoria de los flavonoides de las hojas de la *Uncaria tomentosa* en el modelo de Yamada en el cual la inflamación intestinal crónica fue inducida mediante una inyección de indometacina vía sc (7.5 mg/kg) por dos días, en el presente estudio se demostró que al administrar los flavonoides durante ocho días reducen la formación de úlceras en el tejido intestinal

comprobandose de esta manera la actividad antiinflamatoria (Giraldo & col, 2003; Ortega & col 1996; Nijveldt & col, 2010).

Por otro lado se ha determinado que algunos flavonoides presentan actividad anti-fúngica debido a que estos componentes tienen una alta afinidad para unirse y de esta manera bloquear a las enzimas de los hongos necesarias para infectar a las plantas (D`Mello. 1997; Flores & col 2005).

Otra de las funciones que se han determinado en estos componentes es que algunos flavonoides presentes en plantas usadas con fines terapéuticos en la medicina tradicional presentan actividad antibacteriana, actualmente no se sabe específicamente cual es el mecanismo por el cual presentan esta acción por lo que se propone como posible sitio de acción la membrana celular donde los terpenoides surtirían efecto desencadenando una serie de procesos que podrían arribar a la muerte bacteriana (Avellaneda & col 2005; Flores & col 2005; Maguna & col 2006).

Con respecto a todo lo anterior se puede observar que los flavonoides son muy importantes debido a que cumplen con una amplia variedad de funciones en nuestro organismo y como se puede ver hasta el momento solo se han identificado la presencia de pigmentos en la flor de manita, por lo que en estudios previos de laboratorio hemos identificado la presencia de proteínas y entre ellas a las lectinas las cuales se describen a continuación.

3.-LECTINAS

El término de lectina proviene del latín: "*lègere*" que significa escoger o seleccionar. Estas sustancias fueron descritas hace más de 100 años por sus propiedades hemaglutinantes sobre algunas células (eritrocitos, leucocitos, levaduras etc.) por lo que fueron llamadas hemaglutininas o fitohemaglutininas debido a que las primeras que se identificaron provenían de las plantas. Posteriormente se les asigno el nombre de lectinas con el cual se siguen llamando y se les dio la siguiente definición (Castillo & col 2005; Gallego del Sol & col 2006; Sharon & Lis 2001 & 2004)

3.1. Definición

Las lectinas son un grupo de proteínas o glicoproteínas que reconocen de manera específica y reversible a los carbohidratos (mono y oligosacáridos) ya sea de la superficie celular o en suspensión, no tienen actividad enzimática y en contraste con los anticuerpos no son producto de una respuesta inmune (Barondes, 1988; Castillo & col 2005; Sharon & Lis 2001 & 2004; Gabius, 2002).

3.2. Descripción

Una de las principales características de estas proteínas es que presentan por lo menos dos sitios o dominios de reconocimiento a carbohidratos (DRC), las interacciones de las lectinas con los carbohidratos son relativamente débiles (puentes de hidrogeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas entre otras) asegurando la especificidad, y permitiendo la separación cuando es necesario. Las interacciones entre una superficie celular con carbohidratos y otra con lectinas recuerda la acción de Velcro: cada interacción es relativamente débil pero el conjunto es fuerte (Stryer, 2003; Gallego del Sol & col 2006)

3.3.- Clasificación

Este tipo de proteínas para su estudio se han clasificado de acuerdo a su origen por ejemplo; las lectinas animales, de microorganismos y vegetales ver figura 4 (Sharon & Lis 2001; Stryer, 2003; Gallego del Sol & col 2006).

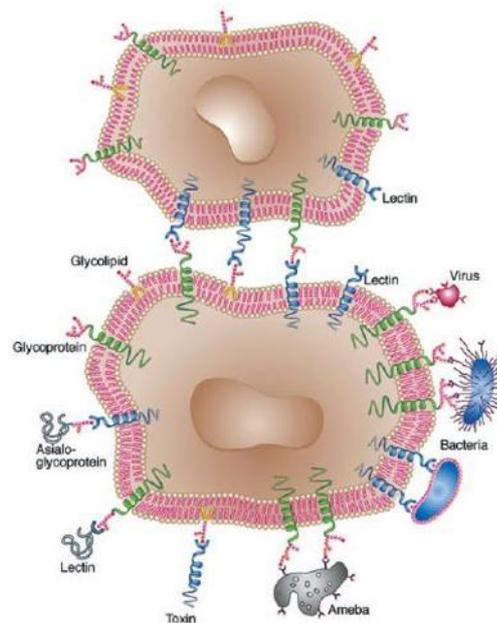


Figura 4. Representación esquemática de glicoproteínas. En la figura se observa la representación esquemática de la amplia distribución de las lectinas, así como el reconocimiento a carbohidratos de algunas superficies celulares.

3.3.1 Lectinas animales

Hasta el momento se han descubierto una amplia variedad de lectinas animales principalmente en vertebrados pero también en invertebrados en las que sus estructuras tridimensionales, sus sitios de reconocimiento a carbohidratos y arreglos modulares se encuentran perfectamente caracterizados, por lo que las lectinas animales fueron clasificadas por Dickamer de acuerdo a su secuencia de aminoácidos altamente conservada. Tabla 1(Varki & col 2001; Sharon & Lis 2001). Se subdividen en las siguientes:

Lectinas tipo-C: Se caracterizan por ser una de las más grandes familias de lectinas animales, son dependientes de iones como el Ca^{++} , esta familia se compone por subfamilias como las colectinas, selectinas, receptores endocíticos, compartiendo una homología conservada en su sitio de reconocimiento a carbohidratos que son de aproximadamente de 115-130 aminoácidos. Las colectinas son un grupo de proteínas solubles encontradas en suero de mamíferos y aves, contienen un dominio parecido al del colágeno, contienen varios sitios de reconocimiento a carbohidratos ya sea en forma de ramillete o en forma cruciforme. Las selectinas están constituidas por tres miembros que son: E-selectinas, P-selectinas y L-selectinas, todas las selectinas se caracterizan por reconocer el ácido siálico presente en el antígeno sialil Lewis sLe^x y sLe^a , se encuentran expresadas principalmente sobre la membrana del endotelio vascular y leucocitos circulantes (Varki & col, 2001; Sharon & Lis 2001)

Galectinas: Otra familia de lectinas animales son las lectinas tipo-S o mejor conocidas como galectinas, son independientes de iones, se encuentran en forma de monómeros y algunas en dímeros no covalentes con masas moleculares de 14kDa, la mayoría son intracelulares su estructura tridimensional es semejante a las de las de las leguminosas (Varki & col, 2001; Sharon & Lis 2001).

Tipo-P: difieren en el sitio de reconocimiento de las lectinas tipo-C y tipo-S, estas lectinas reconocen de manera específica a la manosa-6-fosfato que se encuentra de manera específica en las enzimas lisosomales, su masa molecular es muy variable algunas son de 300kDa y no son dependientes de cationes para ser activas mientras que otras son de aproximadamente 45 kDa y son dependientes de Ca^{++} y la mayoría son transmembranales (Varki & col, 2001; Sharon & Lis 2001).

Tipo-I (inmunoglobulinas): son una familia de proteínas que se encuentran dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, dentro de esta familia se encuentran las *siglecs* y las *no siglecs*, las *siglecs* reconocen de manera específica el ácido siálico las *no siglecs* reconocen otros como la manosa, ácido hialurónico, heparina entre otros (Varki & col, 2001; Sharon & Lis 2001).

Pentraxinas: se caracterizan por tener una gran homología en su secuencia primaria, consisten en una estructura organizada en forma pentamérica, reconocen de manera específica a los β -galactósidos, monosacáridos sulfatados y fosforilados (Varki & col, 2001; Sharon & Lis 2001).

Como se puede observar anteriormente se describe que existe una amplia variedad de lectinas animales en las que la mayoría se encuentran perfectamente caracterizadas, así como otras que no se encuentran bien caracterizadas como las que se encuentran dentro de la clasificación con secuencias homologas no conocidas

Tabla 1 Clasificación de las lectinas animales

CLASE DE LECTINAS	NUMERO DE MIEMBROS	CARACTERISTICAS DEFINIDAS EN LA SECUENCIA DE LA PROTEINA	DEPENDENCIA DE CALCIO	RECONOCIMIENTO A CARBOHIDRATOS
SECUENCIAS HOMOLOGAS CONOCIDAS				
Tipo-C (selectinas y colectinas receptores endocíticos)	< 20	Motivo de la secuencia de la lectina tipo-C	Si	Altamente variable
Tipo-S (galectinas)	> 10	Motivo de la secuencia de la lectina Tipo -S	No	B-galactósidos y poli-N-acetil-Galactosamina.
Tipo-P (M6PRs)	2	Motivos repetidos únicos	Variable	Man-6-P en glicanos tipo-N
Tipo-I	> 5	Dominios parecidos a las inmunoglobulinas	No	(Siglecs) Acido siálico (No Siglecs) hialurónico (GlcNAcβ1-3GIUAβ1-4) _n , Heparina y heparán sulfato, manosa
Calnexina, Calireticulina y calmegina	2	Homología con cada una de las otras	Si	Manosa en glicanos tipo-N
Proteínas que unen ácido hialurónico	> 5	Secuencias homologas en regiones de unión	Si	Cadenas de ácido hialurónico.
Lectinas de huevos de rana	No conocida	Secuencias homologas	Si	Galactosa, ácido siálico, heparina.
SECUENCIAS HOMOLOGAS NO CONOCIDAS				
Pentraxinas	> 5	Disposición de unidades pentaméricas	Si	Variable
Proteínas que enlazan glicosaminoglicanos	> 20	Acumulo de aminoácidos básicos	No	Glicosaminoglicanos
ERGIC-53 Y VIP-36	No conocida	Secuencias similares a las lectinas de plantas	No	Glicanos en las vías del retículo endoplásmico
Receptor S4GGnM	No conocida	Dominios ricos en cisteína en proteínas que unen manosa	No	Residuos con GalNac sulfatados en hormonas glicoproteicas de la pituitaria.
Proteínas que enlazan gangliosidos	No conocida	No conocida	No	Glicolípidos sialisados
Proteínas que unen lípidos sulfoglucoronicos	No conocido	No conocida	Si	Glicolípidos sulfoglucoronicos
Lectinas hemolinfas de los insectos	No conocida	No conocida	No	Acido siálico
Interleucinas I Y II	No conocida	No conocida	No	Oligosacaridos ricos en manosa

3.3.2 Lectinas vegetales

Las lectinas vegetales se descubrieron decenios antes que las lectinas animales, la mayoría de las lectinas de plantas han sido aisladas principalmente de las semillas, pero además también se han obtenido de las hojas, raíces, frutos, cortezas y tallos (Sharon & Lis 2001).

Las primeras lectinas identificadas fueron las de *Crotalus durissus* en 1860 por S. Weir y la de *Ricinus communis* en 1888 por H. Stillmark que se caracterizaron por tener propiedades hemaglutinantes, por lo que en 1898 M. Elfstand introdujo el termino de Hemaglutininas. En el año de 1919 J. B. Summer fue el primero en aislar y cristalizar la primer lectina de la *Canavalia ensiformis* la cual fue nombrada concanavalina A, pero fue hasta 1936 cuando Summer y Howell demostraron que la Con A aglutinaba células como eritrocitos y levaduras y que esta lectina era inhibida por sacarosa con lo que se demostró que las lectinas son específicas para reconocer carbohidratos, este hallazgo se corroboró en numerosos estudios. En base a toda esta información se realizaron numerosas investigaciones como por ejemplo; en 1948 y 1949 K. O. Renkonen y de forma independiente W. C. Boyd y R. M. Reguera demostraron que algunas hemaglutininas de leguminosas aglutinaban eritrocitos humanos del sistema ABO con lo que se demostró la presencia de carbohidratos en los eritrocitos y la especificidad de estas hemaglutininas para reconocer a los carbohidratos. A finales de 1960 P. C. Nowel demostró que las lectinas de *Phaseolus vulgaris* presenta habilidad mitogénica. Todos estos estudios permitieron seguir descubriendo la presencia de numerosas lectinas principalmente en las plantas y de esta manera encontrándose diferentes funciones y aplicaciones biológicas (Sharon & Lis 200, 2004; Varki & col, 2001; Gallego del Sol & col 2006).

Las lectinas vegetales suelen clasificarse de varias maneras, por ejemplo: de acuerdo a la especificidad hacia el tipo de carbohidrato que reconocen o que inhiben su actividad hemaglutinante (Tabla 2), dentro de esta clasificación se encuentran las lectinas que reconocen carbohidratos unidos a N-glicanos y O-glicanos.

Tabla 2. Clasificación de las lectinas vegetales de acuerdo a su especificidad.

MONOSACARIDO	LECTINA	ABREVIATURA
α -D-manosa, α -D-glucosa	<i>Canavalia ensiformis</i> <i>Lens culinaris</i>	ConA LCA
β -galactosa N-acetil- α -D-galactosamina	<i>Ricinus comunis</i> <i>Glycine max</i> <i>Arachis hypogaea</i> <i>Amaranhtus leucocarpus</i>	RCA SBA PNA ALL
N-acetil- β -D-glucosamina	<i>Triticum vulgare</i>	WGA
α -D-fucosa	<i>Lotus tetragonolobus</i> <i>Ulex europeus</i>	LTA UEA
α -N-acetilneuraminico	<i>Limulus polyphemus</i>	LPA

Actualmente se ha propuesto una nueva clasificación de lectinas vegetales basándose en la gran cantidad de datos cristalográficos, la cual ha remplazado a la basada en su especificidad. Dentro de esta clasificación se agrupan a seis grandes familias que guardan un parentesco estructural y evolutivo. Además los miembros de cada una de estas familias se caracterizan por la estructura conservada de sus dominios de unión a carbohidratos. A continuación se describen estas familias (Tabla 3):

1).- El primer grupo es el de las leguminosas las más numerosa y mayor estudiadas con cerca de 100 lectinas conocidas de más de 70 especies, obtenidas principalmente de las semillas, constituidas por dos o cuatro subunidades idénticas y contienen un sitio de unión para iones metálicos como el Ca^{++} , Mn^{++} y Mg^{++} .

2).- Lectinas con dominios tipo heveína o específicas de quitina, cada subunidad está constituida por 4 dominios tipo heveína, se caracterizan por en encontrarse principalmente en gramíneas (trigo, cebada y arroz) y solanáceas (papas, tomates entre otras).

3).- Lectinas aisladas de monocotiledónias específicas para manosa, este grupo de lectinas pertenecen por ejemplo: Las orquídeas, ajo y amaralis, con secuencias de aminoácidos altamente conservados

4).- Lectinas tipo jacalina o en forma de prisma, en este grupo la mayoría de lectinas presentan estructuras similares parecidas a la de *Artocarpus integrifolia* (jacalina).

5).- Toxinas que inactivan a ribosomas, forman parte de los venenos más tóxicos con estructuras moleculares muy complejas, constituidas por dos cadenas la A (responsable de la toxicidad) y la B (actividad de lectina).

6).- Las lectinas tipo amaranto constituyen un grupo pequeño, aisladas de semillas provenientes de diferentes especies de amaranto como por ejemplo *Amaranthus caudatus*, *Amaranthus leucocarpus*.

Tablas 3. Clasificación de las lectinas vegetales de acuerdo a su estructura

Clase	Especificidad	Subunida des m.w.(kD)	Subunidad	Sitios de unión por unidad	Puentes disulfuro	Dependencia de metales
Leguminosas	Diversa	25-30	2-4	1	No	Ca^{++} , Mn^{++} y Mg^{++} .
Heveína	Quitina		2	1	Si	No
Monocotiledónias	Manosa	12	3	1	No	No
Tipo jacalina	N-acetilgalactosamina, maltosa y manosa		4	4-8	No	No
Toxinas que inactivan a ribosomas	α -D-manosa-GlcNAc, D-galactosa, D-glucosa.	60	2	2-4	Si	No
Tipo amaranto	N-acetilgalactosamina, α -D manosa.		1	1-2	No	No

3.3.3 Lectinas de microorganismos

Dentro de las lectinas de microorganismos se encuentran principalmente las Hemaglutininas, adhesinas y toxinas, distribuidas principalmente en bacterias, virus, parásitos y algunos hongos, la mayoría de las lectinas de estos microorganismos se encuentran presentes en la superficie celular; por ejemplo las bacterias como la *Escherichia coli* contiene *pilis* o *fimbrias* tipo-I las cuales reconocen de manera específica carbohidratos como la manosa presente en la mucosa intestinal, otro de los ejemplos es el virus de la influenza el cual contiene hemaglutininas que reconocen de manera específica al ácido N-acetilneuramínico, presente en las glicoproteínas de las superficies celulares y de esta manera poder infectar cierto tipo de células del tracto respiratorio. En la tabla 4 se describen algunos ejemplos de microorganismos (virus, bacterias, parásitos) con el tipo de glicoproteína presente en ellos así como los carbohidratos que están reconociendo para poder infectar a cierto tipo de células en específico. (Varki & col, 2001; Stryer, 2003).

Tabla 4. Ejemplo de microorganismos y sus glicoproteínas.

MICROORGANISMO	LECTINA	RECONOCIMIENTO DE CARBOHIDRATO	SITIO DE INFECCION
VIRUS			
<i>Influenza A y B (humano)</i>	Hemaglutinina	Neu5Acα2-6Gal	Mucosa del tracto respiratorio
<i>Influenza A y B (aves y porcina)</i>	Hemaglutinina	Neu5Acα2-3Gal	Mucosa intestinal
<i>Influenza c</i>	Hemaglutinina esterasa	9-O-Acetil-Neu5Ac	Mucosa del tracto respiratorio
<i>Herpes simple</i>	Glicoproteína gB, gC, gD.	3-O-heparán-sulfato	Mucosas superficiales de nariz, ojos boca y genitales.
HIV	Gp120 V3 asa (loop)	Heparán sulfato	Linfocitos CD4
BACTERIAS			
<i>Bordetella pertussis</i>	Filamento hemaglutinina (FHA)	Heparina y Glicolípidos sulfatados	Epitelio ciliado y tracto respiratorio
<i>Escherichia coli</i>	Fimbria tipo p	Galα1-4Galβ-	Tracto urinario
<i>Escherichia coli</i>	Fimbria tipo s	Gangliosidos GM3, GM2	Neural
<i>Escherichia coli</i>	Fimbria tipo 1	Manα1-3(Manα6)Man	Tracto urinario
<i>Helicobacter pylori</i>	BabA	Le ^b	Estómago
PARASITOS			
<i>Entamoeba histolytica</i>	Receptor de 260 kD	Residuos terminales de Gal/GalNAc	Mucosa intestinal
<i>Tripanosoma cruzi</i>	VSGs	Glicanos con ácido siálico	Eritrocitos de la sangre

3.4. Funciones

Debido a la habilidad de las lectinas de reconocer carbohidratos, estas tienen la capacidad de descifrar la información de los carbohidratos, al ofrecer superficies complementarias donde se pueden unir perfectamente y de una manera específica (García-Hernández, 1999). De esta manera, las lectinas participan en una gran cantidad de funciones relacionadas con el reconocimiento célula-célula. Esta función se considera como una de las primeras características que debieron aparecer en las células para el establecimiento de la condición pluricelular, este reconocimiento celular se presenta en diferentes funciones celulares como son: simbiosis como por ejemplo las lectinas presentes en las raíces de leguminosas que reconocen a los carbohidratos presentes en la pared celular de las bacterias fijadoras de nitrógeno especies de *Rhizobium*, por otro lado en cuanto a la toxicidad se encuentra la ricina obtenida de *Ricinus communis* que está constituida por dos subunidades la A y la B, la subunidad B es la que tiene actividad de lectina responsable de unirse a la pared celular y la subunidad A es la responsable de la toxicidad (actividad de N-glicosidasa sobre el ribosoma que inactiva la traducción).

Regulan procesos de infección por microorganismos por ejemplo las lectinas presentes en la superficie de macrófagos reconocen de manera específica a los carbohidratos de diversos microorganismos para poder llevar a cabo la fagocitosis, fertilización (reconocimiento del ovulo y del esperma), regulación del tejido conectivo, apoptosis (muerte celular programada), en respuestas inflamatorias (en infecciones locales), en el sistema inmune (por ejemplo en la artritis reumatoide), y en la determinación y diferenciación tisular, tal es el caso de las lectinas de *Vicia villosa* y de *la Salvia sclarea* que reconocen de manera específica al N-acetilgalactosamina-O-serina/treonina antígeno presente en la superficie celular del 90 % de los carcinomas humanos, en otros estudios se ha demostrado que la lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) inhibe el desarrollo de líneas celulares de diferentes tipos de cáncer humano: mama (MCF-7 y ZR-75), cérvico-uterino (HeLa, SiHa y C33A) y colon (CaCo2), se cree que esta función esta efectuada por el reconocimiento de los carbohidratos de superficies celulares que producen la inhibición de la síntesis de DNA, RNA y proteínas (Castillo & col 2005; López & col 2004).

Además existen numerosos reportes de la intervención de las lectinas en procesos infecciosos como por ejemplo el protozooario *Tripanosoma cruzi* se adhiere a la membrana celular a través de su lectina que reconoce al ácido siálico mediante un enlace α -2-3 a galactosa lo que asegura su anclaje para la infección (Varky & col 2001).

Uno de los estudios que ha llamado la atención en las lectinas de plantas es la producción de óxido nítrico (Andrade & col, 1999) pero

principalmente el efecto vasorelajante de arterias aortas con endotelio, pues se ha demostrado que lectinas como la Concavalina A (Con A), la hemaglutinina del germen del trigo (WGA) y la lectina aglutinante de la lenteja (LCA), *Dioclea grandiflora* (DGL) presentan efectos vasorrelajadores en arterias aortas aisladas de ratas y conejos debido a que estas lectinas se unen a sitios glicosilados o glicoproteínas de la superficie celular del endotelio. Se ha demostrado que este efecto de vasorrelajación se lleva a cabo de una manera similar al producido por el factor relajante derivado del endotelio EDRF también llamado óxido nítrico, en donde el agonista se une a receptores acoplados a proteínas G, produciéndose un aumento en la liberación del calcio del retículo endoplásmico (RE) debido a que el agonista estimula la fosfolipasa C y la consiguiente producción de inositol trifosfato IP3 a partir de los fosfolípidos de la membrana, el aumento intracelular de calcio promueve la activación de la síntasa de óxido nítrico (NSO) aumentando la producción de ON a partir de L-citrulina. De esta manera el ON difunde a través del subendotelio hasta llegar a las células del músculo liso, activando al GMPc y de esta manera reducir la concentración citoplasmática de calcio, produciéndose el efecto de vasorrelajación completa del tejido arterial, con el objetivo de comprobar el mecanismo de vasodilatación de dichas lectinas se realizaron estudios para comprobar la activación de la sintasa de óxido nítrico, donde se utilizó un inhibidor de esta enzima L-NAME, comprobándose de esta manera la activación de la enzima sintasa de ON por las diferentes lectinas. De la misma manera este efecto se ha comprobado con lectinas de algas marinas *Bryothamion triquetrum* (BTL) las cuales fueron inhibidas con mucina para comprobar si efectivamente las lectinas estaban reconociendo sitios glicosilados en la superficie celular, obteniéndose como resultado una inhibición del efecto vasorelajante (Kleha & col, 1991-1993; Lima & col 2004; Onzaga & col 2008).

3.5 Aplicaciones

Consecuentemente, se han realizado numerosos estudios en varias áreas de investigación básica y aplicada como son: inmunología, biología celular, bioquímica, biomedicina, inmunología, genética y adaptación/evolución. Actualmente se realizan estudios de identificación de lectinas con el objeto de ser utilizadas como herramienta de detección temprana de células cancerígenas y son explotadas como herramientas en la investigación como son en estudios histoquímicos, bioquímicos y de biología molecular, por ejemplo en la tipificación de grupos sanguíneos y bacterianos, por otro lado estas proteínas inmovilizadas en un soporte inerte son utilizadas para la purificación de macromoléculas como son enzimas, hormonas, glicoproteínas y diversos receptores de membrana como por ejemplo el receptor para la insulina (Gabiús, 1997; García-Hernández, 1999; Sharon & Lis, 1989, 1997, 2001).

