



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

T E S I S

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y
ANTIBACTERIANA DE LECTINAS DE HOJAS DE CHAYA
(*Cnidoscolus chayamansa*)**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIA DE LA SALUD**

Presenta

IBQ. PAULINA ALEJANDRA GIL CERVANTES

Directora de tesis:

D. C. BERTHA FENTON NAVARRO

2012

**Este trabajo de tesis se realizó bajo la dirección de la
D. C. Bertha Fenton Navarro en el
Laboratorio de Glicobiología
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”
UMSNH**

Apoyado por: CIC-UMSNH 16.2-2010. 2011

COMITÉ TUTORAL:

D. C. JOSÉ MIGUEL CERVANTES ALFARO

D.C. GRACIELA LETECHIPIA VALLEJO

M. F. B. HUMBERTO RUIZ VEGA

DEDICATORIA

A DIOS, por la oportunidad de vivir en este maravilloso mundo.

*A mi FAMILIA, por el apoyo incondicional que me han brindado en cada paso
que he dado, en cada etapa de mi vida.*

*A mi ASESORA, por hacerme ver que siempre hay algo más por descubrir y por
superar, a pesar de los obstáculos.*

A mis AMIGOS, por sus palabras alentadoras.

*A TODAS y cada una de las personas que han hecho de mi una mejor persona
compartiéndome un momento, un instante, un trozo de sabiduría.*

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento:

A la D.C. BERTHA FENTON NAVARRO por aceptarme como hija académica y compartirme sus conocimientos, por su paciencia y perseverancia en mi formación como investigadora.

A mi comité tutorial: D. C. JOSÉ MIGUEL CERVANTES ALFARO, D.C. GRACIELA LETECHIPIA VALLEJO y M.F.B. HUMBERTO RUIZ VEGA por sus observaciones y aportaciones que me ayudaron enormemente a la realización de este trabajo.

A la D.C. LUZ TORNER, por su significativa aportación.

A la DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FAC. DE CSC. MED. Y BIOL. "DR. IGNACIO CHAVEZ" DE UMSNH por permitirme pertenecer a un Posgrado de excelencia académica y darme la oportunidad de desarrollar habilidades en la investigación.

INDICE GENERAL

	CONTENIDO	PAG.
	INDICE DE TABLAS	viii
	INDICE DE GRAFICAS	x
	INDICE DE FIGURAS	xi
	INDICE DE ABREVIATURAS	xii
	RESUMEN	xiv
I	INTRODUCCION	1
	1.- Descripción de las plantas medicinales	1
	2.- Descripción de la Chaya (<i>Cnidoscolus chayamansa</i>)	2
	2.1 Usos en la medicina tradicional	3
	2.2 Compuestos activos	4
	2.3 Valor Nutricional	6
	2.4 Efectos farmacológicos	7
	3.- Lectinas	12
	3.1 Definición	12
	3.2 Descripción general	12
	3.3 Clasificación	14
	3.4 Funciones	14
	3.5 Tipos de lectinas	15
	3.6 Actividad antibacteriana de las lectinas	23

II	JUSTIFICACIÓN	27
III	HIPOTESIS	27
IV	OBJETIVO GENERAL	27
V	OBJETIVOS PARTICULARES	27
VI	MATERIALES	28
VII	MÉTODOS	28
	<ul style="list-style-type: none">• Extracción de pigmentos: acetónica y alcohólica• Obtención del extracto crudo• Ensayo de hemaglutinación• Cuantificación de proteínas• Precipitación fraccionada (con sulfato de amonio) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$• Diálisis• Cromatografía de filtración en gel o exclusión molecular• Electroforesis SDS-PAGE (Dodecil Sulfato de Sodio- Electroforesis de Gel de Poliacrilamida)• Análisis de las propiedades bioquímicas• Análisis de las propiedades biológicas• Análisis Estadístico	
IX	RESULTADOS	42
X	DISCUSION	84
XI	CONCLUSIONES	97