4.- HIPERTENSION ARTERIAL

Una de las principales aplicaciones por la cual se caracteriza la flor de manita tanto en la medicina tradicional como en sus acciones farmacológicas es la relacionada con la hipertensión arterial, por lo que a continuación se abordan los principales aspectos de esta enfermedad

4.1. Definición

La hipertensión arterial sistémica (HAS) es una enfermedad crónica, controlable de etiología multifactorial, que se caracteriza por un aumento sostenido en las cifras de la presión arterial sistólica (PS) por arriba de 140 mm Hg (milímetros de mercurio), y/o de la presión arterial diastólica (PD) igual o mayor a 90 mmHg. Se deben de tomar en cuenta que los intervalos establecidos para la presión sanguínea normal pueden variar por ejemplo otros autores dicen que la presión sanguínea normal en PS es de 120 mm Hg y PD es de 80 mm de Hg (Guyton & Hall, 2001; Merck & col, 2003).

4.2. Descripción

La hipertensión arterial sistémica es un importante problema de salud pública, no sólo por su alta incidencia y prevalencia, sino por su estrecha asociación con el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, de acuerdo con la organización mundial de la salud OMS se estima que más de 600 millones de personas en el mundo presentan este tipo de enfermedad (Velázquez & col, 2000; Guyton & Hall, 2001; Merck & col, 2003).

4.3. Clasificación

La Hipertensión Arterial que puede ocurrir sin una causa previa que es desconocida es llamada *Hipertensión Arterial Esencial* y se sabe que entre el 85% y 90% de las personas con presión arterial elevada padecen hipertensión esencial, se cree que por lo general las causa de esta alteración están relacionado con anomalías hereditarias que afectan la constricción de los vasos sanguíneos y con esto un gasto cardíaco aumentado (Velázquez & col, 2000; Guyton & Hall, 2001; Merck & col, 2003).

Cuándo existe una causa conocida la afección se denomina *Hipertensión Arterial Secundaria*: Se calcula que entre el 10% y 15% de la población con presión arterial elevada, presentan este tipo de hipertensión (Guyton & Hall, 2001; Merck & col, 2003).

4.4. Incidencia

De acuerdo con a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2006), la prevalencia de hipertensión arterial en la población de 20 años o más en México resultó de 30.8 %. Sin embargo, 2 de cada 3 hipertensos desconoce su enfermedad, de éstos poco más de la mitad reciben tratamiento antihipertensivo y sólo el 14.6% logran su control tensional. En las mujeres, el porcentaje obtenido por diagnóstico médico previo fue mayor (18.7%) que el mismo tipo de diagnóstico realizado en los hombres (11.4%). Una relación inversa se observó en el hallazgo de hipertensión por la encuesta, con 20.1% en hombres y 12.1% en mujeres. (Olaiz & col, 2006).

De forma global los datos de esta encuesta indican que más del 50% de los hombres a partir de los 60 años presenta hipertensión arterial, mientras que, en las mujeres, la afección se presenta en casi 60% para el mismo periodo de edad. Es importante destacar que la mayor parte de los diagnósticos en las mujeres eran ya conocidos por ellas, mientras que la mayor parte de los hombres fueron diagnosticados en el levantamiento de esta encuesta. (Olaiz & col, 2006).

4.5. Causa de hipertensión arterial

Entre las causas más frecuentes de la Hipertensión Arterial Secundaria se encuentran los Trastornos Renales y entre ellos se encuentra la estenosis de la arteria renal, pielonefritis, glomerulonefritis, inflamación renal, traumatismos radioterapia que afecta a los riñones etc., así como también trastornos hormonales como: Síndrome de Cushing (aumento del cortisol); el Hiperaldosteronismo (hiperproducción de aldosterona por la glándula suprarrenal); hipertiroidismo (hiperactividad de la glándula tiroides). Otra de las causas importantes de esta alteración es el uso de ciertos fármacos como por ejemplo; antiinflamatorios no esteroideos, anticonceptivos orales, corticosteroides eritropoyetina y cocaína etc., (Guyton & Hall, 2001; Merck & col, 2003).

De la misma manera es importante mencionar que entre los principales factores de riesgo de la Hipertensión Arterial Esencial se encuentra: la obesidad, alto consumo de Sal, la vida sedentaria, el habito de fumar, abuso del alcohol, el estrés, bajo peso de nacimiento, Diabetes Mellitus entre otras (Merck & col 2003).

4.6. Tratamiento

Hasta el momento se utiliza una amplia variedad de fármacos para el control de esta enfermedad, estos se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción: Diuréticos; son los fármacos de primera elección para el

tratamiento de esta enfermedad, se caracterizan por ayudar a la eliminación de agua y sodio del organismo a través de la orina de esta manera disminuyen la cantidad de líquido en todo el organismo y con esto reduciendo la presión arterial. Inhibidores de la ECA; estos fármacos se caracterizan por inhibir la enzima convertidora de angiotensina que convierte la angiotensina I en angiotensina II que produce la constricción de las arteriolas al unirse a los receptores AT₁.

Antagonistas de los receptores AT₁ de la Angiotensina II (ARA II); los medicamentos antagonistas al unirse a los receptores de la angiotensina II, producen de esta manera la relajación del músculo liso, además un incrementan la excreción renal de sal y agua reduciendo por lo tanto el volumen plasmático, y de esta manera favoreciendo la vasodilatación o disminución de la presión arterial. Antagonistas de los receptores Beta-adrenérgicos; estos fármacos actúan inhibiendo los receptores adrenérgicos produciendo una disminución de la tensión arterial mediante la disminución de la contractilidad del miocárdica, además el bloqueo de estos receptores produce un decremento de la producción de renina con disminución resultante de la angiotensina II, produciendo de esta manera una disminución de la tensión arterial. Antagonistas de los receptores Alfa -adrenérgicos; estos fármacos bloquean de manera selectiva los receptores α -adrenérgicos reduciendo de esta manera la resistencia arteriolar. Bloqueadores de los canales de calcio; estos fármacos bloquean la entrada de calcio principalmente a las células del músculo liso arteriolar y aminorando la resistencia vascular, y de esta manera disminuyen la presión arterial.

Todos estos fármacos mencionados son muy eficaces para controlar o regular la presión arterial, pero, todos presentan reacciones adversas que pueden alterar la salud del paciente, estos efectos adversos se describen a continuación (Merck & col 2003; Olaiz & col, 2006; Goodman & col, 1997).

4.7. Efectos adversos

En la actualidad se utilizan una amplia variedad de fármacos para el tratamiento adecuado de problemas de hipertensión, pero presentan efectos secundarios adversos para el paciente. Por ejemplo: el grupo de los diuréticos generan elevación de la concentración de glucosa, ácido úrico y colesterol circulante en sangre, reducción de las concentraciones de potasio y magnesio, trastornos digestivos, en los hombres disfunción sexual y en las mujeres irregularidades menstruales. En el grupo de bloqueantes adrenérgicos se presentan; desmayos con la primera dosis, percepción de latidos cardiacos rápidos, mareo, retención de líquidos, edema, bronco-espasmos, insuficiencia cardiaca, aumento de triglicéridos, depresión, sueños vividos, alucinaciones, entre otros. El grupo de los α -agonistas de acción central; provocan

somnolencia, sequedad de boca, frecuencia cardiaca anormalmente lenta, disfunción sexual, cansancio, enfermedades autoinmunes y hepáticas. Para el grupo de los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina e inhibidores de la angiotensina II provocan; tos, elevación de la concentración de potasio, angioedema, mareo, daños fetales, entre otras (Guyton & Hall, 2001; Merck & col, 2003). Los bloqueantes de los canales de calcio producen principalmente; mareos, retención de líquidos en los tobillos, rubor cefalea pirosis, encías hinchadas, taquicardia, trastornos del sistema de conducción eléctrica del corazón. El grupo de los vasodilatadores directos los efectos adversos son; cefalea, frecuencia cardiaca anormalmente acelerada y retención de líquidos (Merck y col 2003: Olaiz y col, 2006).

II.- SITUACION

Las lectinas vegetales han sido ampliamente estudiadas analizando sus propiedades, estructuras, pues se ha demostrado su alta correlación con las diferentes funciones biológicas que poseen.

En la flor de manita, hasta donde sabemos, no existen reportes de lectinas, por lo que el presente trabajo de investigación constituye el primer estudio, a nivel mundial que generará un aporte al conocimiento de estas proteínas en el área de glicobiología.

Por otro lado, es evidente que esta planta es una fuente potencial de productos terapéuticos, sorprendentemente no existen datos en la literatura en los que se reporten proteínas en la flor de manita. Por lo que además de identificar y purificar lectinas se tiene como objetivo estudiar el posible efecto biológico en la hipertensión ya que se utiliza en la medicina tradicional principalmente para regular la presión arterial y además se han reportado sus acciones vaso-relajadoras del extracto acuoso de esta planta.

En la actualidad se utilizan una amplia variedad de fármacos para el tratamiento adecuado de problemas de hipertensión, pero todos presentan efectos secundarios adversos para el paciente. Por ejemplo: el grupo de los diuréticos generan elevación de la concentración de glucosa, ácido úrico y colesterol circulante, trastornos digestivos y en los hombres disfunción sexual; En el grupo de bloqueantes adrenérgicos, se presentan desmayos, mareo, edema, bronco-espasmos, insuficiencia cardiaca, aumento de triglicéridos, depresión, entre otros. El grupo de los α -agonistas de acción central provocan somnolencia, cansancio, enfermedades autoinmunes y hepáticas. El grupo de los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina e inhibidores de la angiotensina II provocan tos, angioedema, mareo, daños fetales, entre otras (Guyton & Hall, 2001; Merck & col, 2003).

En el tes o infusión de esta planta no se ha reportado toxicidad (Méndez, 2006). Por lo que genera una alternativa que apoye a un tratamiento médico adecuado y que mejore la calidad de vida de los pacientes con el beneficio de que los efectos secundarios antes descritos no se presenten. Además se ha reportado que algunas lectinas de plantas como la concavalina-A, la aglutinina del germen del trigo entre otras, activan la síntesis de óxido nítrico produciendo un efecto de vasorrelajación en anillos íntegros de arterias aisladas.

III.- HIPOTESIS:

- Las lectinas presentes en la flor de manita contienen actividad vasorelajadora.

IV.- OBJETIVO GENERAL:

- Identificar la presencia de lectinas en la flor de manita y analizar su función vaso relajadora.

V.- OBJETIVOS PARTICULARES:

- Comprobar la actividad hemaglutinante en extractos crudos de flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*).
- Purificar y caracterizar la(s) lectina(s) presentes en los extractos de flor de manita.
- Analizar la participación en funciones biológicas (vasorrelajantes) presentes tanto en los extractos crudos, en las fracciones proteicas y en las lectinas purificadas.

VI MATERIAL

- Extracto crudo de flor de manita *Chiranthodendron pentadactylon*.
- Ratas macho Wistar (250-350g)
- Reactivos con grado analítico
- Panel de fenotipo conocido formado por los siguientes tipos sanguíneos humanos (A₁, A₂, B y O) donado por el Banco Central de Sangre, IMSS México.
- Sangre de animales (bovino, equino, caprino y ovino).

VII METODOS

Obtención del extracto crudo

Para la obtención del extracto crudo se utilizaron 300g de flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) se homogenizaron en mortero, posteriormente se filtro el homogenizado pasándolo por varios filtrós de diferente diámetro del poro, posteriormente se centrifugó (1500rpm por 30 min a 4°C) y al sobrenadante se le denomino extracto crudo.

Ensayo de hemaglutinación

El ensayo de hemaglutinación consiste en la agregación sistemática de células mediada por macromoléculas específicas (anticuerpos o lectinas) que reconocen estructuras moleculares determinadas (antígenos) sobre la superficie celular, este ensayo se realizo utilizando un panel de fenotipo conocido formado por los siguientes tipos sanguíneos humanos (A₁, A₂, B y O) donado por el Banco Central de Sangre, IMSS México. Este ensayo se desarrollo en placas de 96 pozos (Corning incorporatedd NY 14831) utilizando el proceso de dilución serial (Debray & col, 1981). Los resultados se expresaron como unidades de hemaglutinación y como actividad específica. Una unidad de hemaglutinación se define como la cantidad de lectina capaz de aglutinar y por lo tanto precipitar el 75% de los eritrocitos en suspensión después de los 60 minutos (Bonay & Fresno, 2000). Las unidades de hemaglutinación se obtienen en la última dilución en la que se observa aglutinación, la actividad específica se expresa como el resultado de las unidades de hemaglutinación /mg proteína. La concentración mínima de proteínas necesaria para producir hemaglutinación se obtiene con la última dilución que conserva la actividad. El ensayo se desarrollo con un control negativo (carente de hemaglutinación) y con uno positivo (con una fuente de hemaglutinación (Fenton NB & col, 2003; Rodríguez & col, 2004).

Cuantificación de proteínas

Un procedimiento simple para la determinación de la concentración de la proteína en soluciones es el análisis de proteína por el método de Bradford. La cuantificación de proteínas por este método involucra la *unión* de un colorante, el Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) a los grupos aminos del enlace peptídico de las proteínas. La solución del colorante libre es de color rojizo (máxima absorción a 465 nm) y cambia al azul (máxima absorción a 595 nm). La unión es un proceso rápido (aproximadamente 2 minutos) y el complejo colorante-proteína se mantiene estable hasta una hora después de producido. En este ensayo se realizó una curva patrón utilizando BSA (albúmina bovina), Buffer y Bradford, se miden con 595 nm y la concentración de muestras problema se obtienen interpolando las absorbancias obtenidas en la curva (Reyes & col 1985).

Determinación de carbohidratos

Reacción de Benedict

Una de las reacciones más comunes en la identificación de carbohidratos es la reacción de Benedict. Esta reacción es específica para azúcares con grupo reductores libres (C=O). Todos los monosacáridos poseen un grupo reductor libre. Los disacáridos maltosa y lactosa tienen grupos reductores libres, pero la sacarosa no los posee, ya que se pierden los grupos reductores de sus componentes cuando ésta es formada. Esta reacción se basa en la capacidad del carbohidrato de reducir el Cu^{2+} (cobre oxidado) en un medio alcalino. Este Cu^{1+} (cobre reducido) se oxida y precipita en forma de Cu_2O , lo que proporciona la coloración positiva de la reacción. La coloración dependerá de la concentración de óxido de cobre y ésta a su vez de la reducción del cobre; va desde verde, amarillo, anaranjado o rojizo, dependiendo de la coloración, las muestras se hacen reaccionar con el reactivo de Benedict, llevándose a ebullición, los resultados de cambio de coloración se comparan en la curva obtenida para con glucosa bajo diferentes concentraciones medida a 490 nm (Quiñones Z, 2004).

Reacción Fehling

El reactivo de Fehling, también conocido como Licor de Fehling, es una disolución descubierta por el químico alemán Hermann von Fehling que se utiliza como reactivo para la determinación de azúcares reductores. Se basa en el carácter reductor de los monosacáridos. Si el glúcido que se investiga es reductor, se oxidará dando lugar a la reducción del sulfato de cobre (II), de color azul, a óxido de cobre (I), de color rojo-anaranjado (Quiñones Z, 2004).

Determinación de carbohidratos método de Dubois

Otro de los métodos de gran importancia para la determinación e identificación de azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados es el método de Dubois, este método involucra la reacción de fenol y de ácido sulfúrico concentrado con las muestras mencionadas dando una coloración naranja-rosado. Se elabora una curva patrón de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$ con un carbohidrato elegido (glucosa). Se leen las muestras a 490nm para hexosas y a 480nm para pentosas. Las absorbancias obtenidas de las muestras problema se interpolan en la curva, dando como resultado la concentración presente en estas muestras. Esta reacción es muy sensible y la coloración es estable por varias horas. Esta metodología es muy útil en la determinación de pequeñas cantidades de carbohidratos presentes en diversas sustancias (Dubois, 1956).

Precipitación salina

La mayoría de las proteínas son menos solubles a concentraciones elevadas de sal, un efecto llamado precipitación salina. Las concentraciones de sal en la que precipita una proteína varían de una proteína a otra; de aquí que se puede utilizar para fraccionar proteínas en base a su peso molecular y solubilidad (Stryer & col, 2003). Una de las sales de mayor uso en la precipitación salina es el sulfato de amonio. El sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es el reactivo de mayor uso en la bioquímica, y se debe a su gran solubilidad en el agua, permitiendo alcanzar fuerzas iónicas muy elevadas y tradicionalmente utilizado para la precipitación de lectinas (Lehninger, 2003). Es de gran importancia tomar en cuenta que al llevar a cabo una precipitación fraccionada se requiere de un control cuidadoso de la concentración activa del reactivo a un nivel adecuado y predeterminado (Skoog & col, 2001). El ensayo de precipitación salina se realizó en base a las concentraciones de sal establecidas en la metodología publicada por (Dawson & col 1969).

Diálisis

La diálisis es un procedimiento en el que componentes de alto peso molecular, se pueden separar de las moléculas pequeñas a través de una membrana semipermeable, como puede serlo una membrana porosa como el celofán (acetato de celulosa) es el material de diálisis que se emplea más comúnmente, aunque se emplean de modo semejante *nitrocelulosa* y colodión. Las moléculas con dimensiones significativamente mayores que el diámetro del poro se retienen dentro la bolsa de diálisis mientras que las moléculas más pequeñas tales como las del disolvente, sales y metabolitos pequeños atraviesan los poros de esta membrana y aparecen en el dializado fuera de la

membrana porosa de la diálisis. Esta técnica es muy útil para retirar la sal u otras moléculas pequeñas pero no discriminara de forma efectiva las proteínas entre sí (Stryer & col, 2003; Voet & col, 2003). Para realizar las diálisis se utilizaron membranas Spectra-Por MWCO: 3500 (Spectrum Laboratories, Inc.) y agua tridestilada por lo menos tres lavados.

Liofilizado

El procedimiento de la liofilización consiste en la eliminación del disolvente mediante el procedimiento de sublimación, en el cual la muestra es congelada y sometida a una cámara de alto vacío, para favorecer que los solventes pasen del estado sólido a vapor, lo que permite la concentración de la muestra (Lehninger, 2003; Voet & col, 2003; es.wikipedia.org/wiki/Liofilización).

Cromatografía de exclusión molecular

También llamada cromatografía de filtración en gel o cromatografía de tamiz molecular, en esta las proteínas se separan de acuerdo a su tamaño y formas. Para realizar la separación la muestra se coloca en lo alto de una columna rellena de bolitas porosas compuestas de un polímero insoluble, pero altamente hidratado, normalmente es un polisacárido entrecruzado como; Dextrano, Agarosa o Poli(acrilamida). Sephadex, Sepharosa y Biogel que son preparaciones comerciales. Se elige la porosidad del gel de modo que las moléculas más pequeñas de la mezcla puedan penetrar en las esferas mientras que las mayores no pueden hacerlo. El resultado es que las moléculas pequeñas se distribuyen principalmente en el interior, mientras que las moléculas grandes se localizan solamente en la disolución. Por lo que las moléculas grandes fluyen más rápidamente a través de la columna y por lo tanto saldrán primero de la columna. Las moléculas que son de tamaño intermedio y que pueden penetrar en las bolitas solo parcialmente fluirán de la columna en posición intermedia y las moléculas pequeñas, que siguen un camino más largo saldrán al último. En este trabajo se utilizo Sephadex G 75 la cual fue hidratada y montada en una columna de 9.5 X 1 cm, utilizándose como amortiguador PBS 0.1M con 0.3M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Mathews & col, 2002; Stryer & col, 2003).

Electroforesis en SDS-PAGE (Gel de Poli(acrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio)).

Las proteínas se pueden separar de acuerdo con sus masas moleculares utilizando electroforesis en gel de poli(acrilamida, en condiciones desnaturizantes. La mezcla de proteínas se disuelve primero con dodecil

sulfato sódico (SDS *sodium dodecyl sulfate*) detergente aniónico que rompe casi todas las interacciones no covalentes en las proteínas. También se añade mercaptoetanol al 5% o ditioneol para reducir los puentes disulfuro, formándose complejos SDS-proteína, para esto se calienta la muestra 10min a 100°C. Una vez preparada la muestra se preparan los microgeles de 1cm de grosor por 6 cm de longitud utilizando un sistema de amortiguadores Laemmli (1970) en cámaras Mini-Proteom II (Bio-Rad Richmond,CA), el el gel concentrador se prepara al 4% de acrilamida y al 12% en el gel separador, una vez solidificado el gel las muestras se colocan en cada una de las muescas practicadas en la parte superior del gel y la corriente se mantiene conectada hasta que la banda del colorante este cerca de la parte inferior del gel. Por último se retiran los geles y se tiñen las proteínas presentes en estos ya sea con plata o con un colorante como el azul de Comassie. Como resultado las proteínas pequeñas se desplazan rápidamente a través del gel, mientras que las grandes se quedan arriba, junto al lugar de aplicación de muestra, posteriormente se elabora una curva con las distancias recorridas por los marcadores y se interpola la distancia recorrida por la muestra problema (rf) obteniéndose el peso molecular aparente (Mathews & col, 2002. Stryer & col, 2003).

Electroelución de proteína a partir de gel de poliacrilamida.

La electroelución es un método que nos permite la recuperación de proteínas a partir de geles de poliacrilamida para su posterior análisis y aplicación. Una vez realizada la electroforesis se corta el gel de poliacrilamida de forma horizontal donde se encuentra la banda que se desea purificar y es introducida dentro de un tubo de vidrio de la cámara de electroelución el cual tiene un filtro y una membrana por donde pasan las proteínas al aplicar la corriente eléctrica, una vez obtenida la muestra se realiza la diálisis para la eliminación de sales (John & col. 2007).

Isoelectroenfoque

Las proteínas también pueden separarse electroforéticamente en base a sus contenidos relativos de aminoácidos ácidos o básicos, es importante mencionar que el punto isoeléctrico de una proteína es el pH en el que la carga neta es cero. Este método para separar proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico se conoce como *Isoelectroenfoque*. El gradiente de pH en el gel se consigue sometiendo a electroforesis previa una mezcla de polianfolitos (polímeros pequeños con múltiple carga) con diferentes valores de pl. Esta metodología permite distinguir proteína que difieren en sus pl tan poco como 0.01 lo que significa que se pueden separar proteínas que difieren en una sola carga neta. Para realizar el isoelectroenfoque se utilizo un kit de marcadores

Phast-Gel IEF 3-9 con un equipo de separación y control de unidades Phast System (Stryer & col, 2003).

Afinidad para carbohidratos

Para determinar la actividad específica de la lectina presente en la flor de manita se realizó comparando la actividad inhibidora de varios carbohidratos en la hemaglutinación inducida por la lectina, se inicia realizando una dilución 1:24 de los carbohidratos a una concentración 200 milimolar mM, posteriormente se incorpora la muestra problema (lectina) para la evaluación con el tipo sanguíneo al cual es específica esta lectina. Los resultados de este estudio se expresan como la mínima concentración requerida para inhibir completamente la actividad de la lectina en estudio. Los carbohidratos utilizados para este análisis fueron; D-Galactosa (Gal), N-acetil-galactosamina (GalNAc), Galactosa acetilada (GalAcet), D-glucosa (Glc), N-acetil-glucosamina (GlcNAc), D-fucosa (Fuc), D-manosa (Man), D-fructosa (Fruc), D-xilosa (Xyl), D-sacarosa (Sac), D-ribosa (Rib), D- lactosa(Lac) y ácido N-acetilneuramínico (NANA) (Hernández C, 2005).

Dicroísmo circular (CD)

Es una técnica espectroscópica de absorción muy ampliamente utilizada para proveer información sobre la estructura de macromoléculas biológicas, en el caso de las proteínas permite determinar la estructura secundaria, así como los cambios que pueda sufrir al tratarla con metabolitos como temperatura, urea, cambios de pH, aminoácidos etc. Este método se basa en la diferencia entre la Absorbancia (A) de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda (l) y hacia la derecha (r): para que exista esta diferencia de absorbancia las moléculas a analizar deben ser quirales, es decir, no disponer de un plano de simetría y no ser superponibles con su imagen especular, al resultado de la diferencia de esta absorbancia se le conoce como fenómeno de dicroísmo circular. En este método se utiliza poco material: 200 μ L de 0.5 mg/mL de solución. Es un método no destructivo. Estudio de cambios de entorno: pH, agentes desnaturizantes, Temperatura. Desempeña un papel importante en la determinación de los componentes estructurales de las proteínas. Es rápido y se puede utilizar para analizar un número de proteínas candidatas a posteriores estudios estructurales más detallados como RMN y Rayos-X. Capacidad de detectar cambios estructurales en una proteína que ha sufrido alguna perturbación. Comparación de estructuras manipuladas por ingeniería de proteínas frente a la especie nativa

La absorbancia del solvente interfiere en la región de UV. Hay que trabajar con amortiguadores muy diluidos y que no absorban a < 200 NM- Medidas sujetas a errores experimentales. La determinación de los porcentajes

de elementos de estructura secundaria no es realista. Se obtiene poca información de estructura terciaria o cuaternaria (Fina, 2006; <http://www.physics.nus.edu.sg/~Biophysics/pc3267/CD-2007.pdf>).

El espectro del DC se midió utilizando un espectropolarímetro (JASCO J-720) equipado con un adaptador de celdillas termostático Peltier. Se utilizaron celdillas de 1 mm de cuarzo para ser evaluadas en el lejano UV. Corregidos con la línea basal del solvente utilizado.

La solución de la muestra contiene una concentración final de 0.5 mg/mL en H₂O, amortiguador de fosfatos (monobásico 0.05M) y PBS (0.1M) se filtraron con membranas de 0.22 µm (Millipore, Ireland). Se realizó a 25°C y el espectro de DC se monitoreó entre 200 y 260 nm.

Tres mediciones se reunieron y se promediaron para obtener el espectro final en todos los casos. Los resultados se expresan como la media de la elipicidad $[\theta]_{mrv}$, utilizando un valor de 109.86 g /mol para el peso molecular del residuo promedio. La estimación de la estructura secundaria del UV lejano y el espectro CD se calculó utilizando CDNN (Böhm, G.; Muhr, R.; Jaenicke, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural Networks. Protein Eng. 1992, 5: 191-195).

Actividad biológica

Análisis de la actividad vaso relajante

Para la realización de este método se utilizaron ratas Wistar (macho) de 250 a 350g, las cuales fueron sacrificadas con dióxido de carbono, una vez sacrificada la rata se removió la arteria aorta marcando el segmento torácico y abdominal depositándolas en solución de Krebs-Heinseleit, cuya composición (M) es: NaCl 41.4g, KCl 2.1g, CaCl₂ 2.2g, NaHCO₃ 12.6g, KH₂PO₄, 0.96g, MgSO₄·7H₂O 1.74g, EDTA 0.06g y Dextrosa 12.6g pH 7.4 (onzaga & col 2008; Perusquia & col 1995). Se elimina el tejido adiposo y conectivo, posteriormente se cortaron en anillos de 4-5 milímetros aproximadamente. Los anillos de aorta fueron montados en cámaras de incubación de 10ml con la solución de Krebs manteniéndose a burbujeo constantemente con una mezcla de gas carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂) a un pH de 7.4. Quedando de esta manera las arterias conectadas mediante ganchos de acero inoxidable al transductor isométrico el cual envía las señales al equipo de adquisición de señales BIOPAQ A-CE. A cada uno de los anillos montados se les ajusto la tensión basal a 3g dejándose en reposo durante 60 minutos renovándose la solución de Krebs-Heinseleit cada 15 minutos. La viabilidad del tejido se determinó mediante la estimulación de vasoconstricción con fenilefrina -6M y posteriormente la adición de carbacol a la -6M. Una vez comprobada la viabilidad e integridad del tejido se deja en reposo durante 60 min para poder estimular nuevamente con FE-6M y posteriormente poder adicionar y evaluar la muestra problema (Klea & col, 1991; Feelisch & col, 1999; Lima & col, 2004; Morán & col, 2008).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados de este trabajo se aplicaron medidas de tendencia central como: media (\bar{X}), medidas de dispersión como: Desviación estándar (DE), error estándar (EE), una vez obtenidos los datos mediante estas pruebas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) el cual sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. Posteriormente se aplicaron pruebas de contraste (Dunnett) las diferencias con un valor de $p \leq 0.05$ se consideraron significativas. Para realizar este análisis se utilizó el programa GraphPad Prisma 4.0 y Sigma Stat ver 3.1.

RESULTADOS

EXTRACTO CRUDO

Actividad hemaglutinante del extracto crudo

Para determinar la presencia de lectinas en la flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), se llevo a cabo un ensayo de hemaglutinación utilizando los cuatro grupos sanguíneos humanos (A₁, A₂, B y O), este ensayo se realiza con un control positivo y uno negativo con el cual se compara y comprueba que la actividad observada se relaciona con la muestra a estudiar. Como se puede observar en la tabla 5 y figura 5 se observa actividad con los cuatro grupos sanguíneos, lo que indica que existen más de una lectina presentes en el extracto de esta planta.

Tabla 5. Actividad hemaglutinante del extracto crudo

GRUPO SANGUINEO	UHA	AE	C
A ₁	32123 ± 8298	85291 ± 27401	8 ± 3
A ₂	73280 ± 19859	156489 ± 40510	5 ± 2
B	63803 ± 20261	111189 ± 39431	1 ± 0.4
O	62228 ± 22482	136792 ± 45258	1 ± 0.3

Los resultados representan la media ± E.E. (error estándar) de n=10 ensayos independientes por duplicado. Se observa actividad hemaglutinante de éste extracto con los cuatro grupos sanguíneos UHE.- Unidad de hemaglutinación, AE.- Actividad específica (UHE/Concentración de proteína mg/mL y C: Mínima concentración de proteína necesaria para generar una aglutinación µg/mL. Concentración de proteína 0.510 ± 0.027 mg/mL.

En la Figura 5 se esquematiza la actividad específica del extracto crudo utilizando los cuatro diferentes grupos sanguíneos, como se observa con A₁ se obtuvo una menor actividad que con el resto de los demás grupos. Sin embargo, cuando se realizó el análisis estadístico ANOVA de una vía los resultados muestran diferencias no significativas. Lo que indica que el extracto crudo presenta una mezcla de lectinas con una afinidad similar para los diferentes tipos de carbohidratos.

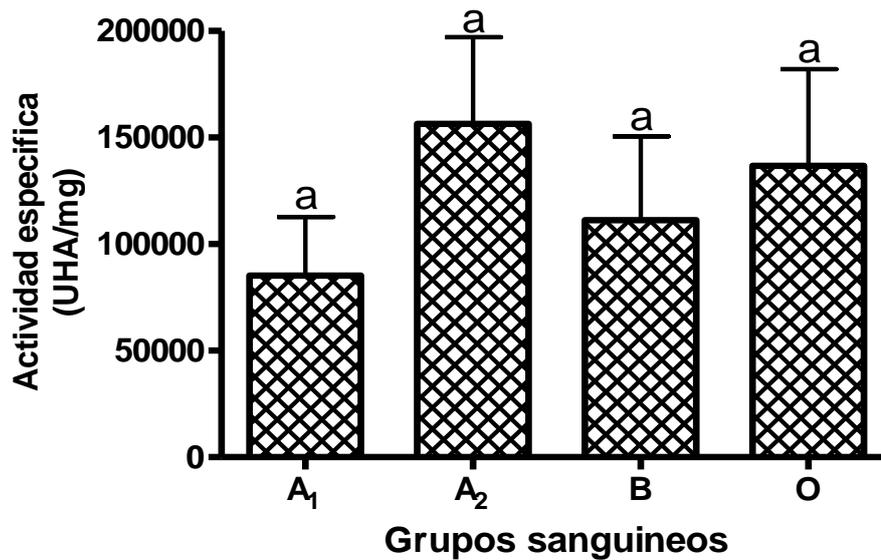


Figura 5. Actividad hemaglutinante del extracto crudo- Los resultados representan la media \pm EE (error estándar) de n=10 ensayos independientes por duplicado. Las letras iguales indican que no existe diferencia estadística significativa $p>0.05$ (Tukey) entre los grupos sanguíneos.

Separación de pigmentos (metanólicos y alcohólicos)

Una vez determinada la presencia de lectinas en la flor de manita se inicio con la remoción de pigmentos o flavonoides que pudieran interferir con la caracterización y purificación de las lectinas presentes en el extracto crudo, para la remoción de pigmentos se utilizo acetona: en esta fracción (acetónica) se eliminan pigmentos (amarillos e incoloros) poco hidroxilados como epicatequina y catequina tabla 6. Una vez removidos la mayor parte de estos pigmentos se continua con la remoción de los demás pigmento altamente hidroxilados o glicosilados como tirilosido, astragalina, quercetina 3-O-glucosa mediante alcohol etílico, en esta fracción (alcohólica) se eliminan los pigmentos de color amarillo, naranja, rojos e incoloros tabla 6.

Tabla 6. Remoción de pigmentos de extracto crudo

	PIGMENTOS	
FRACCION ACETONICA	Epicatequina y catequina	Amarillo e incoloras
FRACCION ETANOLICA	Tirilosido, astragalina, quercetina 3-O-glucosa	Amarillo, naranja, rojo e incoloras

Cuantificación de carbohidratos

Con el objetivo de determinar el grado de separación y purificación de las proteínas (lectinas) del extracto crudo, una vez obtenidas las fracciones

acetónicas y alcohólicas se determinó la concentración de carbohidratos presentes en estas fracciones mediante la reacción de Feheling, obteniéndose como resultado una gran eliminación de carbohidratos durante el proceso de remoción de pigmentos, los resultados se pueden observar en la tabla 7.

Tabla 7. Cuantificación de carbohidratos reacción de Feheling

EXTRACTO CRUDO	17.9 mg/mL	100%
FRACCION CETONICA	8.4 mg/mL	47%
FRACCION ETANOLICA	6.6mg/mL	36%

Actividad hemaglutinante con eritrocitos humanos y animales

Al obtener cada una de las fracciones libres de los componentes no proteicos se determinó la actividad hemaglutinante de cada una de ellas, con el objetivo de corroborar la presencia e integridad de lectinas en cada una de las fracciones, los resultados se observan en la tabla 8, también con el fin de determinar la heterogeneidad de las lectinas se determinó la actividad hemaglutinante con eritrocitos de animales (bovino, caprino, ovino, equino).

Tabla 8. Actividad hemaglutinante con eritrocitos animales

GRUPO SANGUINEO	EXTRACTO CRUDO	FRACCION ACETONICA	FRACCION ETANOLICA
A ₁	69917 ± 19277	238762 ± 24412	191187 ± 27479
A ₂	138888 ± 45082	131916 ± 53896	279783 ± 11511
B	113717 ± 46391	80451 ± 26595	57122 ± 13463
O	109120 ± 44679	42642 ± 14019	191187 ± 27479
BOVINO	27749 ± 11679	25885 ± 10144	13953 ± 4147.1
CAPRINO	95833 ± 9574	85765 ± 23342	62112± 24634
OVINO	221993 ± 94434	38809 ± 26668	204025 ± 15887
EQUINO	266868 ± 26818	27643 ± 3663	285885 ± 140054

Los resultados representan la media ± EE (error estándar) de n=10 ensayos independientes por duplicado para extracto crudo y n=6 para fracción acetónica y metanólica. Numéricamente se observa una mayor actividad hemaglutinante con el tipo sanguíneo humano A₂ y de animales con equino y ovino. UHE.- Unidad de hemaglutinación, AE.- Actividad específica (UHE/Concentración de proteína mg/mL y C: Mínima concentración de proteína necesaria para generar una aglutinación µg/mL.

Una vez determinada la presencia de lectinas en el extracto crudo y realizada la remoción de los componentes no proteicos que pudieran interferir con la purificación de las lectinas, se procedió a realizar la purificación.

Precipitación fraccionada con sulfato de amonio

La precipitación se realizó añadiendo concentraciones crecientes de sulfato de amonio en los intervalos de 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100%, a continuación se presentan los resultados obtenidos al realizar el análisis de la actividad hemaglutinante de cada una de las concentraciones utilizadas.

Concentración de 0-20%

Las lectinas que precipitan bajo esta concentración salina presentan los siguientes resultados Tabla 9 y Figura 6. Se observa mayor actividad hemaglutinante con el grupo A₁ lo que está indicando que las lectinas que precipitaron en esta concentración tienen mayor especificidad hacia los carbohidratos GalNAc-Gal-Fuc.

Tabla 9. Actividad de la concentración 0-20% de sulfato de amonio.

GRUPO SANGUINEO	UHE	AE	C
A ₁	61440 ± 14482	383383 ± 90364	0.1 ± 0.02
A ₂	30720 ± 6477	191697 ± 24151	0.2 ± 0.02
B	7680 ± 1810	47922 ± 11296	1 ± 0.2
O	7680 ± 1810	47922 ± 11296	1 ± 0.2

Los resultados representan la media y EE (n=5) de ensayos independientes por duplicado. Se observa actividad hemaglutinante con los cuatro grupos sanguíneos con mayor especificidad hacia el grupo A₁ p<0.001 (Tukey). UHE.- Unidad de hemaglutinación, AE.- Actividad específica (UHE/Concentración de proteína mg/mL) y C Mínima concentración de proteína necesaria para generar una aglutinación µg/mL. Concentración de proteína 0.186 ± 0.07 mg/mL.

Al realizar el análisis de varianza ANOVA de una vía seguido de una prueba de contraste de Tukey se puede observar en la Figura 4 que únicamente entre los grupos B y O no existe diferencia significativa.

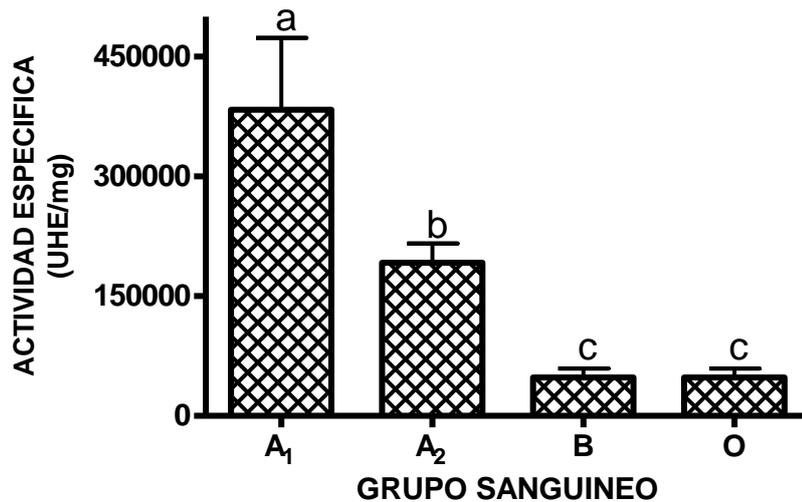


Figura 6 Actividad Hemaglutinante del intervalo 0-20% de sulfato de amonio. Los resultados representan la media y EE (n=5) de ensayos independientes por duplicado. Las letras diferentes indican las diferencias significativas $p < 0.001$ (Tukey) entre los grupos sanguíneos en la que se observa que únicamente entre los grupos B y O no existe diferencia significativa.

Concentración de 20-40%

En la siguiente concentración de sulfato de amonio utilizada, 20-40% se obtuvo una mayor actividad con los grupos sanguíneos A₁ y A₂ comparados con los grupos B y O quienes tuvieron muy poca actividad. Esto indica que las lectinas presentes en esta fracción reconocen con mayor especificidad los carbohidratos terminales del grupo A₁ y A₂ (GalNAc-Gal-Fuc), tabla 10.

Tabla 10.- Actividad de la concentración 20-40% de sulfato de amonio.

GRUPO SANGUINEO	UHE	AE	C
A ₁	61440 ± 144812	378589 ± 11379	0.1 ± 0
A ₂	20640 ± 7680	198049 ± 74320.1	14 ± 5
B	80 ± 47	354 ± 250	28 ± 13
O	160 ± 113	708 ± 500	14 ± 5

Los resultados representan la media y EE (n=5) de ensayos independientes por duplicado. Se observa actividad hemaglutinante con los cuatro grupos sanguíneos $p < 0.001$ (Tukey). UHE.- Unidad de hemaglutinación, AE.- Actividad específica (UHE/Concentración de proteína mg/mL) y C: Mínima concentración de proteína necesaria para generar una aglutinación µg/mL. Concentración de proteína 0.140 ± 0.003 mg/mL.

Para el análisis de estos datos se realizó un prueba de varianza ANOVA de una vía seguido de una prueba de contraste de Tukey con la cual se determinó que entre el grupo B y O no hay diferencia significativa, figura 7. Es

importante mencionar que esta diferencia se debe a la separación salina en base a su peso molecular.

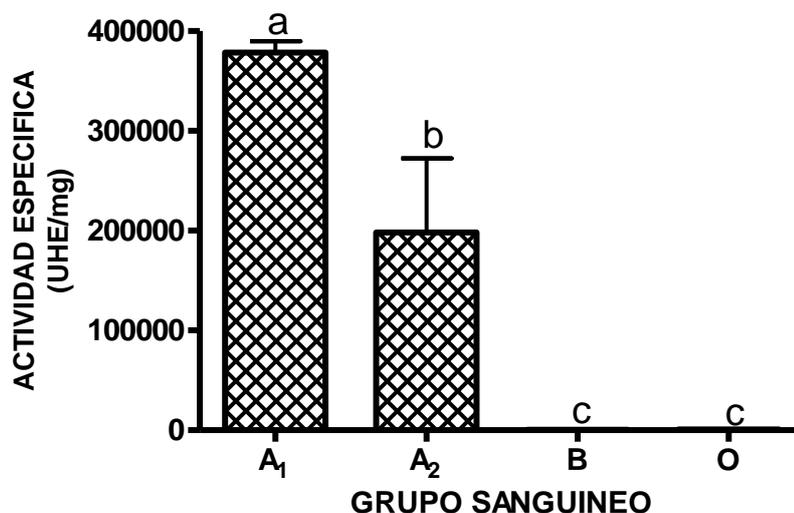


Figura 7. Actividad Hemaglutinante del intervalo 20-40% de sulfato de amonio. Los resultados representan la media y EE (n=5) de ensayos independientes por duplicado. Las letras indican las diferencias significativas $p < 0.001$ (Tukey) entre los grupos sanguíneos. En la que se observa que no existe diferencia significativa entre el grupo B y O.

Concentración de 40-60%

En este intervalo de concentración de sulfato de amonio se puede apreciar que se presenta una mayor actividad hemaglutinante con el grupo sanguíneo B lo que indica que se está llevando a cabo una separación adecuada de las proteínas presentes y que este tipo de lectinas están reconociendo con mucho mayor especificidad a los carbohidratos Gal-Fuc-Fuc presentes en este tipo sanguíneo. Lo anterior se presenta en la Tabla 11 y en la Figura 8.

Tabla 11. Actividad de la concentración 40-60% de sulfato de amonio.

GRUPO SANGUINEO	UHE	AE	C
A ₁	41000 ± 28935	325 ± 229	31 ± 11
A ₂	1920 ± 241	15593 ± 1964	2.9 ± 0.4
B	92160 ± 5068	249494 ± 58806	0.2 ± 0.04
O	82000 ± 57869	21441 ± 12242	16 ± 7.4

Los resultados representan la media y EE (n=5) de ensayos independientes por duplicado. Se observa actividad hemaglutinante con los cuatro grupos sanguíneos, $p < 0.001$ (Tukey). UHE.- Unidad de hemaglutinación, AE.- Actividad específica (UHE/Concentración de proteína mg/mL) y C: Mínima concentración de proteína necesaria para generar una aglutinación $\mu\text{g/mL}$. Concentración de proteína 0.111 ± 0.014 mg/mL.

Como se puede apreciar en la figura 8, al utilizar el grupo sanguíneo B se obtuvo la mayor actividad, esta es significativamente diferente al resto de los tipos sanguíneos, por lo que las lectinas contenidas en este intervalo salino reconocen Gal-Gal-Fuc.

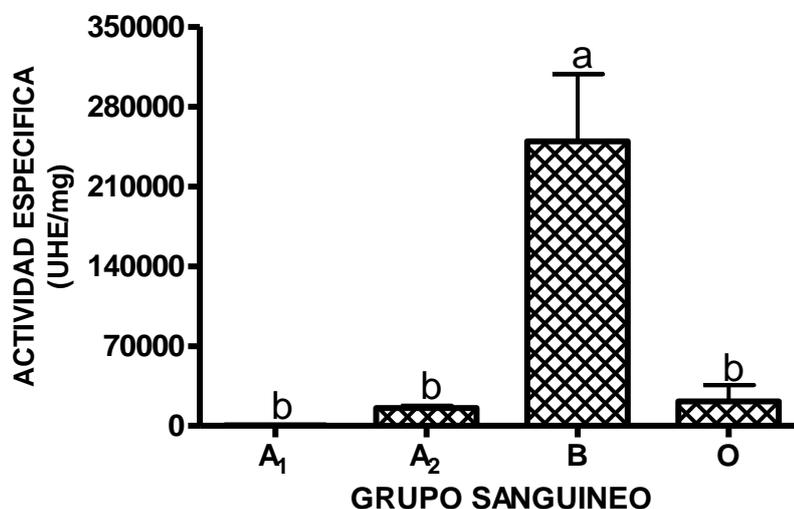


Figura 8 Actividad Hemaglutinante del intervalo 40-60% de sulfato de amonio. Los resultados representan la media y EE (n=5) de ensayos independientes por duplicado. Las letras indican las diferencias significativas $p < 0.001$ (Tukey) entre los grupos sanguíneos, en la que se observa un incremento en la actividad hemaglutinante del grupo B que es significativamente diferente de A₁, A₂ y O.

Concentración de 60-80%

En la precipitación fraccionada de 60-80% se puede observar que hay una mayor actividad para el grupo sanguíneo A₁ y A₂. Lo que indica que las lectinas presentes en estas fracciones tienen una gran especificidad hacia GalNAc-Gal-Fuc (grupo A₁ y A₂). Estas actividades fueron significativamente diferentes a las obtenidas con los grupos B y O, los cuales presentaron una actividad muy baja. Los resultados de la Tabla 12 y la Figura 9 son semejantes a lo observado en el intervalo de 20-40%, sin embargo en esta concentración no se observan diferencias entre A₁ y A₂.

Tabla 12. Actividad de la concentración 60-80% de sulfato de amonio.

GRUPOSANGUINEO	UHE	AE	C
A ₁	61440 ± 14482	567617 ± 133788	1 ± 0.01
A ₂	61440 ± 14482	567617 ± 133788	1 ± 0.01
B	320 ± 216	2956 ± 2090	4 ± 2
O	640 ± 234	5912 ± 2234	2 ± 0.4

Los resultados representan la media y EE (n=5) de ensayos independientes por duplicado. Se observa actividad hemaglutinante con los cuatro grupos sanguíneos aunque en una proporción mucho mayor para A₁ y A₂, y en B es mínima, $p < 0.001$ (Tukey). UHE.- Unidad

de hemaglutinación, AE.- Actividad específica (UHE/Concentración de proteína mg/mL) y C: Mínima concentración de proteína necesaria para generar una aglutinación en $\mu\text{g/mL}$. Concentración de proteína 0.110 ± 0.002 mg/mL.

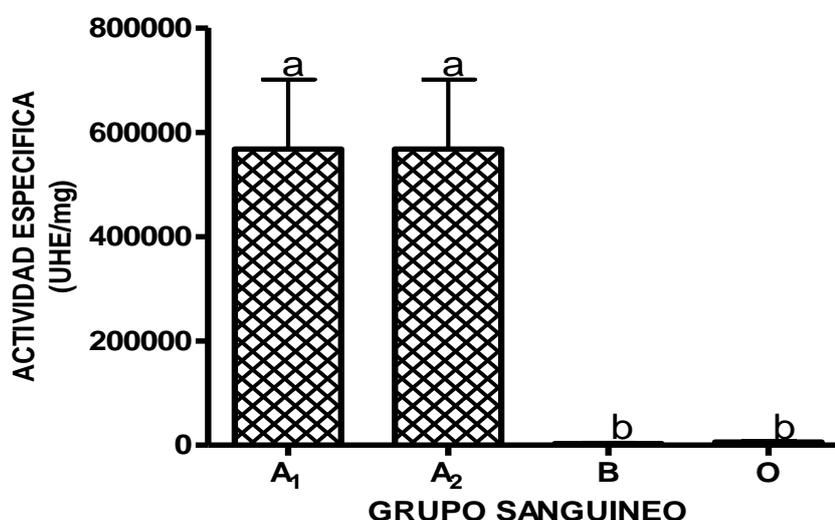


Figura 9. Actividad Hemaglutinante del intervalo 60-80% de sulfato de amonio. Los resultados representan la media y EE (n=5) de ensayos independientes por duplicado. Las letras indican las diferencias significativas $p < 0.001$ (Tukey) entre los grupos sanguíneos, en la que se observa un incremento en la actividad hemaglutinante del grupo A₁ y A₂ en las cuales no hay diferencia significativa pero comparadas con B y O estas si presentan diferencia significativa.

Concentración de 80-100% precipitado (pp)

En la concentración de 80-100% precipitado se puede observar que existe actividad hemaglutinante con los cuatro grupos sanguíneos aunque es importante mencionar que la mayor actividad se presenta con el grupo sanguíneo A₂, estos resultados se muestran en la Tabla 13 y Figura 10.

Tabla 13. Actividad de la concentración 80-100% pp de sulfato de amonio

GRUPO SANGUINEO	UHE	AE	C
A ₁	160 ± 113	1047 ± 740	10 ± 5
A ₂	163840 ± 0	1224110 ± 57411	0.03 ± 0
B	30720 ± 7241	220027 ± 33959	0.2 ± 0.02
O	6400 ± 2716	51377 ± 24483	1 ± 0.6

Los resultados representan la media y EE (n=5) de ensayos independientes por duplicado. Se observa actividad hemaglutinante con los cuatro grupos sanguíneos aunque en una proporción mucho mayor para A₂. $p < 0.001$ (Tukey). UHE.- Unidad de hemaglutinación, AE.- Actividad específica (UHE/Concentración de proteína mg/mL) y C: Mínima concentración de proteína necesaria para generar una aglutinación $\mu\text{g/mL}$. Concentración de proteína 0.111 ± 0.031 mg/mL.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó un análisis de varianza ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey el cual está indicando que existe una diferencia significativa entre el grupo A₂ y cada uno de los demás grupos sanguíneos tal como se puede observar en el gráfico

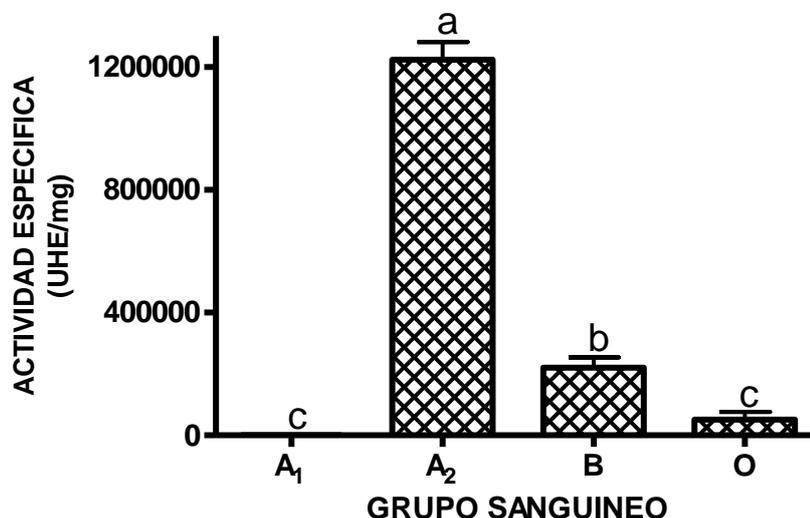


Figura 10. Actividad Hemaglutinante del intervalo 80-100% pp de sulfato de amonio Los resultados representan la media y EE (n=5) de ensayos independientes por duplicado. Las letras diferentes indican las diferencias significativas $p < 0.001$ (Tukey) entre los grupos sanguíneos, A₂, B y O, obteniéndose una mayor actividad hemaglutinante con el grupo A₂.

Concentración de 80-100% sobrenadante (sb)

En este último intervalo de concentración se considera el sobrenadante ya que también tiene la presencia de lectinas. Como se observa en la tabla 14 se puede ver una mayor actividad con el grupo sanguíneo A₂ (GalNac-Gal-Fuc) que es significativamente diferente al resto de los grupos sanguíneos.

Tabla 14. Actividad de la concentración 80-100% sb de sulfato de amonio

GRUPO SANGUINEO	UHE	AE	C
A1	15360 ± 3620	218347 ± 51464	0.2 ± 0.04
A2	122880 ± 15481	1746776 ± 220073	0.02 ± 0
B	7680 ± 1810	109173 ± 25732	0.4 ± 0.1
O	6400 ± 2715	90977 ± 38598	0.7 ± 0.3

Los resultados representan la media y EE (n=5) de ensayos independientes por duplicado. Se observa actividad hemaglutinante con los cuatro grupos sanguíneos aunque en una proporción mucho mayor para A₂. $p < 0.001$ (Tukey). UHE.- Unidad de hemaglutinación, AE.- Actividad específica (UHE/Concentración de proteína mg/mL) y C Mínima concentración de proteína necesaria para generar una aglutinación $\mu\text{g/mL}$. Concentración de proteína 0.102 ± 0.041 mg/mL.

A diferencia del precipitado, en el sobrenadante no se observan diferencias significativas entre los grupos sanguíneos A₁, B y O observar Figura 11.

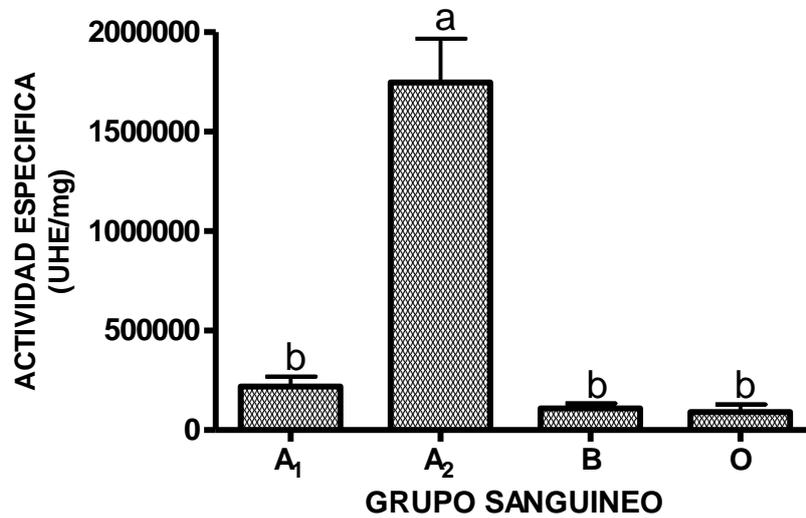


Figura 11 Actividad de la concentración 80-100% sobrenadante con sulfato de amonio. Los resultados representan la media y EE (n=5) de ensayos independientes por duplicado. Las letras diferentes indican las diferencias significativas $p < 0.001$ (Tukey) entre los grupos sanguíneos. Se obtuvo una mayor actividad hemaglutinante con el grupo A₂.

Cromatografía hidrofóbica

Para continuar con la purificación de la lectina mayoritaria de la flor de manita se utilizó la fracción 60-80% debido a que esta fracción presenta mayor actividad hemaglutinante, a esta fracción se le realizó una cromatografía hidrofóbica utilizando Octyl-Sepharosa el amortiguador utilizado fue PBS 0.1M a pH de 7.4 con 0.3M de sulfato de amonio.

A las fracciones obtenidas se les realizó actividad hemaglutinante obteniéndose en las fracciones, las fracciones obtenidas del 18 al 20 presentaron gran actividad con el grupo A₂, confirmándose de esta manera la separación y obtención de lectinas

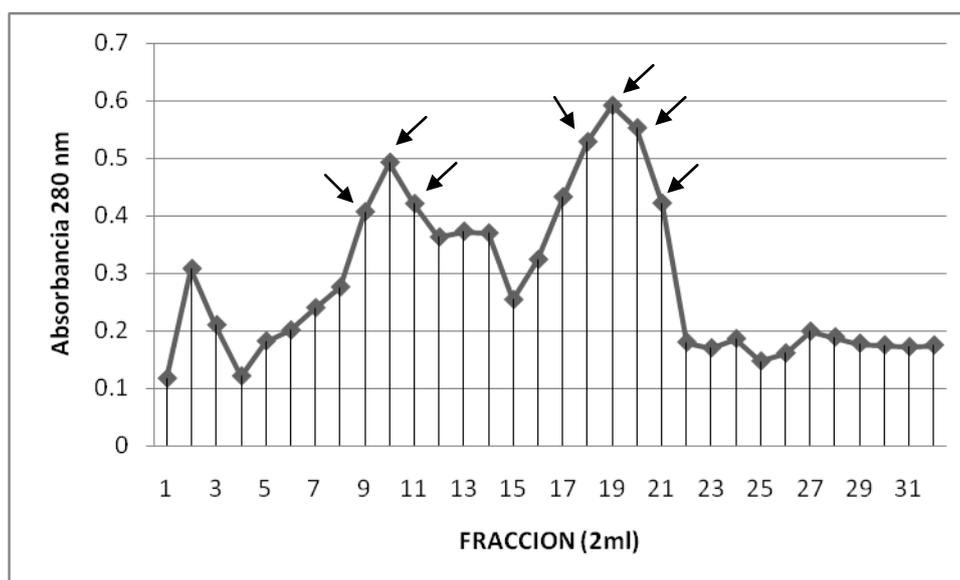


Figura 12. Cromatografía hidrofóbica. Cada fracción contiene 2 ml de muestra, la fracción 18 al 20 presentan actividad hemaglutinante con A₂

Cromatografía de exclusión molecular

Una vez realizada la cromatografía de intercambio iónico, a las muestras obtenidas con actividad hemaglutinante se sometieron a una cromatografía de exclusión molecular. En los resultados expresados en la figura 13 se presenta un gráfico representativo de las cromatografías que se realizaron para obtener la separación de la lectina a purificar. El primer pico obtenido de la cromatografía es el que presentó la actividad hemaglutinante, por lo que este punto está indicando la presencia de la lectina a purificar.

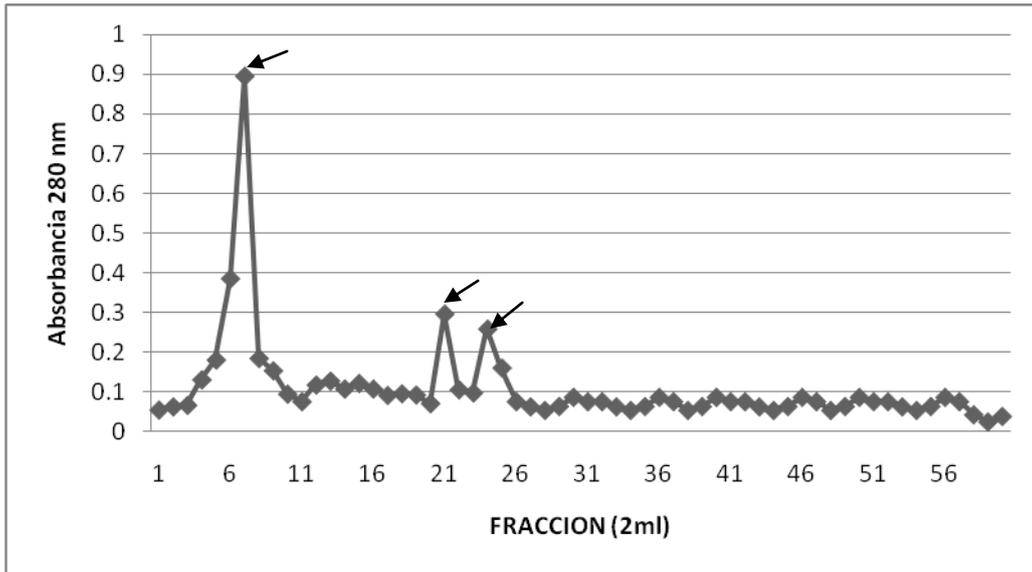


Figura 13. Cromatografía de exclusión molecular. El primer pico de la grafica es el que presenta actividad hemaglutinante. Cada fracción contiene 2ml.

Electroforesis SDS-PAGE

Para la determinación de la pureza y peso molecular aparente de la lectina a purificar, se analizo la fracción # 7 figura 13 obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular. En la figura 14 Electroforesis SDS-PAGE, se observa la presencia de la lectina en la fracción analizada.

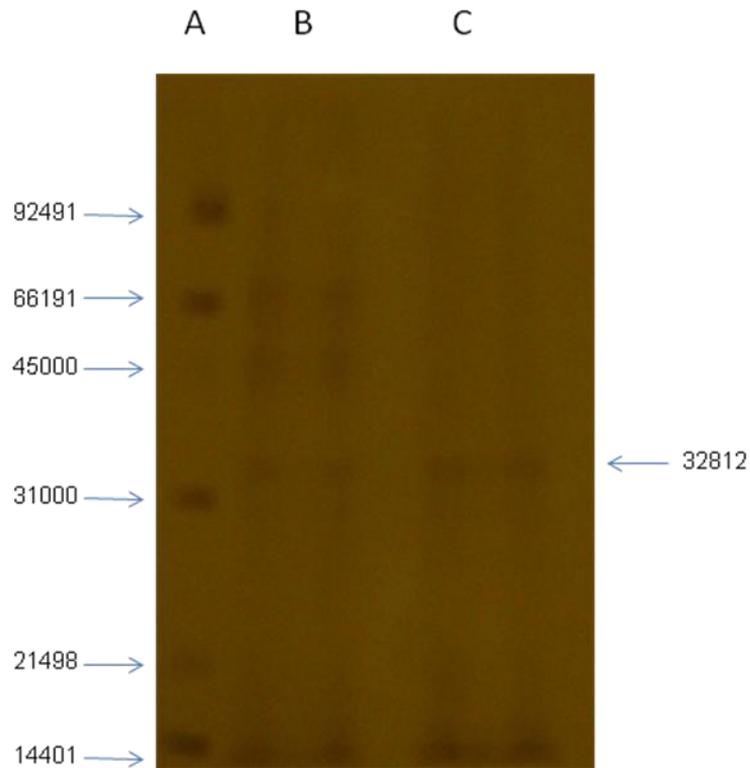


Figura 14 Electroforesis SDS-PAGE. A) Marcadores moleculares, 92491, 66191, 45000, 31000, 21498, 14401 kDa. B) fracción 60-80%, C) Fracción # 7 de la cromatografía de exclusión molecular, peso aparente de la lectina 32812 kDa.

Una vez comprobado que esta proteína se encuentra pura y que mantiene la actividad hemaglutinante se le llamo lectina de *Chiranthodendron pentadactylon* CpL. Posteriormente se continuó analizando las propiedades de esta lectina purificada.

Isoelectroenfoque

Continuando con la caracterización bioquímica de la lectina purificada, se determino su punto isoeléctrico, es decir, el pH al cual la lectina presenta una carga neutra, el resultado de este ensayo se puede observar en la figura 15, el punto isoeléctrico de la lectina es de 5.01 con respecto a los marcadores utilizados. Este método permite confirmar la presencia absoluta de una sola lectina.

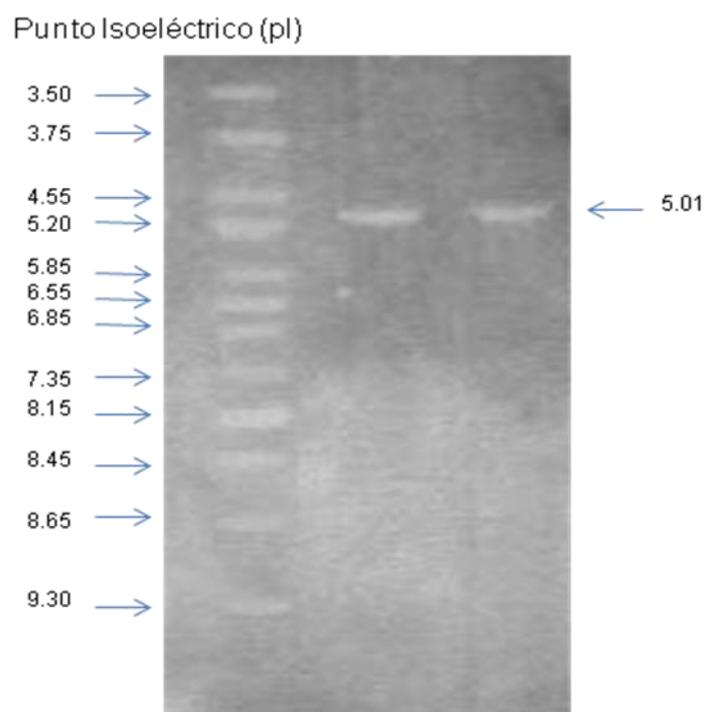


Figura 15. Punto isoeléctrico. En esta figura se pueden observar en el primer carril los marcadores con diferente punto isoeléctrico; Amiloglucosidasa (pI 3.5), Metyl red (pI 3.75), Inhibidor tripsina (pI 4.55), β -lactoglobulina A (pI 5.20), Anhidrasa carbónica B (bobina) (pI 5.85), Anhidrasa carbónica B (humana) (pI 6.55), Mioglobina acida (pI 6.85), Mioglobina, básica (pI 7.35), Lectil lectin acid (pI 8.15), Lectil lectin middle (pI 8.45), Lectil lectin basic (pI 8.65), Tripsinogeno (pI 9.30). El punto isoeléctrico de la lectina purificada es de 5.01.

Dicroísmo Circular (DC)

Con el objetivo de determinar la estructura secundaria de la lectina CpL, se realizó un análisis de dicroísmo circular a la lectina purificada (CpL), los resultados se pueden observar en la figura 16. Como se puede observar se obtuvo un claro patrón de elipticidad entre 210 y 218 nm, lo que es un claro patrón de hélices alfa. Para la obtención de este patrón se realizaron tres mediciones con diferentes buffer con el objetivo de descartar la interferencia de las sales del buffer.

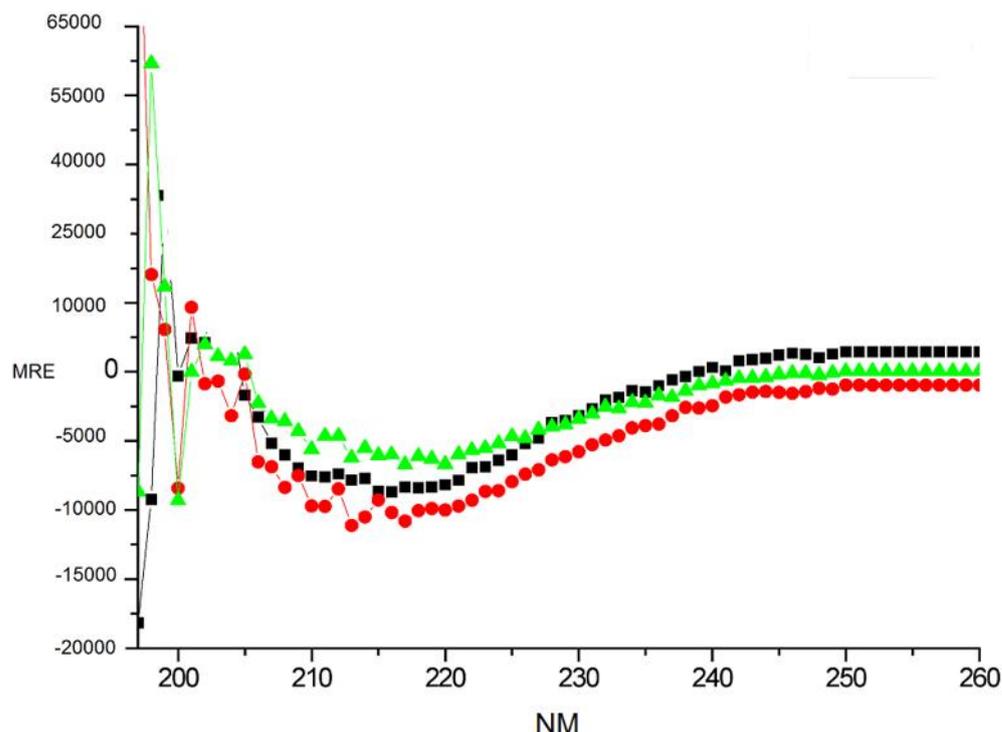


Figura 16. Dicroísmo Circular de CpL. Se muestra el patrón obtenido de la lectina ChL. Se utilizaron tres amortiguadores fosfatos 0.05 M (rojo), PBS 0.1M pH 7.4 (verde) y H₂O mili Q (negro). Se puede observar un patrón claro de elipticidad de alfa hélices

Determinación de la Glicosilación de la lectina

La determinación de la presencia o ausencia de glicosilación de la lectina CpL se realizó mediante el método de Dubois el cual se basa en hacer interaccionar el ácido sulfúrico-fenol con los carbohidratos, en la tabla 15 se puede observar que la lectina purificada tiene un 19% de glicosilación, este resultado se obtuvo en comparación con las lectinas presentes en el extracto crudo.

Tabla 15. Glicosilación de lectina CpL.

	µg/ml	%
MANITA EXC	77.72	100%

FP ALCOHOLICA	64.57	83%
FP DIALIZADO	22.27	29%
LECTINA CpL	14.91	19%

Afinidad para carbohidratos

Extracto crudo

Para la determinación de la especificidad de las lectinas presentes en el extracto crudo de la flor de manita se realizó utilizando el grupo sanguíneo A₂, debido a que al realizar el ensayo de hemaglutinación con este extracto se observa una actividad hemaglutinante numéricamente mayor en comparación que con los demás grupos sanguíneos. El ensayo se realizó con los carbohidratos presentes en la siguiente tabla 16, la especificidad de las lectinas presentes en el extracto hacia los carbohidratos de mayor a menor fue la siguiente: Man > GalNAc, GlcNAc > Fuc > Xyl > Fruc, Glc > NANA > Gal, Lac > Sac > Rib, GalAcet.

Fracción 0-20% sulfato de amonio precipitado

En la concentración 0-20% se realizó el ensayo utilizando el grupo sanguíneo A₁ debido a que las lectinas presentes en esta fracción presentan una afinidad numéricamente mayor con este grupo en comparación con los demás grupos sanguíneos. En los resultados de la tabla 17 se puede observar que las lectinas presentes en esta fracción tienen mayor afinidad hacia Gal, GalAcet, GalNAc lo que concuerda con los carbohidratos presentes en la superficie de los eritrocitos de este grupo sanguíneo. En los resultados se puede observar la especificidad de las lectinas hacia los carbohidratos de mayor a menor: Gal, GalAcet > GalNAc > Fuc > GlcNAc, Man > NANA > Glc > Lac > Fruc, Sac > Xyl > Rib.

Fracción 20-40% sulfato de amonio precipitado

Para la determinación de la afinidad para carbohidratos de la fracción 20-40% se utilizó el grupo sanguíneo A₁ de acuerdo con los datos reportados en la tabla 10, en esta fracción hay una mayor especificidad numéricamente hacia este tipo sanguíneo. En los datos reportados en la tabla 18 se puede observar que la especificidad de las lectinas de esta fracción hacia los carbohidratos de mayor a menor fue la siguiente Gal > GlcNAc > Fru > Rib > GalAcet, NANA > Fuc, Man, Lac > Glc, GalNAc > Sac > Xyl.

Fracción 40-60 % sulfato de amonio precipitado

En la fracción 40-60% sulfato de amonio se realizó el ensayo con el grupo sanguíneo B debido a que esta fracción presenta mayor afinidad hacia a

este grupo sanguíneo. Por lo que los resultados se pueden observar en la tabla 19, que representa la especificidad de mayor a menor: Rib > NANA > Sac > Fuc, Lac > Glc > Gal, Xyl > GlcNAc > GalNAc, Fru > GalAct > Man.

Fracción 60-80 % sulfato de amonio precipitado

Para realizar la determinación de la especificidad de las lectinas presentes en esta fracción se utilizó el grupo sanguíneo A₂ debido a que esta fracción presenta numéricamente mayor actividad específica hacia este grupo sanguíneo. En los resultados que se muestran en la tabla 20 se puede observar que existe una mayor especificidad hacia Manosa y Galactosa, lo que concuerda con los carbohidratos presentes en este grupo sanguíneo. De la misma manera podemos observar en esta tabla que la especificidad a carbohidratos se presenta de mayor a menor de la siguiente manera: Man > Gal > GlcNAc > GalNAc > GalAcet > NANA > Glc, Sac > Fruc > Lac > Rib > Xyl > Fuc.

Fracción 80-100 % sulfato de amonio precipitado

Al determinar la especificidad de las lectinas de la fracción 80-100 pp se utilizó el grupo sanguíneo A₂ debido a que la afinidad de las lectinas de esta fracción es numéricamente mayor hacia este grupo sanguíneo tabla 21. En el análisis de estos datos se puede observar que la especificidad de las lectinas presentes en esta fracción de mayor a menor es la siguiente Fuc, Glc, Man > Lac > Fru, GlcNAc > Xyl > NANA > GalNAc, Gal > GalAcet > Sac > Rib.

Lectina CpL

Para realizar la especificidad para carbohidratos de la lectina de la fracción 60-80 pp sulfato de amonio se utilizó el grupo sanguíneo A₂ debido a que en esta fracción la lectina purificada tiene mayor afinidad hacia este grupo sanguíneo. En los resultados de la tabla 22 se puede observar que la lectina presenta mayor afinidad hacia Man > Gal > GalNAc, dos de los carbohidratos que se encuentran presentes en el grupo sanguíneo A₂. Los resultados de este ensayo muestran que la especificidad de la lectina para los carbohidratos de mayor a menor es la siguiente: Man > Gal > GalNAc > GalAcet > NANA > Lac > Glc, GlcNAc > Fruc > Fuc > Rib > Sac > Xyl.

En la tabla 23 se puede observar la variación de afinidad a carbohidratos de las lectinas presentes en las fracciones con sulfato de amonio, esta variación de la afinidad a carbohidratos se debe a la separación y distribución de las lectinas en base a su peso molecular, en la tabla se puede observar una gran similitud de los resultados obtenidos para la lectina CpL y la fracción 60-80% que es de donde se purificó la lectina, de la misma manera los resultados de esta fracción son semejantes con los del extracto crudo

Tabla 16. Afinidad para carbohidratos extracto crudo

CARBOHIDRATO	extracto crudo
(μmol)	GRUPO A ₂
Man	4.76837E-05
GalNAc	0.001525879
GlcNAc	0.001525879
GalAcet	0.048828125
Fuc	0.09765625
Xyl	0.78125
Fruc	0.78125
Glc	1.5625
NANA	6.25
Gal	6.25
Lac	25
Sac	50
Rib	50

Se presentan los resultados como la mínima concentración de carbohidratos en μmol que se requiere para inhibir completamente la actividad hemaglutinante. La afinidad para carbohidratos fue la siguiente: Man > GalNAc, GlcNAc > GalAcet > Fuc > Xyl > Fruc, Glc > NANA > Gal, Lac > Sac > Rib.

Tabla 17. Afinidad para carbohidratos fracción 0-20%

CARBOHIDRATO	FRACCION 0-20 %
(μmol)	GRUPO A ₁
Gal	2.38419E-05
GalAcet	2.38419E-05
GalNAc	0.006103516
Fuc	0.048828125
GlcNAc	0.09765625
Man	0.09765625
NANA	0.390625
Glc	0.78125
Lac	3.125
Fru	6.25
Sac	6.25
Xyl	12.5
Rib	100

En la tabla se pueden observar los resultados como la mínima concentración de carbohidratos en μmol que se requiere para inhibir completamente la actividad hemaglutinante, utilizando el grupo sanguíneo A₁. La afinidad para carbohidratos fue la siguiente: Gal, GalAcet > GalNAc > Fuc > GlcNAc, Man > NANA > Glc > Lac > Fruc, Sac > Xyl > Rib.

Tabla 18. Afinidad para carbohidratos fracción 20-40%

CARBOHIDRATO	FRACCION 20-40 %
(μmol)	GRUPO A ₁
Gal	0.1953125
GlcNAc	0.78125
Fru	3.125
Rib	6.25
GalAcet	12.5
NANA	12.5
Fuc	25
Man	25
Lac	25
Glc	50
GalNAc	50
Sac	100
Xyl	200

En los resultados se representa la mínima concentración de carbohidratos en μmol que se requiere para inhibir completamente la actividad hemaglutinante utilizando el grupo sanguíneo A₁. La afinidad para carbohidratos fue la siguiente: Gal > GlcNAc > Fru > Rib > GalAcet, NANA > Fuc, Man, Lac > Glc, GalNAc > Sac > Xyl.

Tabla 19. Afinidad para carbohidratos fracción 40-60%

CARBOHIDRATO	FRACCION 40-60 %
(μmol)	GRUPO B
Rib	0.1953
NANA	0.7812
Sac	3.125
Fuc	6.25
Lac	12.5
Glc	12.5
Gal	25
Xyl	25
GlcNAc	25
GalNAc	50
Fru	50
GalAcet	100
Man	200

En los resultados se representa la mínima concentración de carbohidratos en μmol que se requiere para inhibir completamente la actividad hemaglutinante utilizando el grupo sanguíneo B. La afinidad para carbohidratos fue la siguiente: Rib > NANA > Sac > Fuc, Lac > Glc > Gal, Xyl > GlcNAc > GalNAc, Fru > GalAct > Man.

Tabla 20. Afinidad para carbohidratos fracción 60-80%

CARBOHIDRATO	FRACCION 60-80 %
(μmol)	GRUPO A ₂
Man	0.0488
Gal	0.0976
GlcNAc	0.1953
GalNAc	0.3906
GalAcet	0.3906
NANA	0.7812
Glc	1.5625
Sac	1.5625
Fruc	3.125
Lac	6.25
Rib	12.5
Xyl	50
Fuc	100

Los resultados se representan como la mínima concentración de carbohidratos en μmol que se requiere para inhibir completamente la actividad hemaglutinante utilizando el grupo sanguíneo A₂. La afinidad para carbohidratos fue la siguiente: Man > Gal > GlcNAc > GalNAc > GalAcet > NANA > Glc, Sac > Fruc > Lac > Rib > Xyl > Fuc.

Tabla 21. Afinidad para carbohidratos fracción 80-100%

CARBOHIDRATO	MANITA 80-100%
(μmol)	GRUPO A ₂
Fuc	2.38419E-05
Glc	2.38419E-05
Man	2.38419E-05
Lac	0.0003
Fru	0.1953
GlcNAc	0.1953
Xyl	0.7812
NANA	1.5625
GalNAc	6.25
Gal	6.25
GalAcet	25
Sac	50
Rib	200

En los resultados se representa la mínima concentración de carbohidratos en μmol que se requiere para inhibir completamente la actividad hemaglutinante utilizando el grupo sanguíneo A₂. La afinidad para carbohidratos fue la siguiente: Fuc, Glc, Man > Lac > Fru, GlcNAc > Xyl > NANA > GalNAc, Gal > GalAcet > Sac > Rib.

Tabla 22. Afinidad para
carbohidratos de la lectina CpL.

CARBOHIDRATO	Lectina 60-80 pp
(μmol)	GRUPO A2
Man	9.53674E-05
Gal	0.0001
GalNAc	0.0003
GalAcet	0.0061
NANA	0.0122
Lac	0.0244
Glc	0.0488
GlcNAc	0.0488
Fruc	0.0976
Fuc	25
Rib	200
Sac	200
Xyl	200

En los resultados se representa la mínima concentración de carbohidratos en μmol que se requiere para inhibir completamente la actividad hemaglutinante utilizando el grupo sanguíneo A₂ el cual presenta mayor actividad específica esta lectina. La afinidad para carbohidratos fue la siguiente: Man > Gal > GalNAc > GalAcet > NANA > Lac > Glc, GlcNAc > Fruc > Fuc > Rib > Sac > Xyl.

Tabla 23. Comparación de afinidad a carbohidratos

CARBOHIDRATO	EXTRACTO CRUDO	FRACCION 0-20%	FRACCION 20-40%	FRACCION 40-60%	FRACCION 60-80%	FRACCION 80-100% pp	LECTINA CpL
(μ mol)	A ₂	A ₁	A ₁	B	A ₂	A ₂	A ₂
Man	4.7683E-05	0.0976	25	200	0.0488	2.3841E-05	9.53674E-05
GalNAc	0.0015	0.0061	50	50	0.3906	6.25	0.0003
GluNAc	0.0015	0.0976	0.7812	25	0.1953	0.1953	0.0488
GalAcet	0.0488	2.3841E-05	12.5	100	0.3906	25	0.0061
Fuc	0.0488	0.0488	25	6.25	100	2.3841E-05	25
Xyl	0.0976	12.5	200	25	50	0.7812	200
Fru	0.7812	6.25	3.125	50	3.125	0.1953	0.0976
Glc	0.7812	0.7812	50	12.5	1.5625	2.3841E-05	0.0488
NANA	1.5625	0.3906	12.5	0.7812	0.7812	1.5625	0.0122
Gal	6.25	2.3841E-05	0.1953	25	0.0976	6.25	0.0001
Lac	6.25	3.125	25	12.5	6.25	0.0003	0.0244
Sac	25	6.25	100	3.125	1.5625	50	200
Rib	50	100	6.25	0.1953	12.5	200	200

En esta tabla se muestra la comparación de la especificidad a carbohidratos de las lectinas de cada fracción con respecto al extracto crudo. Cada fracción presenta diferente afinidad, debido a los pasos de purificación. La especificidad de las lectinas presentes en el extracto crudo hacia los carbohidratos de mayor a menor fue la siguiente: Man > GalNAc, GlcNAc > GalAcet, Fuc > Xyl > Fruc, Glc > NANA > Gal, Lac > Sac > Rib.

Dependencia de cationes

Para la determinación de la dependencia de cationes de cada una de las fracciones se utilizaron los siguientes complejos iónicos: Cloruro de calcio (CaCl_2), cloruro de magnesio (MgCl_2), fosfato de potasio (KH_2PO_4) y fosfato de sodio (NaHPO_4). Cada una de las muestras fueron tratadas con un agente quelante EDTA, posteriormente se realizó el ensayo de hemaglutinación comparando los resultados con muestras sin tratamiento de EDTA. En la tabla 24 se pueden observar los resultados de cada una de las fracciones con tratamiento y sin tratamiento.

En los resultados para el extracto crudo y la fracción 0-20 % se puede apreciar que no existe diferencia tanto para la muestra tratada con EDTA como para la muestra sin tratamiento por lo que estas lectinas no son dependientes de cationes.

Al tratar las lectinas de la Fracción 20-40% se observó un resultado totalmente diferente a los demás debido a que la muestra tratada con EDTA pierde por completo su actividad hemaglutinante en comparación con la no tratada con EDTA, esto indica que las lectinas pierden totalmente su estructura tridimensional al retirar los cationes con EDTA y que estas no regresan a su estado tridimensional normal al volver adicionar los diferentes cationes.

Para la fracción 40-60% se observa un resultado similar al del extracto crudo y al de la fracción 0-20% en el que de la misma manera no hay dependencia de cationes.

En la fracción 60-80% como se puede ver en la tabla 24 la diferencia de actividad en la muestra tratada con EDTA en comparación con la no tratada nos está indicando que las lectinas presentes en esta fracción son dependientes de los iones Ca^{++} , K^+ y Na^+ , para cumplir con su actividad, es decir, que son dependientes de iones metálicos.

De la misma manera para la fracción 80-100% se observa que al tratar las lectinas de esta fracción con EDTA la actividad hemaglutinante disminuye en comparación con la que no fue tratada con EDTA por lo que se puede decir que las lectinas presentes en esta fracción son dependientes de iones metálicos.

Al analizar los resultados de la lectina pura se puede observar la disminución en actividad hemaglutinante en la fracción tratada con EDTA con respecto a la no tratada lo que está indicando que la lectina depende de los iones Ca^{++} , K^+ y Na^+ , para mantener su actividad.

Tabla 24. Dependencia de cationes.

CATIONES	EXTRACTO CRUDO		0-20%		20-40%		40-60%		60-80%		80-100%		LECTINA	
	A ₂ +EDTA	A ₂	A ₁ +EDTA	A ₁	A ₁ +EDTA	A ₁	B+EDTA	B	A ₁ +EDTA	A ₁	A ₂ +EDTA	A ₂	A ₂ +EDTA	A ₂
CaCl ₂	335911.1	335911.1	460635	460635	0	724995	1330633	1330633	179150	1433204	134026	1072212	189205	1513646
MgCl ₂	335911.1	335911.1	460635	460635	0	724995	1330633	1330633	1433204	1433204	1072212	1072212	1513646	1513646
KH ₂ PO ₄	335911.1	335911.1	460635	460635	0	724995	1330633	1330633	358301	1433204	268053	1072212	189205	1513646
NaHPO ₄	335911.1	335911.1	460635	460635	0	724995	1330633	1330633	22393	1433204	16753	1072212	189205	1513646

En esta tabla se muestran los resultados para dependencia de cationes de las lectinas de cada una de las diferentes fracciones. Las muestras se comparan con tratamiento de EDTA y sin tratamiento. Los resultados se muestran en actividad específica utilizando para cada fracción el tipo sanguíneo al cual presentan mayor actividad hemaglutinante.

Temperatura

Extracto crudo

En la determinación de la termoestabilidad de las lectinas contenidas en cada una de las fracciones de la flor de manita se utilizaron diferentes temperaturas de incubación así como el grupo sanguíneo al cual son afines las lectinas de dichas fracciones. En la tabla 25 se pueden observar los resultados obtenidos para extracto crudo utilizándose el grupo sanguíneo A₂.

En la figura 17 se puede observar que la actividad hemaglutinante de las lectinas se mantiene en el intervalo de 17°-80°C, disminuyendo un poco a temperaturas muy elevadas 80-100 °C, por lo que se puede decir que las lectinas del extracto crudo presentan un intervalo amplio de termoestabilidad.

Fracción 0-20% sulfato de amonio precipitado

Para la evaluar las lectinas de la fracción 0-20% sulfato de amonio se utilizo el grupo sanguíneo A₁, los resultados se observan en la tabla 26.

En la figura 18 se observa la actividad hemaglutinante de la fracción 0-20%, como se puede observar las lectinas son termoestables: la actividad se mantiene en los intervalos de temperatura utilizados, disminuyendo sólo a altas temperaturas (80-100°C).

Fracción 20-40% sulfato de amonio precipitado

En la tabla 27 se observan los resultados de termoestabilidad para la fracción 20-40% utilizando el grupo sanguíneo A₁. En la figura 19 se puede observar que las lectinas presentes en esta fracción no son termoestables: la actividad hemaglutinante no se mantiene al aumentar o disminuir la temperatura con referencia a 40°C.

Fracción 40-60% sulfato de amonio precipitado

Los resultados de la fracción 40-60% se presentan en la tabla 28 en la que se observa un resultado similar al de la fracción 20-40%. Para realizar este ensayo se utilizo el grupo sanguíneo B debido a que las lectinas de esta fracción presentan mayor actividad hemaglutinante con este grupo.

Como se puede observar en la figura 20 las lectinas de esta fracción no son termoestables: al aumentar la temperatura a más de 80°C y al disminuir la temperatura a menos de 17°C la actividad hemaglutinante de las lectinas se inhibe.

Fracción 60-80% sulfato de amonio precipitado

En la tabla 29 se observan los resultados de termoestabilidad de la fracción 60-80% en los que se puede ver que existe actividad hemaglutinante

en los diferentes intervalos de temperatura. En la figura 21 se puede observar que la actividad hemaglutinante se conserva en el intervalo de 17-80°C, lo que está indicando que las lectinas de esta fracción son termoestables en este intervalo de temperatura, de la misma manera se puede observar que estas lectinas presentan menor actividad hemaglutinante a bajas y altas temperaturas 4° y 100°C.

Fracción 80-100% sulfato de amonio precipitado

Los resultados de termoestabilidad de las lectinas de la fracción 80-100% se pueden observar en la tabla 30, para realizar este ensayo se utilizó el grupo sanguíneo A₂. En la figura 22 se pueden observar que las lectinas de la fracción 80-100% no son termoestables debido a que como puede observarse al aumentar a más de 80°C la temperatura las lectinas de esta fracción pierden la actividad hemaglutinante conservándose la actividad de las lectinas en el intervalo de 36-60°C.

Lectina CpL

Para la determinación de la termoestabilidad de la lectina purificada se utilizó el grupo sanguíneo A₂, los resultados se muestran en la tabla 31 en actividad específica. En la figura 23 se pueden observar los resultados de termoestabilidad de la lectina purificada, como se puede apreciar esta lectina tiene una gran actividad a 36 °C pero conforme se va aumentando la temperatura la actividad de la lectina se va perdiendo por lo que es estable solamente de 17° a 60°C, al aumentar la temperatura a más de 80°C se puede ver que la lectina pierde gradualmente la actividad hemaglutinante

Tabla 25. Termoestabilidad del Extracto crudo

Temperatura °C	A ₂
4	8988.89
17	13121.52
36	22988.89
40	20994.45
60	15745.83
80	13121.15
100	6656.07

En la tabla 25 se muestran los resultados en actividad específica a diferente temperatura, utilizando el grupo sanguíneo A₂. Observándose mayor actividad de 17 a 80 °C.

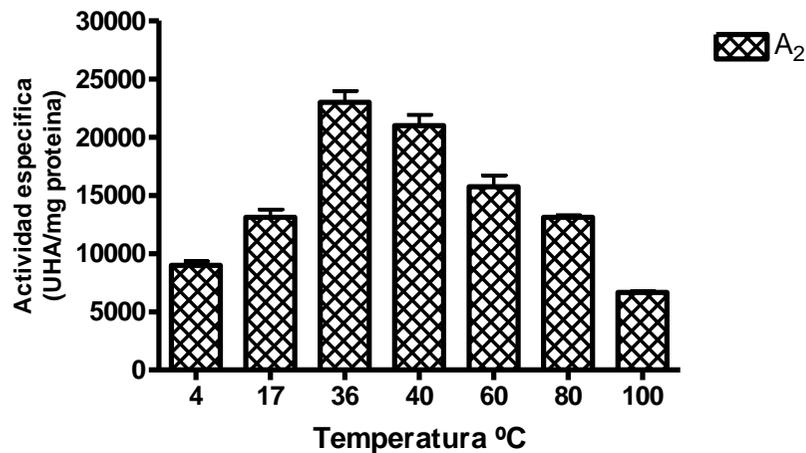


Figura 17. Termoestabilidad de lectinas del extracto crudo. En la figura se observan los resultados del extracto crudo en actividad específica bajo diferentes temperaturas (4°, 17°, 36°, 40°, 60°, 80°, 100°) utilizando el grupo sanguíneo A₂, observándose mayor actividad en el intervalo de 17 a 80 °C centígrados.

Tabla 26. Termoestabilidad de la Fracción 0-20%.

Temperatura °C	A ₁
4	2699
17	2699
36	3599
40	8997
60	3599
80	899
100	449

En la tabla se muestran los resultados en actividad específica a diferente temperatura, utilizando el grupo sanguíneo A₂, observándose mayor actividad en el intervalo de 40°C.

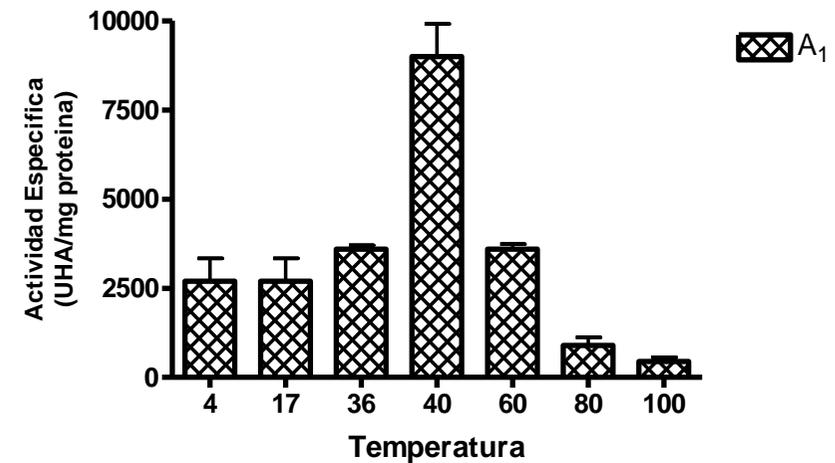


Figura 18. Termoestabilidad de lectinas de la fracción 0-20%. Los resultados se muestran en actividad específica bajo diferentes temperaturas (4°, 17°, 36°, 40°, 60°, 80°, 100°) utilizándose el grupo sanguíneo A₁, la actividad disminuye de de 80°-100°C.

Tabla 27. Termoestabilidad de la Fracción 20-40%

Temperatura °C	A ₁
4	0
17	0
36	2124
40	113281
60	4248
80	0
100	0

Los resultados se muestran en actividad específica a diferente temperatura, utilizando el grupo sanguíneo A₁.

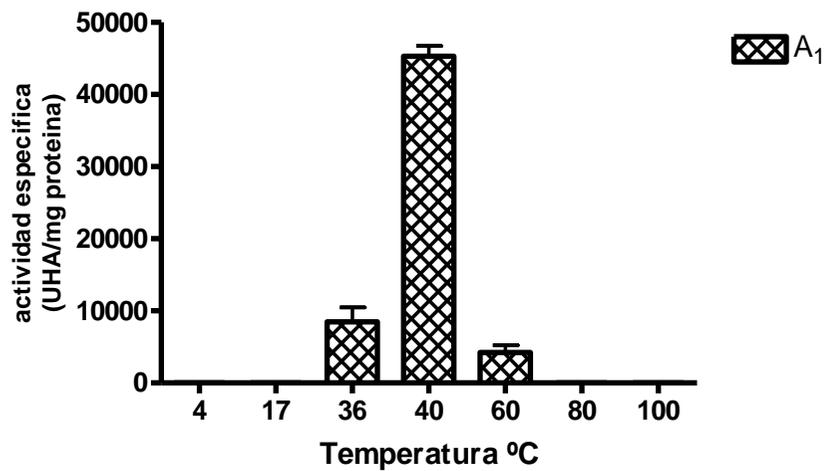


Figura 19. Termoestabilidad de lectinas de la fracción 20-40%. Los resultados de la fracción 20-40 % se muestran en actividad específica bajo diferentes temperaturas (4°, 17°, 36°, 40°, 60°, 80°, 100°C) utilizando el grupo sanguíneo A₁, la actividad disminuye de de 80°-100°C así como de 17° a 4°C

Tabla 28. Termoestabilidad de la Fracción 40-60%

Temperatura °C	B
4	0
17	0
36	7797
40	31187
60	3898
80	0
100	0

En esta tabla se presentan los resultados de termoestabilidad en actividad específica a diferente temperatura, utilizando el grupo sanguíneo B.

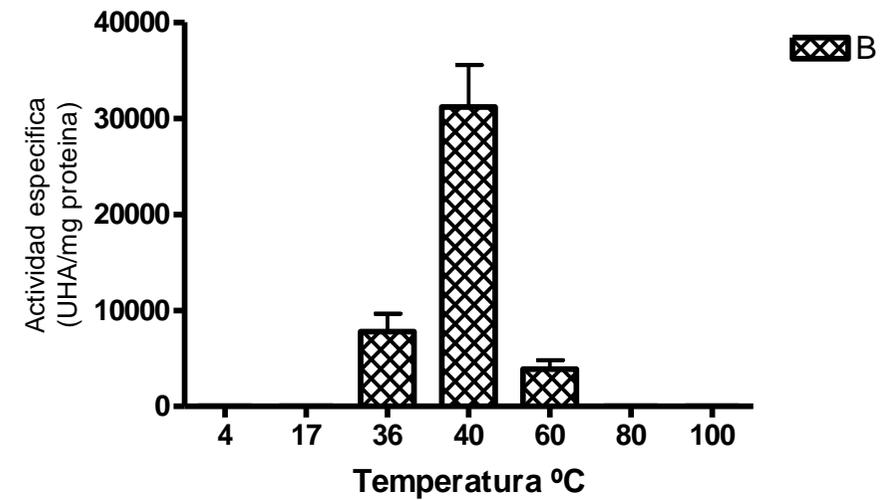


Figura 20. Termoestabilidad de lectinas de la fracción 40-60%. Los resultados de la fracción 40-60% se muestran en actividad específica a diferentes temperaturas (4°, 17°, 36°, 40°, 60°, 80°, 100°C) la actividad disminuye de de 80°-100°C así como de 17° a 4°C, para este ensayo se utilizo el grupo sanguíneo B.

Tabla 29. Termoestabilidad de la Fracción 60-80%.

Temperatura °C	A ₂
4	4787.64
17	8397.683
36	15598.46
40	16795.37
60	8397.683
80	4198.841
100	749.517

En la tabla 29 se encuentran los resultados de termoestabilidad en actividad específica a diferentes temperaturas, utilizando el grupo sanguíneo A₂.

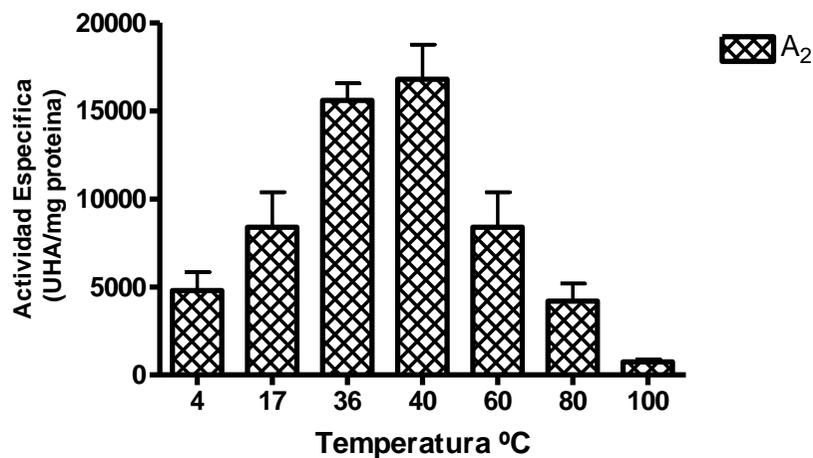


Figura 21. Termoestabilidad de lectinas de la fracción 60-80%. Los resultados se expresan en actividad específica a diferentes temperaturas (4°, 17°, 36°, 40°, 60°, 80°, 100°C), para este ensayo se utilizó el grupo sanguíneo A₂. La actividad se mantiene en los intervalos de 17 a 80°C.

Tabla 30. Termoestabilidad de la Fracción 80-100%.

Temperatura °C	A ₂
4	2094
17	2094
36	10471
40	25129
60	10471
80	0
100	0

Los resultados de termoestabilidad se representan en actividad específica a diferentes temperaturas, utilizando el grupo sanguíneo A₂.

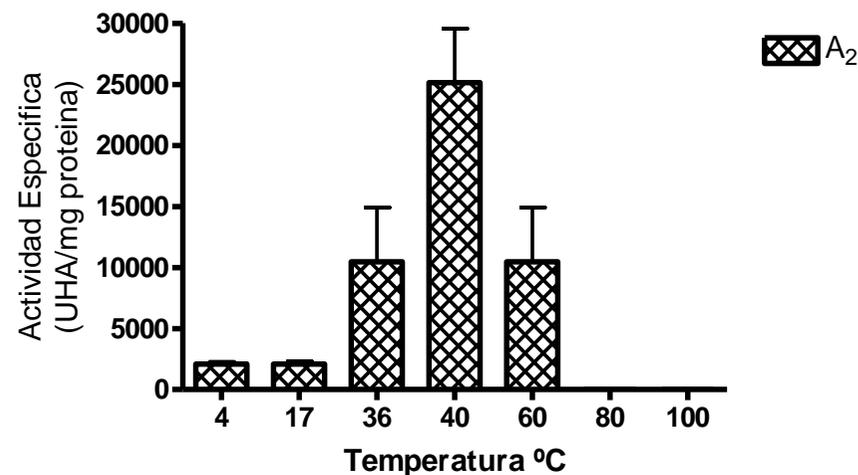


Figura 22. Termoestabilidad de lectinas de la fracción 80-100%. En esta figura se muestran los resultados en actividad específica a diferentes temperaturas (4°, 17°, 36°, 40°, 60°, 80°, 100°C), para este ensayo se utilizó el grupo sanguíneo A₂. La mayor actividad se mantiene en el intervalo de 36 a 60°C.

Tabla 31. Termoestabilidad de la Lectina CpL

Temperatura °C	A ₂
4	35476
17	283809
36	189206
40	141904
60	94603
80	59127
100	0

En la tabla 31 se presentan los resultados de termoestabilidad en actividad específica a diferentes temperaturas, utilizando el grupo sanguíneo A₂.

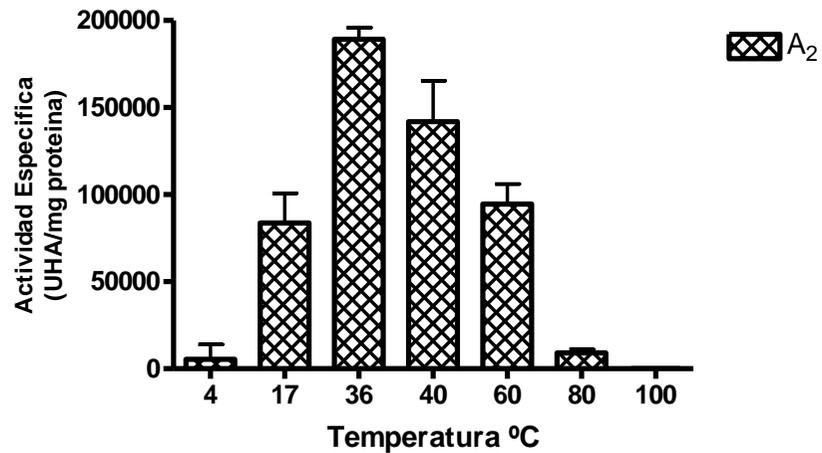


Figura 23. Termoestabilidad de la lectina purificada. En esta figura se muestran los resultados en actividad específica a diferentes temperaturas (4°, 17°, 36°, 40°, 60°, 80°, 100°C), para este ensayo se utilizó el grupo sanguíneo A₂. La actividad hemaglutinante se mantiene en los intervalos de temperatura de 17° a 60°C, teniendo mayor actividad hemaglutinante a 36°C.

Dependencia de pH

Extracto crudo

Para la evaluación del pH en el cual presentan mayor estabilidad y actividad las lectinas de la flor de manita, se realizó el ensayo de hemaglutinación con el extracto crudo utilizando solución buffer con un intervalo de pH de 5.0 a 8.6 así como los cuatro grupos sanguíneos humanos A₁, A₂, B y O. En la tabla 32 se muestran los resultados en los cuales se puede observar que la actividad específica de las lectinas presentes en el extracto crudo conservan su actividad hemaglutinante con los cuatro tipos sanguíneos debido a que en este intervalo no se inhibe por completo la aglutinación, por lo que como se puede observar las lectinas del extracto crudo presentan actividad tanto en medios ácidos como alcalinos, de la misma manera se puede decir que las lectinas bajo este intervalo de pH conservan en gran parte su estructura tridimensional.

Tabla 32. Dependencia del pH del extracto crudo

pH	A ₁	A ₂	B	O
5	335911	335911	335911	1312
5.2	1312	10497	20994	656
5.4	83977	10497	5248	1312
5.6	656	5248	10497	335911
5.8	10497	41988	5248	83977
6	10497	1312	5248	656
6.2	83977	167955	20994	656
6.4	5248	2624	10497	656
6.6	41988	335911	20994	41988
6.8	41988	10497	83977	656
7	41988	41988	20994	328
7.2	10497	83977	10497	656
7.4	5248	10497	20994	20994
7.6	5248	41988	20994	5248
7.8	1312	41988	41988	20994
8	41988	10497	335911	656
8.2	328	10497	20994	164
8.4	164	10497	10497	328
8.6	10497	41988	10497	2624

Los resultados se representan como actividad específica (AE) a diferente intervalo de pH (5.0-8.6) utilizando los cuatro grupos sanguíneos humanos A₁, A₂, B y O. Al analizar la actividad de las lectinas del extracto crudo se puede observar en esta tabla que la actividad específica se mantiene desde el intervalo de 5.0 hasta 8.6.

Fracción con sulfato de amonio 0-20% precipitado.

Al analizar los resultados de pH de la fracción 0-20% sulfato de amonio se puede observar que los datos expresados como actividad específica de las lectinas se mantienen en un intervalo menor que van desde 5.0-6.0 después de 6.6-6.8 y por ultimo de 7.4-8.0, esto indica la presencia de varias lectinas las cuales se caracterizan por presentar mayor actividad en los intervalos de pH mencionados anteriormente y que la mayor parte de estas proteínas funcionan mejor en un medio ácido tal como se observa en la tabla 33.

Tabla 33. Dependencia del pH de la fracción 0-20 %

pH	A ₁	A ₂	B	O
5	3598	1799	1799	3598
5.2	1799	899	1799	1799
5.4	224	899	899	7197
5.6	7197	3598	899	7197
5.8	3598	3598	57579	57579
6	28789	899	1799	1799
6.2-6.4	0	0	0	0
6.6	57579	115158	460635	115158
6.8	230317	28789	57579	1799
7-7.2	0	0	0	0
7.4	7197	14394	28789	28789
7.6	7197	14394	57579	115158
7.8	14394	14394	28789	7197
8	57579	14394	460635	899

Los resultados se representan como actividad específica (AE) a diferente intervalo de pH (5.0-8.6) utilizando los cuatro grupos sanguíneos humanos A₁, A₂, B y O.

Fracción con sulfato de amonio 20-40 % precipitado.

En la fracción 20-40% tabla 34 se puede observar un resultado similar al de la fracción 0-20% debido a que las lectinas presentes en esta fracción (20-40%) presentan actividad en los intervalos de pH que van desde 6.2-6.6 y posteriormente de 7.4-7.8 esto está indicando que las lectinas presentes en esta fracción se encuentran activas en estos intervalos de pH. Para la realización de este ensayo se utilizó solución buffer con un rango de pH de 5.0 a 8.6 así como los cuatro grupos sanguíneos humanos A₁, A₂, B y O.

Tabla 34. Dependencia del pH de la fracción 20-40 %

pH	A ₁	A ₂	B	O
6.2	90624.4	45312.2	11328.0	5664.0
6.4	708.0	1416.0	708.0	354.0
6.6	362497.8	724995.5	181248.8	181248.8
6.8-7.2	0	0	0	0
7.4	90624.4	22656.1	11328.0	11328.0
7.6	22656.1	22656.1	11328.0	11328.0
7.8	45312.2	22656.1	22656.1	5664.0

Los resultados se representan como actividad específica (AE) a diferente rango de pH (5.0-8.6) utilizando los cuatro grupos sanguíneos humanos A₁, A₂, B y O.

Fracción 40-60 % con sulfato de amonio precipitado.

De forma similar que para las muestras anteriores se realizó la evaluación del pH de las lectinas de la fracción 40-60 % para la determinación del intervalo donde presentan mayor actividad específica. Como se puede apreciar en la tabla 35 la actividad hemaglutinante de las lectinas no se inhibe por completo presentando actividad en el intervalo de pH de 5.2-8.4 pero solo con los grupos sanguíneos B y O, esto concuerda con la especificidad hacia los grupos sanguíneos B y O reportados en la tabla 11 de la precipitación salina. De la misma manera se puede ver que las lectinas presentes en esta fracción también presentan actividad específica hacia los grupos sanguíneos A₁ y A₂ pero solamente en los intervalos de pH 5.4-5.8 después 6.6-6.8 así como 7.4-7.6 y de 8.0 a 8.4. Los resultados anteriores muestran la presencia de lectinas que actúan tanto en medios básicos como en ácidos.

Tabla 35. Dependencia del pH de la fracción 40-60 %

pH	A ₁	A ₂	B	O
5.2	0	0	166329	665316
5.4	1299	1299	20791	10395
5.6	1330633	1330633	5197	649
5.8	5197	5197	1330633	1330633
6	0	0	2598	2598
6.2	0	0	5197	1299
6.4	0	0	2598	1299
6.6	332658	332658	1330633	1330633
6.8	2598	649	5197	5197
7	0	0	1330633	1330633
7.2	0	0	1330633	1330633
7.4	1330633	1330633	1330633	1330633
7.6	1330633	1330633	1330633	1330633
7.8	0	0	1330633	1330633
8	649	649	1330633	1330633

8.2	649	649	665316	665316
8.4	649	649	649	649

Los resultados se representan como actividad específica (AE) a diferente intervalo de pH (5.0-8.6) utilizando los cuatro grupos sanguíneos humanos A₁, A₂, B y O.

Fracción 60-80 % con sulfato de amonio precipitado.

Para la evaluación del intervalo de pH en el cual presentan mayor actividad las lectinas de la fracción 60-80 % se utilizaron los cuatro grupos sanguíneos A₁, A₂, B y O. En la tabla 36 se puede apreciar que las lectinas de esta fracción presentan actividad en el intervalo de pH que va desde 5.6 a 7.6 para los cuatro grupos sanguíneos humanos A₁, A₂, B y O. y por último se puede ver que existe actividad en el intervalo de 7.8-8.0 para solo el grupo A₁, A₂, y muy poca actividad para B. como se puede observar las lectinas presentes en esta fracción tienen una tendencia a presentar una mayor actividad en el intervalo de pH ácido y menor actividad en el alcalino.

Tabla 35. Dependencia de pH de la fracción 60-80%

pH	A ₁	A ₂	B	O
5.6	2799	11196	2799	2799
5.8	5598	11196	1399	1399
6	5598	22393	5598	11196
6.2	22393	11196	2799	1399
6.4	44787	22393	5598	5598
6.6	179150	89575	22393	22393
6.8	89575	22393	5598	22393
7	22393	44787	11196	22393
7.2	44787	44787	5598	22393
7.4	179150	716602	89575	22393
7.6	22393	44787	5598	2799
7.8	5598	11196	699	0
8	2799	1399	0	0

Los resultados se representan como actividad específica (AE) a diferente intervalo de pH (5.0-8.6) utilizando los cuatro grupos sanguíneos humanos A₁, A₂, B y O

Fracción 80-100 % con sulfato de amonio precipitado.

En la fracción 80-100% con sulfato de amonio precipitado figura 37 se puede observar que las lectinas presentes en esta fracción tienen actividad solamente en el intervalo de pH de 6.6-7.8 con los cuatro grupos sanguíneos humanos A₁, A₂, B y O, lo que está indicando que las lectinas tienen actividad tanto en medio ácido como alcalino pero con mayor proporción en el

medio alcalino, observándose de esta manera la buena separación de las proteínas en cada una de las fracciones analizadas.

Tabla 37. Dependencia del pH de la fracción 80-100%

pH	A ₁	A ₂	B	O
6.6	8376	33506	16753	4188
6.8	8376	4188	4188	8376
7	8376	16753	4188	4188
7.2	16753	33506	4188	4188
7.4	26805	536106	134026	134026
7.6	134026	134026	16753	2094
7.8	8376	8376	4188	523

Los resultados se representan como actividad específica (AE) a diferente intervalo de pH (5.0-8.6) utilizando los cuatro grupos sanguíneos humanos A₁, A₂, B y O.

Lectina CpL

Para la evaluación del pH en la lectina pura se realizó utilizando los cuatro grupos sanguíneos humanos A₁, A₂, B y O. en la tabla 38 se puede ver que la lectina a caracterizar presenta actividad en el intervalo de 5.8-7.6 de pH con una tendencia de mayor actividad en el intervalo ácido, lo que concuerda con la actividad en el medio ácido de las lectinas de la fracción 60-80% que fue de donde se aisló esta lectina. Con esto puede decir que la lectina presenta una mayor actividad bajo un pH ácido.

Tabla 38. Dependencia del pH de Lectina CpL

pH	A ₁	A ₂	B	O
5.8	11825.3	5912.7	23650.7	5912.7
6	2956.3	1478.2	739.0	1478.2
6.2	11825.3	23650.7	1478.2	739.0
6.4	189205.8	189205.8	756823.4	1513646.8
6.6	378411.7	378411.7	47301.5	756823.4
6.8	23650.7	94602.9	23650.7	5912.7
7	23650.7	189205.9	5912.7	23650.7
7.2	94602.9	23650.7	756823.4	1513646.8
7.4	1513646.8	378411.7	189205.9	94602.9
7.6	2956.3	5912.7	1478.2	5912.7

Los resultados se representan como actividad específica (AE) a diferente rango de pH (5.0-8.6) utilizando los cuatro grupos sanguíneos humanos A₁, A₂, B y O. En los resultados de la lectina pura se puede observar que la actividad específica se mantiene en el rango de pH 5.8-7.6 para el grupo A₁, A₂, B y O.

En la tabla 39 se resumen cada una de las propiedades fisicoquímicas de la lectina purificada desde actividad específica AE hasta dependencia de pH.

TABLA 39. Propiedades fisicoquímicas de la lectina CpL

Actividad específica con A ₂	236507 ± 90575
Actividad específica con equino	189253 ± 45287
Peso molecular	32812 kDa
Punto isoelectrico	5.01
Estructura (DC)	Hélices alfa
Glicosilación	19%
Afinidad para carbohidrato	Manosa (Man)
Dependencia de cationes	Ca ⁺⁺ , K ⁺ y Na ⁺ ,
Termoestabilidad	17-60 °C
Dependencia de pH	5.8-7.6

Actividad biológica

Se evaluó la actividad biológica de: extracto crudo, pigmentos, fracción proteica y la lectina purificada CpL, para esto se utilizaron anillos íntegros de arterias aortas de ratas Wistar, utilizando un equipo con cámara para órgano aislado, una vez montados los anillos fueron contraídos con fenilefrina (204µg/mL) para la posterior evaluación de cada una de las fracciones a diferentes concentraciones, el resultado fue comparado utilizando un grupo control de anillos contraídos con fenilefrina (204µg/mL) expresado gráficamente en porcentajes.

Extracto crudo

La actividad biológica del extracto crudo se evaluó en los segmentos torácicos y abdominales de las arterias, como se puede apreciar en la figura 24 a la arteria se le aplicó una tensión con una concentración de FE 204µg, posteriormente se evaluó el extracto crudo de manera acumulada obteniéndose como resultado una disminución de la tensión arterial de casi el 100%.

Para el análisis estadístico se realizó una prueba de ANOVA de una vía así como también una prueba de contraste (Tukey), los datos estadísticos muestran que existe una diferencia significativa con $p < 0.001$ entre el grupo control al cual se le administró la fenilefrina con respecto de los grupos a los que se les administró el extracto crudo.

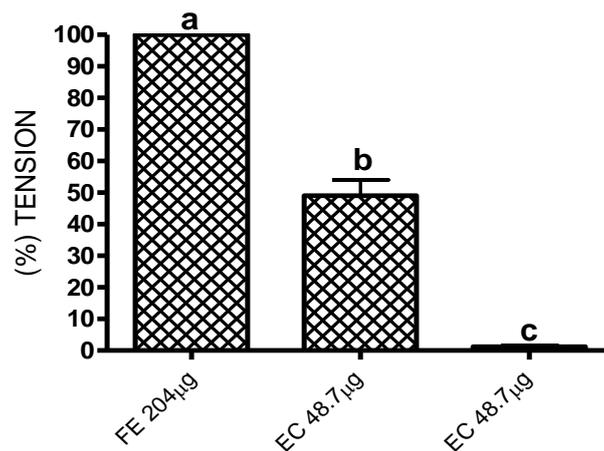


Figura 24. Evaluación del extracto crudo (EC) en arteria torácica. Los resultados muestran la media y EE (n=10) en porcentaje de tensión. Las letras diferentes indican las diferencias significativas $p < 0.001$ (Tukey), entre el grupo control con respecto a cada una de las muestras de extracto crudo.

En los datos obtenidos de los segmentos abdominales figura 25 se observa un resultado similar al de los segmentos torácicos, el análisis estadístico muestra que existe una diferencia significativa entre el grupo control con respecto al grupos a los cuales se les administro la muestra problema.

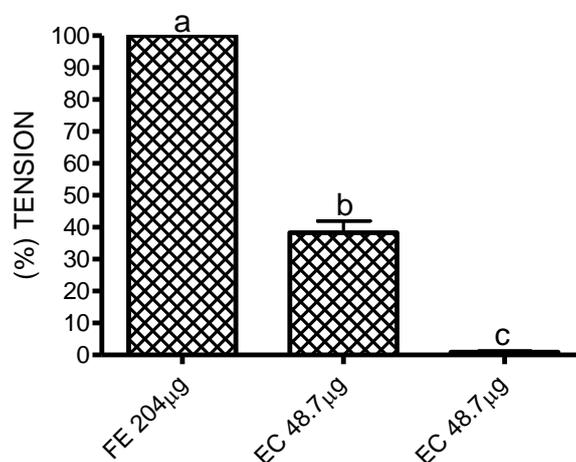


Figura 25. Evaluación del extracto crudo (EC) en arteria abdominal. Los resultados expresados en esta figura muestran la media y EE (n=10) en porcentaje de tensión. Las letras diferentes indican las diferencias significativas $p < 0.001$ (Tukey) entre el grupo control y cada una de las muestras de extracto crudo.

Pigmentos

En los resultados obtenidos en la evaluación de los pigmentos figura 26 se puede observar primeramente la contracción de las arterias torácicas con

FE 204 μ g, posteriormente al evaluar los pigmentos bajo diferentes concentraciones se observa una disminución de la tensión arterial de de casi un 60%, la administración de los pigmentos se realizo de manera acumulada.

En el análisis estadístico de los pigmentos se realizo una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de (Tukey), en la gráfica se observa que existe una diferencia significativa $p < 0.001$ del control (FE 204 μ g) con respecto a cada una de las muestras.

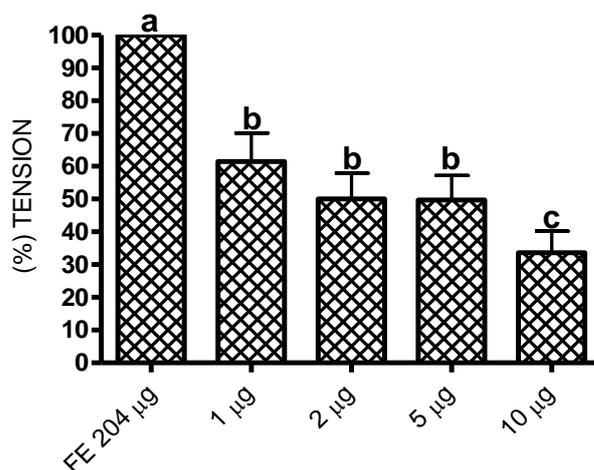


Figura 26. Evaluación de los pigmentos en arteria torácica. Los resultados expresados en esta figura muestran la media y EE (n=10) en porcentaje de tensión. Las letras diferentes indican las diferencias significativas $p < 0.001$ (Tukey) entre el grupo control con respecto de las muestras de pigmentos evaluados.

En los segmentos abdominales figura 27 se puede observar que de la misma manera que para los segmentos torácicos se presenta una disminución de la tensión la cual es de casi el 60%. En el análisis estadístico se observa que existe una diferencia significativa ($p < 0.001$) del control con respecto a cada una de las muestras tratadas con pigmentos a diferentes concentraciones.

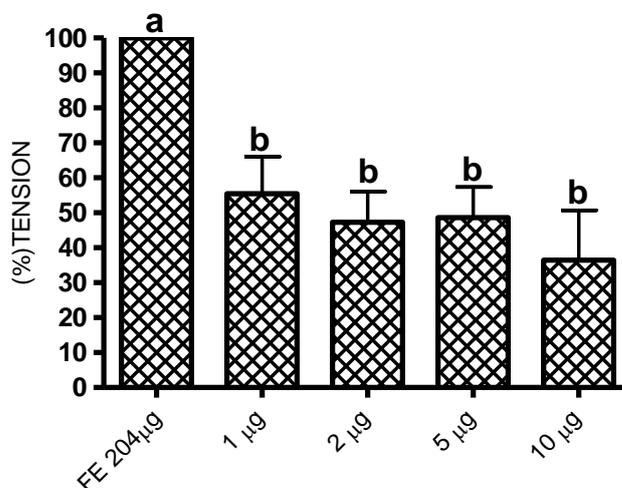


Figura 27. Evaluación de los pigmentos en arteria abdominal. Los resultados expresados en esta figura muestran la media y EE (n=10) en porcentaje de tensión. Las letras diferentes indican las diferencias significativas $p < 0.001$ (Tukey) entre el grupo control con respecto a cada una de las muestras de pigmentos a diferentes concentraciones.

Fracción proteica

En la evaluación de la fracción proteica que es donde se encuentran las lectinas figura 28 se puede observar que existe una disminución de la tensión de aproximadamente un 50% al duplicar y cuadruplicar la concentración. El análisis estadístico indica que existe una diferencia significativa ($p < 0.005$) entre el segundo y tercer grupo problema con respecto del grupo control y que no existe diferencia significativa entre el control con respecto del primer grupo problema.

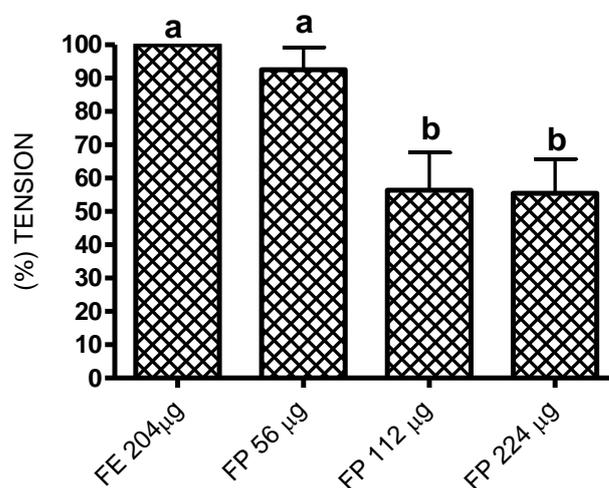


Figura 28. Evaluación de la fracción proteica (FP) en arteria torácica. Los resultados expresados en esta figura muestran la media y EE (n=10) en porcentaje de tensión. Las letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.005$ (Tukey) entre el grupo control y las muestras evaluadas.

En los datos obtenidos para la fracción proteica de los segmentos abdominales los resultados son semejantes con los del segmento torácico obteniéndose una disminución de la tensión de casi el 40% figura 29.

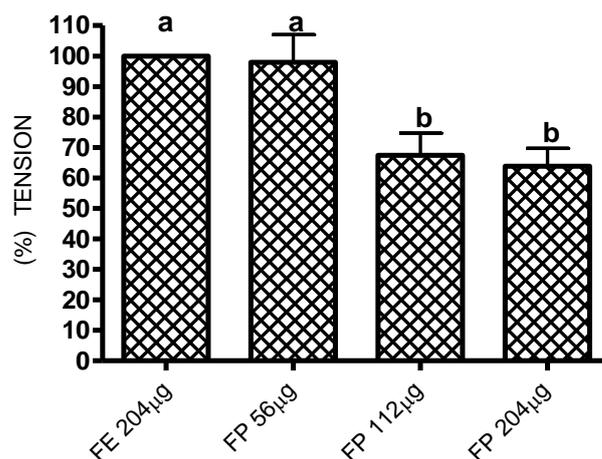


Figura 29. Evaluación de la fracción proteica en arteria abdominal. Los resultados expresados en esta figura muestran la media y EE (n=10) en porcentaje de tensión. Las letras diferentes indican las diferencias significativas $p < 0.002$ (Tukey) entre el grupo control y las muestras proteicas evaluadas.

Lectina CpL purificada

Los resultados obtenidos para la lectina CPL figura 30 muestran que conforme se aumenta la concentración desde 2.4µg hasta 44.8µg de manera acumulada la tensión arterial disminuye de forma gradual hasta casi un 50% con respecto a la tensión obtenida en el tejido por la FE 204µg. En el análisis estadístico se realizó una prueba de ANOVA de una vía así como también una prueba de contraste (Tukey), obteniéndose como resultado una diferencia significativa de $p < 0.001$ del grupo control con respecto a la muestra problema.

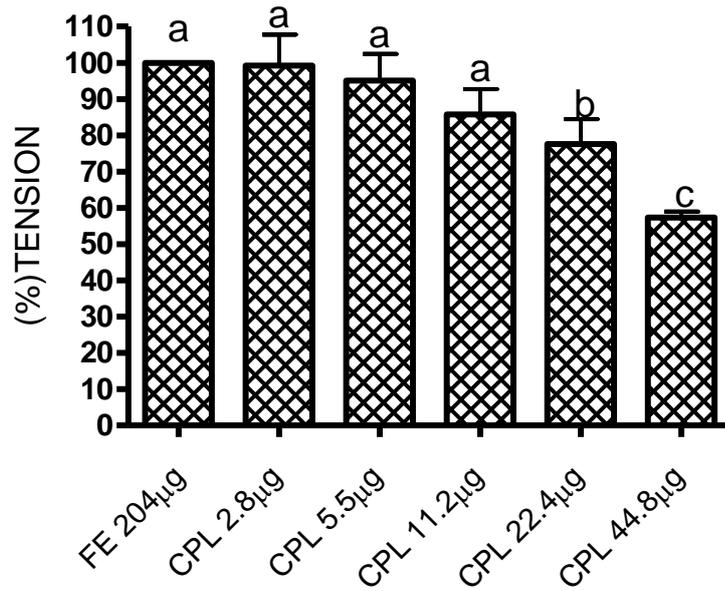


Figura 30. Evaluación de la lectina CPL en arteria torácica. Los resultados expresados en esta figura muestran la media y EE (n=10) en porcentaje de tensión. Las letras diferentes indican las diferencias significativas $p < 0.001$ (Tukey) entre el grupo control y las muestras proteicas evaluadas.

En la evaluación de la lectina CPL de los segmentos abdominales se puede observar figura 31 un resultado similar al obtenido en los segmentos torácicos, la tensión disminuye gradualmente hasta casi un 50% con respecto a la tensión obtenida con la FE 204µg.

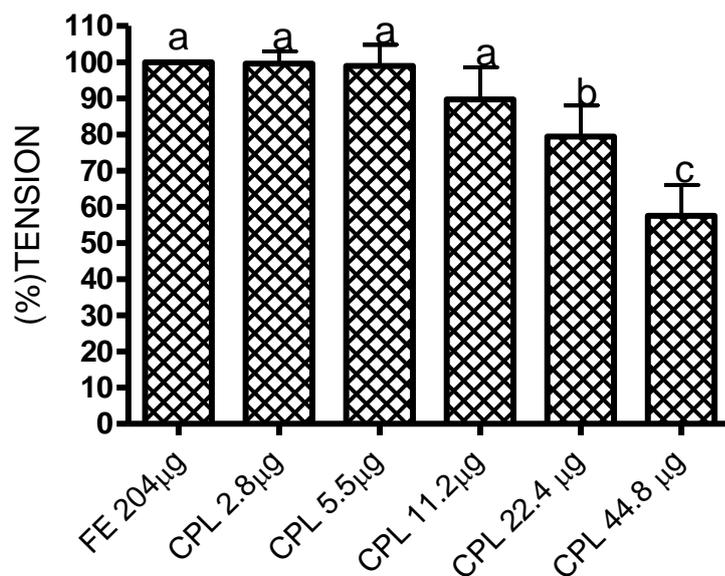


Figura 31. Evaluación de la lectina CPL en arteria abdominal. Los resultados expresados en esta figura muestran la media y EE (n=10) en porcentaje de tensión. Las letras

diferentes indican las diferencias significativas $p < 0.001$ (Tukey) entre el grupo control y las muestras proteicas evaluadas.

Concavalina A

Como se puede observar los resultados que se tienen para la lectina purificada CpL son semejantes a los obtenidos con la concavalina A (ConA) de grado analítico, en la grafica 32 se puede observar principalmente la estimulación de los anillos torácicos con FE 204 μ g induciendo como resultado una contracción de los tejidos, posteriormente se puede observar la administración de ConA de manera acumulativa a diferentes concentraciones (1 a 100 μ g) obteniéndose como resultado una disminución gradual de la tensión de aproximadamente el 60%, comprobándose de esta manera el efecto de las lectinas vegetales sobre el tejido endotelial de las arterias.

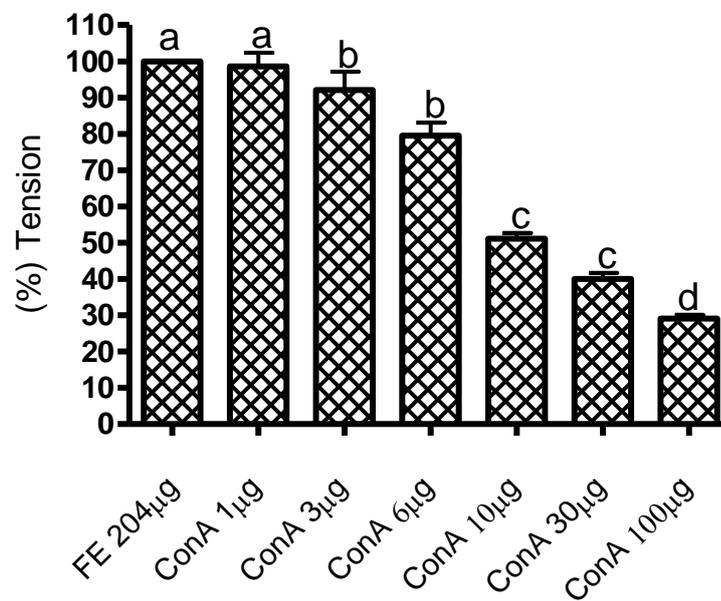


Figura 32. Evaluación de la Concavalina A segmento torácico. Los resultados se muestran en porcentaje de tensión utilizando diferentes concentraciones de ConA de manera acumulada. Las letras diferentes indican las diferencias significativas entre el grupo control y las muestras administradas $p < 0.001$ (Tukey).

En la siguiente figura se puede observar un resultado similar al obtenido para el segmento torácico, la administración de la lectina ConA de forma acumulativa induce la disminución de la tensión hasta un 60% figura 33.

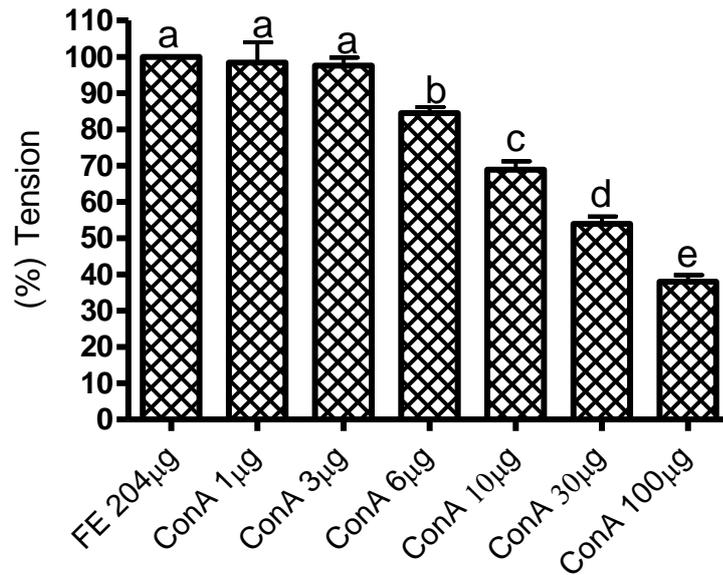


Figura 33. Evaluación de la concavalina A segmento abdominal. Los resultados se muestran en porcentaje de tensión utilizando diferentes concentraciones de ConA de manera acumulada. Las letras diferentes indican las diferencias significativas $p < 0.001$ (Tukey) entre el grupo control y las muestras evaluadas.

Determinación de óxido nítrico

En la figura 34 se pueden observar los resultados obtenidos para la determinación de la producción de óxido nítrico por las arterias al ser estimuladas con las diferentes muestras obtenidas, se utilizó carbacol como control debido a que este activa la óxido nítrico sintasa, aumentando la concentración del óxido nítrico, en la figura 34 se puede observar que la producción de óxido nítrico de la lectina purificada es comparable con la producida por la ConA utilizada como control.

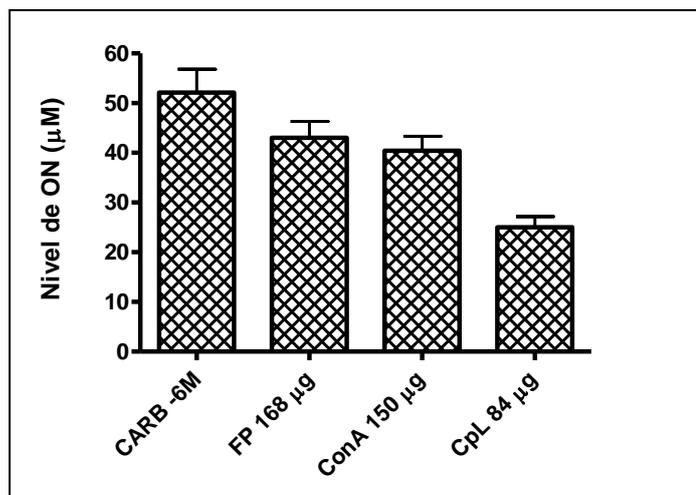


Figura 34. Determinación de óxido nítrico en arterias. La concentración de óxido nítrico de cada una de las muestras evaluadas se representa en micromolar, se utilizó carbacol como control y ConA para comparar

DISCUSION

El presente trabajo de investigación de maestría se enfocó en la identificación, purificación y caracterización de una de las lectinas presentes en extractos de flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), así como su determinación de la actividad biológica con la cual está íntimamente relacionada con los usos que se le atribuyen a esta planta en la medicina tradicional, principalmente en el efecto hipotensor arterial (Perusquia & col, 1994).

En los estudios previamente reportados para la flor de manita no se ha identificado la presencia de proteínas entre ellas a la(s) lectinas es por ello que hasta donde se sabe este es el primer estudio enfocado a la purificación y caracterización biológica de lectinas en esta planta. Los componentes no proteicos como los pigmentos fueron separados para evaluar su actividad biológica de forma similar a las lectinas obtenidas.

Ya que no existen trabajos previos, el primer objetivo en este trabajo de tesis fue identificar la presencia de lectinas en el extracto crudo de las flores del árbol de manita. Como se muestra en la figura 5 y tabla 5, se obtuvo actividad hemaglutinante con los cuatro grupos sanguíneos humanos, lo que indica la presencia de más de una lectina o una mezcla de lectinas que presentan afinidad hacia los carbohidratos terminales de los grupos sanguíneos A₁ y A₂:(GalNAc-Gal-Fuc), grupo B: (Gal-Gal-Fuc) y grupo O: (Fuc-Gal).

Una vez identificada la presencia de lectinas en el extracto crudo de flor de manita se realizó inicialmente la separación componentes no proteicos como los pigmentos y carbohidratos basado en el método de (Martínez, 2005; Quiñones, 2004) en los resultados tabla 7 se puede observar que conforme se avanza en la separación de estos componentes no proteicos, la concentración de carbohidratos disminuye gradualmente obteniéndose una eliminación del 65% de carbohidratos y de esta manera una fracción con mayor concentración proteica para posteriormente poder proceder a la purificación de la proteína.

En los eritrocitos de animales existe una amplia variedad de grupos sanguíneos aún no determinados por la variación de sus carbohidratos terminales tal es el caso de los equinos con 7 grupos sanguíneos: A, C,D, K, P, Q y U, por lo que con el fin de determinar la heterogeneidad de las lectinas presentes en la flor de manita, se realizó el ensayo de hemaglutinación (Tabla 8), obteniéndose aglutinación con los 4 tipos de sangre (bovino, equino, caprino y ovino) pero principalmente una mayor especificidad con los eritrocitos de equinos, estos resultados indican que los eritrocitos de equinos con los cuales se realizaron los ensayos presentan como carbohidratos terminales a galactosidos semejantes a los del tipo sanguíneo humano A₁ y A₂ (GalNAc-Gal-Fuc) estos resultados son congruentes con los obtenidos para otros estudios de hemoaglutinación con eritrocitos humanos y de animales (Ramírez y col 1996)

Al obtener la fracción proteica se continuó con la purificación de las lectinas, para esto se realizó una precipitación fraccionada con sulfato de amonio de acuerdo al método descrito por (Dawson 1969) la cual permite separar a las proteínas de acuerdo a su peso molecular.

Al analizar los resultados obtenidos de la precipitación fraccionada se puede observar que las lectinas separadas en cada una de las fracciones obtenidas: 0-20%, 20-40% 60-80% y 80-100%, presentan una mayor actividad específica hacia los grupos sanguíneos A₁ y A₂ lo que está indicando que la mayoría de estas lectinas presentan mayor especificidad hacia los carbohidratos terminales que se encuentran en estos grupos sanguíneos (GalNAc-Gal-Fuc) principalmente galactosidos, en la fracción 40-60% Figura 8 se puede observar un comportamiento diferente de las lectinas pues presentan mayor especificidad hacia el grupo sanguíneo B el cual tiene presentes como carbohidratos terminales (Gal-Gal-Fuc).

Al realizar la precipitación fraccionada a partir del extracto crudo en el cual como se menciono anteriormente se encuentra la mezcla de lectinas se puede observar que los resultados están indicando la separación de las diferentes lectinas presentes en el extracto crudo, además se puede ver que las lectinas de cada fracción presentan diferente afinidad para los carbohidratos presentes en los grupos sanguíneos humanos principalmente hacia los carbohidratos GalNAc-Gal-Fuc, presentes en A₁ y A₂, al analizar la actividad hemaglutinante de cada una de estas fracciones se puede observar que en la fracción 60-80% figura 9 presenta una actividad específica de casi tres veces mayor que las demás fracciones y al determinar la concentración de proteínas esta fracción presenta la mayor concentración y en base a lo reportado en la literatura en esta fracción se encuentran las lectinas de peso molecular intermedio 25-75 kDa aproximadamente, lo que concuerda con las lectinas vegetales reportadas en diversas investigaciones (Almeida & col 2005).

En base a estos resultados obtenidos se tomo esta fracción para continuar con la purificación de la lectina. Antes de continuar con el análisis del proceso de purificación es importante mencionar que la cantidad de lectinas en flores es muy pequeña pues en otras investigaciones previamente realizadas se ha iniciado con una concentración de proteína de 0.452 a 0.500 mg/mL tal es el caso de (*Artocarpus blancoi*, *Barrington asiática* e *Hibiscus sabdariffa*) terminando con una concentración de 0.200 mg/mL (Merca FE, 2004: Martinez y col, 2008) estos datos son altamente congruentes con los obtenidos para la flor de manita debido a que se inicia con una concentración de 0.504 mg/mL terminándose con una concentración de 206mg/dL, estos resultados están indicando que el método es el adecuado para continuar con la purificación de la lectina.

Para la purificación de la lectina presente en la fracción 60-80% se utilizaron cromatografías hidrofóbicas y de exclusión molecular, en las que una vez obtenida la fracción con mayor actividad hemaglutinante se determino el

peso molecular aparente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida obteniéndose como resultado un peso molecular aparente de 32,812 kDa que se puede observar en la Figura 14. La muestra se corrió en condiciones nativas y desnaturalizantes, teniendo como resultado el mismo patrón de bandeo. El nombre asignado a esta proteína es "Lectina *Chiranthodendron pentadactylon* (CpL)" basado en su nombre científico de la planta de la cual fue obtenida.

Es importante mencionar que hasta el momento no existen reportes de lectinas en esta planta por lo que se considera como un gran aporte para el área de la investigación científica.

Para desarrollar otros parámetros de la caracterización bioquímica de la lectina purificada se determino el Punto Isoeléctrico mediante la técnica de isoelectroenfoque, teniendo un resultado de 5.01 (Figura 15). Lo que indica es que la lectina a este intervalo de pH tiene carga neta de cero. También contribuyo a determinar la pureza de la muestra obtenida, esto es la presencia de una sola proteína y no de una mezcla, debido a que este método permite distinguir proteínas que difieren en sus pI en intervalos tan pequeños como es 0.01, y por lo tanto, es posible separar proteínas que difieren en una sola carga neta (Stryer & col, 2003).

El resultado del análisis de dicroísmo circular describió que la estructura CpL contiene alfa hélices debido a que el promedio de la longitud de onda se encuentra entre -210 a -222, esta longitud es lo característico de las hélices alfa que se encuentran a -208 a -222 nm en otras lectinas como *Canavalia dictyota* (Monteiro & col 1998). Además el patrón de dicroísmo circular obtenido es congruente con lo reportado en la literatura, ya que se sabe que la estructura típica de alfa hélices se encuentra entre -210 a -220 nm. (Fina, 2006). En otros estudios se ha demostrado que algunas lectinas purificadas de plantas como es el caso de *Caesalpinia tinctoria* presentan un mayor porcentaje de laminas beta al ser analizadas por dicroísmo circular obteniéndose resultados que se encuentran dentro de 218-240 característico de las laminas β (Oliveira & col, 2003).

Para conocer el grado de glicosidación se realizó la prueba de (Dubois 1956) tabla 15, los resultados muestran que la CpL presenta un 19% de glicosilación, estos resultados concuerdan con lo reportado en otras investigaciones tal es el caso de *Caesalpinia tinctoria* 8.3% de glicosilacion y lectinas de amaranto (Salgado & col, 2000; Oliveira & col, 2003). De la misma manera otros estudios han demostrado que lectinas como *Canavalia dictyota* no presentan ningún grado de glicosilación (Monteiro & col 1998).

Una vez realizada la separación de las lectinas mediante la precipitación fraccionada con sulfato de amonio y purificada la lectina CpL, a cada una de las muestras se les realizo la afinidad para carbohidratos, para la obtención de estos resultados se utilizaron los principales hidratos de carbono presentes en diversas lectinas analizadas, así como los que se han utilizado para la caracterización de otras lectinas reportados previamente (Hernández & col

2005; Calvet & col 2006). El extracto crudo donde se encuentran todas las lectinas presenta una alta afinidad hacia Man > GalNAc, GlcNAc > Fuc > Xil > Fruc, Glc, principalmente con los tres primeros carbohidratos, confirmándose de esta manera una vez más la presencia de lectinas en el extracto crudo. Todas las fracciones presentaron diferentes afinidades hacia los carbohidratos de acuerdo a su separación de las lectinas con la precipitación salina. La lectina purificada presentó una gran especificidad principalmente a Man > Gal > GalNAc > GalAcet > NANA > Lac > Glc, esta afinidad concuerda con los carbohidratos presentes en el tipo sanguíneo A₂ (GalNAc-Gal-Fuc) con el cual presenta mayor actividad hemaglutinante, los resultados obtenidos de la fracción 60-80% (Man > Gal > GlcNAc > GalNAc > GalAcet > NANA > Glc, Sac > Fruc) son semejantes a los obtenidos para la lectina CpL debido a que como se menciona anteriormente de esta fracción 60-80% se purificó esta lectina, de la misma manera que en el extracto crudo los resultados de afinidad de esta fracción concuerdan con la actividad hemaglutinante figura 9, debido a que presenta mayor actividad hacia el grupo sanguíneo A₁ y A₂ que presentan como carbohidratos terminales a (GalNAc-Gal-Fuc).

Muchas de las lectinas estudiadas principalmente las lectinas de tipo-C requieren de la presencia de iones metálicos para llevar a cabo su función en el reconocimiento de carbohidratos (Sharon & Lis 2001).

Al analizar los resultados de dependencia de cationes del extracto crudo, la fracción 0-20% y 40-60% se observa que no dependen de iones metálicos para cumplir con su función ya que no pierden su actividad hemaglutinante al tratarlas con el agente quelante, un dato importante que se debe analizar es que en el extracto crudo existen algunas lectinas que son dependientes de cationes pero debido al acumulo de estas lectinas en esta fracción no se determina con exactitud la dependencia de todas las lectinas presentes, los resultados de 20-40%, 60-80% y 80-100% indican que las lectinas son dependientes de iones metálicos como Ca⁺⁺, K⁺ y Na⁺. De la misma manera la lectina purificada es dependiente de los iones Ca⁺⁺, K⁺ y Na⁺, para cumplir con su función, estos datos concuerdan con algunas purificaciones de lectinas que se han realizado en algunas plantas como la *Canavalia marítima* ConM y *Canavalia dictyota* que es dependiente de Ca⁺⁺ y de Mn⁺⁺ (Monteiro & col 1998; Almeida & col 2005).

La mayoría de las proteínas presentan un cierto grado de termoestabilidad, es decir, conservan su estructura tridimensional al aumentar o disminuir la temperatura hasta cierto grado, logrando de esta manera cumplir con sus funciones biológicas correspondientes (Lehninger, 2003). Continuando con la caracterización de las lectinas se determinó la termoestabilidad de cada una de las fracciones, en los datos obtenidos se puede observar que la mezcla de lectinas presentes en el extracto crudo figura 17 presentan un intervalo de termoestabilidad de 4-100°C, al analizar el grado de termoestabilidad de las lectinas de las demás fracciones se puede observar que esta disminuye

gradualmente, la fracción 0-20%, 60-80% son termoestables en un intervalo de temperatura de 4 a 60°C, el caso de la fracción 20-40 y 40-60% (Figuras 19 y 20), mostraron una disminución de estabilidad entre 36 y 60°C. La termoestabilidad de la lectina CpL disminuye un poco con respecto a los datos obtenidos para la fracción 60-80% figura 21, esta lectina se mantiene estable a un intervalo de temperatura de 17-60°C disminuyendo gradualmente al aumentar la temperatura debido a la desnaturalización de la proteína, estos datos son semejantes a los obtenidos en el análisis de otras lectinas purificadas tal es el caso de las lectinas de amaranto (Salgado & col, 2000).

Las variaciones en el pH de todas las proteínas es un factor muy importante para su buen funcionamiento (Mathews, 2002) es por ello que algunas proteínas cumplen sus funciones bajo condiciones acidas, neutras o alcalinas, en base a esto se analizo la dependencia de pH de las lectinas de cada una de las fracciones, incluyendo la lectina purificada, los resultados de este ensayo muestran que las lectinas del extracto crudo tabla 31, presentan un intervalo de pH 5.0-8.4 de termoestabilidad, pero que en cada una de las fracciones analizadas estos intervalos de pH cambian debido a que en cada fracción existe una mezcla de lectinas que son diferentes en cada fracción (obtenidas por la precipitación salina) por lo que cada fracción se comporta de manera diferente, por ejemplo en el caso de la fracción 60-80% de donde se obtuvo la lectina pura, presentan una estabilidad en el intervalo de pH de 5.6-8.0 tabla 35, presentando mayor actividad para el grupo sanguíneo A₁ y A₂ lo que concuerda con los resultados de la actividad hemaglutinante de la tabla 12, mientras que la lectina CpL obtenida de esta fracción es estable en un intervalo de pH de 5.8-7.6 tabla 38, es decir, esta lectina presenta una mayor actividad bajo condiciones de pH acidas y neutras, por lo que la lectina se puede utilizar perfectamente en diferentes sistemas biológicos bajo este intervalo de pH, los resultados obtenidos en este ensayo son congruentes con el punto isoeléctrico 5.01 de la lectina CpL obtenidos mediante isoelectroenfoque figura 15.

Actualmente se utilizan una amplia variedad de plantas con fines medicinales para el control de diversas enfermedades, las plantas utilizadas para el control de la hipertensión arterial son de las mas estudiadas en la actualidad, en diversas partes del mundo se han analizado los extractos de varias plantas en equipos con cámara para órgano aislado de arterias aortas, tal es el caso de *Marila laxiflora*, *Calea prunifolia*, *Croton glabellus*, y *Salvia scutellarioides* (Morán & col 2008; Paredes & col 2004; Onzaga & col 2008), todos estos extractos presentan actividad vasorelajante de las arterias, en nuestro país se utiliza a la flor de manita para el control de esta enfermedad por lo que (perusquía & col 1994), evaluaron su efecto vasoactivo obteniéndose como resultado un efecto vasorrelajante, este resultado es congruente con la evaluación del extracto crudo figura 24 y 25 pero bajo diferentes concentraciones de proteína observando una efecto de vasorrelajación de casi el 100% del tejido, por lo que en este trabajo con el objetivo de determinar que

componentes del extracto crudo son los que producen este efecto se separaron y evaluaron los pigmento y proteínas (lectinas) así como la lectina purificada, al obtener la evaluación de los pigmentos (Tirilosido, astragalina, quercetina 3-O-glucosa, epicatequina y catequina) se puede observar una relajación de casi el 60% del tejido figura 26 y 27, esto es congruente con la evaluación de pigmentos en otros estudios, tal es el caso de la quercetina uno de los principales flavonoides presentes en la flor de manita así como también la hesperedina y hesperetina que también han sido evaluados de forma separada y que además la vía por la cual efectúan la vasorrelajación del tejidos es mediante la activación de la oxido nítrico sintasa (Villagómez & col, 2003) hasta el momento se puede decir que los pigmento producen casi el 60% de relajación del tejido, por lo que el siguiente objetivo fue determinar el efecto vaso activo de la fracción proteica donde se encuentran las lectinas de la flor de manita obteniéndose como resultado casi un 50% de re relajación del tejido figura 28 y 29, concluyendo de esta manera que el efecto de relación del tejido lo llevan en gran parte por un lado los pigmentos y por otro lado las lectinas ,en base a que existen varios reportes del efecto vasorrelajante de algunas lectinas utilizadas en diversas investigaciones tal es el caso de Concaivalina A (Con A), la hemaglutinina del germen del trigo (WGA) y la lectina aglutinante de la lenteja (LCA), *Dioclea grandiflora* (DGL) entre otras (Kleha & col, 1991-1993; Lima & col 2004: Onzaga & col 2008), por lo que al evaluar la lectina CpL purificada bajo diferentes concentraciones de forma acumulada figura 30-31 se puede observar un efecto de vasorrelajación de un 40% tanto en arterias torácicas y abdominales, este resultado se puede comparar con el obtenido para la ConA que se observa en la figura 32 y 33 obteniéndose casi un 60% de relación del tejido. Los resultados obtenidos en este trabajo están comprobando la gran utilidad de la flor de manita en la medicina tradicional para el control y tratamientos de enfermedades como es la hipertensión arterial, en base a estos resultados se puede concluir el efecto del control de la hipertensión se lleva de forma conjunta tanto por los pigmentos como por las lectinas.

Algunos de los reportes de la evaluación de las lectinas indican que estas se unen a sitios glicosilados o glicoproteínas de la superficie celular del endotelio activando de esta forma la vía oxido nítrico sintasa, desencadenando un efecto de vasorrelajación que se lleva a cabo de una manera similar al producido por el factor relajante derivado del endotelio EDRF también llamado oxido nítrico (Kleha & col, 1991-1993; Lima & col 2004), en estos estudios se demostró que al bloquear las lectinas con los carbohidratos afines o mucina el efecto de vasorrelajación se inhibía de forma completa al evaluar las lectinas, por lo que con el fin de corroborar el mismo efecto se bloquearon las lectinas de la fracción proteica con mucina obteniéndose como resultado una inhibición del efecto vasorrelajante, por lo que se comprobó que efectivamente las lectinas están reconociendo de la misma manera que en los estudios

reportados a carbohidratos de sitios glicosilados presentes en la superficie o glicoproteínas del endotelio (Lima & col 2004).

Con el objetivo de determinar la posible vía por la cual producen el efecto de vasorrelajación las lectinas se determinó la concentración de óxido nítrico producido por los anillos arteriales, al adicionar las lectinas en la figura 34 se puede observar al carbacol utilizado como control positivo debido a que este activa la óxido nítrico sintasa posteriormente al evaluar la concentración de la Con A se puede observar un resultado comparable de la lectina purificada, por lo que se puede decir que esta es la posible vía por la cual las lectinas producen el efecto de vasorrelajación, este resultado es congruente con los datos obtenidos en algunas investigaciones sobre la producción de óxido nítrico por algunas lectinas tal es el caso de la *canavalia ensiformes* (ConA), *Pisum arvense* (PAA), *C. brasiliensis* (ConBr) y *Dioclea grandiflora* (DGL) (Andrade & col 1999).

CONCLUSIONES

- Se comprobó la presencia de lectinas en el extracto crudo de la flor de manita
- El extracto crudo presento actividad hemaglutinate con los cuatro tipos sanguíneos principalmente con A₂ (GalNAc-Gal-Fuc).
- Mediante los métodos de purificación utilizados en este trabajo se compro la presencia de más de una lectina presentes en la flor de manita.
- A la lectina pura obtenida se le denomino “Lectina de *Chiranthodendron pentadactylon* (CpL)” con un PM 32,812; Punto isoeléctrico: 5.01.
- Las propiedades fisicoquímicas de la lectina CpL indican que presenta una estructura secundaria con presencia de hélices alfa.
- La lectina purificada pertenece al grupo de las glicoproteínas debido a que presenta un grado de glicosilación de 19%.
- El análisis de la especificad de la lectina hacia carbohidratos es: Man > Gal > GalNAc > GalAcet > NANA > Lac > Glc, GlcNAc > Fruc > Fuc > Rib > Sac > Xyl.
- La lectina CpL presenta dependencia de los cationes Ca⁺⁺, K⁺ y Na⁺.
- La lectina CpL presenta una estabilidad en un intervalo de pH de 5.8-7.6.
- El grado de termoestabilidad de la lectina es de 17-60°C.
- En el análisis de la actividad biológica de los componentes de la flor de manita, los pigmentos presentaron un 60% de relajación y la lectina CpL un 40%.
- El mecanismo de acción de la lectina es mediante la activación de la vía oxido nítrico sintasa.
- Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman el uso de la flor de manita en la medicina tradicional para el control de la hipertensión arterial y malestares del corazón.
- La flor de manita representa una fuente potencial de productos terapéuticos de origen natural que pueden utilizarse como apoyo y alternativa para el control de diversas enfermedades principalmente en la hipertensión.

PERSPECTIVAS

- Purificar y caracterizar bioquímica y biológicamente a las otras lectinas presentes en la flor de manita.
- Análisis de la actividad de la lectina CpL en animales normotensos e hipertensos.
- Análisis de los pigmentos en animales normotensos e hipertensos
- Análisis de la farmacocinética de los pigmentos y lectinas de la flor de manita.
- Determinar la función y el posible mecanismo de las lectinas y pigmentos purificados en los estudios farmacológicos reportados en esta planta (antibacteriana y antiparasitaria).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abad, M. Bermejo, P. Villar, A. Sánchez P, S. Carrasco, L. 1997. Antiviral activity of medicinal plant extracts. Journal, vol.11, n3, pp. 198-202.
- Alanís A. Calzada F. Cervantes J. Torres J and Ceballos G. 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. J. Ethnopharmacol. 100(1-2): 153-157.
- Almeida. G, C. Batista M, F. Santi G, T. Batista C, J. MATIAS R, B. Sampaio, A, A. Lima M, M. Vieira P, N. Passos M, A. Cesar B, J. 2005. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. Journal of Structural Biology 152 (2005) 185–194
- Andrade, L. Arruda,S. Barbosa,T. Paim,L.Viana R. Sousa C, y Barral, N. 1999. Lectin-Induced Nitric Oxide Production. Cellular Immunology 194, 98–102.
- ÁRBOL DE LAS MANITAS, FLOR DE MANITAS MACPALXÓCHITL CUÁHUIT (Sterculiaceae) *Chiranthodendron pentadactylon* Larreat. <http://ciudadanosenred.org.mx/?cve=1391>
- Argueta V, A. Cano A, L. Rodarte M, E. 1994. ATLAS DE LAS PLANTAS DE LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA II. Primera edición. Instituto Nacional Indigenista. pp 644-645.
- Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana 2009 © D.R. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Hecho en México <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7950>
- Avellaneda S. Rojas H. Cuéllar C y Fonseca J. 2005. Actividad antibacteriana de *Diphyssa minutifolia* Rose. REV CUBANA PLANT MED;10(2).
- Brocca H y Tovar Kuri S. 1997. Flor de Manita (Mano de León o Mecapalxochilth) *Chiranthodendron pentadactylon*. <http://www.liberaddictus.org/Pdf/0485-42.pdf>
- Calzada F. Yépez-Mulia L and Aguilar A. 2006. *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican

traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. J. Enthopharmacol. 108(3):367-370.

- CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS CARBOHIDRATOS.
docencia.izt.uam.mx/lyanez/analisis/.../notascarbohidratos.pp
- Castillo V. Fikrat A. 2005. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. Revista de investigación clínica. Vol 57 Num 1 pp 55-64.
- Circular Dichroism of Protein. PC3267.
<http://www.physics.nus.edu.sg/~Biophysics/pc3267/CD-2007.pdf>).
- Dawson C, Elliot E, Jones K. 1969. Data for Biochemical Research 2nd edition. Oxford University Press. London.
- Dubois K, Gilles, J. Hamilton, P. Rebers, A y Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Sustances. Division of Biochemistry, University of Minesota, StPaul, Minn.
- D`Mello, F. 1997. Handbook of Plant and Fugal Toxicants. ACRC Press Series. Capitulo VIII, pp 99-115.
- Fernández G.A; Muñoz J A; M; Cambillo M.N; Ramos F; Alvarado O.C; .2007. Efecto del consumo moderado de vino tinto sobre algunos factores de riesgo cardiovascular, pp 145-152.
www.revistaenologia.com/PDF/n22_ENO
- Fernández F, Torres M. 2003 Inflamación Y Plantas. Medicinales.
<http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH0199.dir/doc.pdf>
- Ferrandiz ML, Alcaraz MJ. 1991. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. Agents Actions;32:283-8.
- Fina, B. 2006. Dicroismo circular. Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral Facultad Cs. Médicas - UNR - Rosario – Argentina.
www.biologiaosea.com.ar
- FLAVONOIDES, 2009, www.geocities.com/aedici/flavonoides.htm
- Flores W. Fuentes R. Galindo D. González F. Hernández G. Hernández K. Hidalgo I. Zamudio del Carpio D. Castañeda B. Ibáñez L. Larrea H. 2008. Evaluación de los efectos antioxidante, antibacteriano y antifúngico

de *Calophyllum Brasilense* Cambess (Lagarto Caspi). Revista Horizonte Médico. Volumen 8, N° 2.

- Gabius H.J. 1997. Animal Lectins. Eur. J. Biochem 243, 543- 576.
- Gabius H.J. 2002. Animal Lectins and life: a guided tour into the realm of the sugar code.
- Gallego del Sol. Nagano S. Cavada S. Sampaio H. Sanz L y Calvete J. 2006. Lectinas Investigacion y Ciencia
- García-Hernández E and Hernández-Arana A. 1999. Structural bases of lectin-carbohydrate affinities. Comparison with protein folding energetis. Protein Sci., 8:1075-1086.
- Gracia N. M. 2007. Cuantificación de Fenoles y Flavonoides totales en extractos naturales. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO. www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf -
- Giraldo B. Hernández P. Angulo H. Fuertes R. 2003. Actividad antinitrosativa y antiinflamatoria de los flavonoides de las hojas de *uncaria tomentosa* willd. d.c. (uña de gato) REVISTA DE LA SOCIEDAD QUIMICA DEL PERU http://www.cqfperu.org/download_archivos/articulos/rv_unaGato.PDF
- Goodman, G. Harman, G. Limbird, E. Molinoff, B. Ruddon, W. 1997. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Novena edición. Mc Graw-Hill Interamericana. 835-862.
- Goldstein I.J; Winter H.C; Poretz R.D. 1997. Plant lectins: tools for the study of complex carbohydrates. En Glycoproteins II Montreuil J., Vliegthart J. F. G. and Schachter H. (Eds). Elsevier Science BV. Chpt 12: 403-474.
- Guyton, M.D; Hall, Ph. D. 2001. Tratado de Fisiología Medica. 10ª Edición, Capitulo 14, 17, 18, 19.
- Hernández C.P; Pérez C.E; Martínez M. L; Ortiz B. y Martínez G. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato, pp 21-27. http://computo.sid.unam.mx/Bioquimica/PDF/2005/01/g_21_27Pedro
- John W y Sons L. 2007. Hanbook of proteins structure and function. Capitulo Techniques; Characterization pp 867-868.

- Kleha F, J. Devesly, P. Johns A. 1991. The effects of lectins on the release of EDRF from rabbit aorta. *Cardiovascular Research, J. Pharmacol* (1991), 104, 287-288
- Kleha F, J. Devesly, P. Johns A. 1993. EDRF release from canine coronary artery by lectins *Cardiovascular Research, J. Pharmacol* (1993), 110, 1473-1478
- Kung, S, 2007. Flor de manita; una manita para el Corazón y los nervios. *CONABIO. Biodiversitas*. 74:13-15.
- Leighton P. Casanegra P. Maiz G. Urquiaga R. Inestrosa C. Guarda S. 1999. *Boletín Ciencia Vino y Salud Funcion Endotelial*. Vol 3, N° 1. <http://www.bio.puc.cl/vinsalud/pdf/vol3n1.pdf>
- Linares E. Flores P y Bye R. 1986. Selección de plantas medicinales de México. Ed LIMUSA. pp 44-45.
- Lima, F. Criddle, N. Souza, P. Sampaio, H. Nascimento, S. Cavada, S. and. Assreuy, S. 2004. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 56: 1415–1421
- López L. 2002 *Flavonoides*. *Fitoterapia* Vol 21 Num 4.
- López M. Castañeda C. Yllescas G. Mendiola O. Blanco L y García G. 2004. Efecto de una lectina de frijol tépari sobre la sobrevivencia de diferentes tipos de cáncer humano in vitro. <http://www.smb.org.mx/XXVICONGRESO/text/Carteles/Martes/Ma140.pdf>
- Maguna, F. Romero, M. Garro, A. - Okulik, B. 2006. Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. *Universidad Nacional del Nordeste comunicaciones científicas y tecnológicas Resumen: E-057*
- Márquez V. Mendoza M. Parejo A. Hernández S, Martínez González A, Venegas Contreras A. 2007; Evaluación química del extracto total etanólico de las hojas y corteza fresca de muntinguia calabura (*ealeocarpaceae*). *Scientia Et Technica*, Vol IIIIX, pp 455-457.
- Martínez M Alejandro. 2005. *FLAVONOIDES*. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia Medellín.
- Martínez M, Alvarado A, Mendoza C, Basurto P. 2006. Plantas medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla, México, *REDALYC*. pp 79-87.

- Martínez-Flórez S, González-Gallego, Culebras M y Tuñón M^a.2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes Nutr. Hosp. pp, 271-278.
- Martinez B. Alvarado I. Molina R. 2003. Efecto vasorrelajador del extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus*. Universidad Autónoma de Querétaro
- Mathews, C.K; Van Holde, K.E; Ahern, K.G: 2002. BIOQUIMICA. 3^a Edición. Pearson Madrid. Capitulo 5 y 9.
- Melgarejo R. 2005. El endotelio: 25 años después. *Revista MED, Volumen 13, pp 2-6.* prostaciclinas\Endotelio_com - El endotelio 25 años después.htm
- Méndez C. 2006. Validación farmacológica de la actividad analgésica de las infusiones de la corteza de *Spondias purpurea* L. (Jocote), hojas de *Chyranthodendron pentadactylon* (Manita) y *Croton guatemalensis* (Copalchi). UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2484.pdf
- Merck, S. and Dohme. 2003, Nuevo Manual Merck de Información Médica General, Océano, Hipertensión Arterial, Capitulo 22: 160-171.
- Miranda M, Raberón Corteguera, 1999, Óxido nítrico/sepsis. Controversias en su metabolismo, funciones y utilización Rev Cubana Pediatr 1999; 71(4):238-44.
- Monteiro C, Muniz-Filho E, Horta G, Beltramini M and Moreira A. 1998. ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A LECTIN FROM *Canavalia dictyota* SEEDS. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 10(3):167-172.
- Morán P. Olmedo D. Gupta, M. Guerrero, E. 2008. EVALUACIÓN VASCULAR Y EFECTO HIPOTENSOR DE PLANTAS DEL GÉNERO MARILA. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica. Volumen 2, número 1, artículo 4.*
- Nijveldt J. Nood, V. Hoorn, V. Boelens, G. Norren, V y Leeuwen, A. 2010. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Society for Clinical Nutrition* 74:418–25.
- Olaiz G., Rivera J., Shamah T., Rojas R., Villalpando S., Hernández M., Sepúlveda J. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. <http://www.insp.mx/ensanut>.

- Onzaga L, Rincón J, Guerrero F. 2008. Perfil vasodilatador del extracto y la fracción flavonoide ecetilada obtenida e *Calea prunifolia* HBK. Colombia Med. Corporación Editora Medica del Valle 39: 33-40.
- Oliveira, L. Beltramini, M. Simone G. Nasser, B. Silva, L. Kian, N. Vieyra, Pires. Almeida, O. 2003. Purification and partial characterization of a lectin from *Caesalpinia tinctoria* Domb, ex Dc fruits Brazilian Journal of Plant Physiology. vol.15, n.2, pp. 119-122. ISSN
- Osegueda S, Moreno y Koleff P. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. 62:12-15.
- Ortega T, Carretero MT, Pascual E, Villar AM. 1996 Antiinflammatory activity of ethanolic extracts of plants used in traditional medicine in Ecuador. Phytoter Res;10:S121-2.
- Pacheco C. 1888. La colección de plantas medicinales más importantes de América latina.
- Paredes I, Luque R, Olarte C y Calle A. 1981; Caracterización de la Fracción Responsable del Efecto Hipotensor del *Croton glabellus*. Trabajo realizado en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Ciencias. Quiñones Zahira, 2004. Identificación de Carbohidratos y Proteínas. Departamento Ciencias Fisiológicas.
- Perusquia M; Mendoza S; Bye R; Linares E; Mata R. 1995. Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta J. Ethnopharmacol. 46: 63-69.
- Quattrocchi, F.L.S. 2000. CRC World Dictionary of PLANT NAMES Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology. Volume I A-C. pp 517.
- Ramírez J, Palacios M, Gutiérrez O; 2006. Estudio del efecto antihipertensivo de la *Salvia scutellarioides* en un modelo de ratas hipertensas. COLOMBIA MÉDICA Vol. 37 N° 1, pp 53-60.
- Ramírez M, Carreón N, Mercado G, Rodríguez T. 1996. Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación del Paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. Vet, Mex., 27 (3). revistaveterinaria.fmvz.unam.mx/fmvz/revvetmex/a1996/.../rvm27313.pdf
- Reactivo de Fehling, http://es.wikipedia.org/wiki/Reactivo_de_Fehling

- Reyes F; Cejudo G. Métodos para la cuantificación de proteínas. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*1985. www.uco.es/.../27%20MÉTODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACIÓN%20
- Rodríguez, V. Riquelme, B. Valverde, J y Gattuso S. 2004. CARACTERIZACION DEL EFECTO AGLUTINANTE DE LECTINAS DE LA FAMILIA DE LAS FABACEAS SOBRE LOS ERITROCITOS HUMANOS MEDIANTE EL ANALISIS DE IMÁGENES. Bahía blanca. Vol 16. 247-248.
- Salgado T, Valadez V. 2000. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LECTINAS DE SEMILLAS AMARANTO CULTIVADO EN EL ESTADO DE HIDALGO. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud.
- Sáenz C. 2003. Medicamentos, plantas medicinales y productos naturales. Vol 16 numero 1y 2.
- Sánchez de L. 2000. LAS PLANTAS DE LA FLORA MEXICANA CULTIVADAS EN ESPAÑA.
- Sharon N and Lis H. 1989. Lectins as Cell Recognition Molecules. *Science* 246: 227-234.
- Sharon N and Lis H. 1997. Glycoproteins: structure and function in glycosciences: status and perspectives (Gabiús, H.J. & Gabiús S. Eds.) pp: 133-162. Chapman & Hill, Weinheim.
- Sharon N and H. Lis. 2001. Lectins. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*: 1-9.
- Sharon N and Lis H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, vol 14, no 11, pp 53-62.
- Stryer L; Berg J.M; Tymoczko J.L. 2003. *Bioquímica*, 5ª Edición, Reverte, Barcelona. Capitulo 3,4 y 11.
- Varki A, Cumming R.D, Esko J.D, Freeze H.H, Stanley P. Bertozzi C.R, Hart G.W, Etzler M.E. 2001 *Essential of Glycobiology*, I-type lectins, capitulo 22, pp 417-427.
- Velazquez C, Calzada F, Esquivel B, Ceballos G. 2002. Actividad Inhibidora de la Secreción Intestinal Causada por la Toxina *Vibrio*

cholerae de Flavonoides Aislados de *Chiranthodendon pentadactylon*. Vol 25, pp 63.

- Velazquez, C. Calzada, F. Torres, J. Gonzalez, F. Ceballos, G. 2006. Antisecretory activity of plants used to treat gastrointestinal disorders in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 103 (2006) 66–70
- Velázquez Monroy O, Rosas Peralta M, Lara Esqueda A, Pastelín Hernández G, Attie F, Tapia Conyer R. 2000. Hipertensión. http://www.insp.mx/Portal/Centros/ciss/nls/boletines/PME_11.pdf
- Villagómez, M. Molina, A. Alvarado, C. 2003. Efecto de flavonoides de origen vegetal sobre la vía del NO/GMPc. Facultad de Química Universidad Autónoma de Querétaro.
- Vittone Leticia, Weilenmann-Mundiña Cecilia. 2008. SECCION DE HIPERTENSION ARTERIAL. Endotelio Vascular e Hipertensión. pp 1-21.
- Zenteno E; Debray H and Montreuil H. 1988. Purification and partial characterization of two lectins from the cactus (*Machaerocereus eruca*). *FEBS Lett* 238: 95-100.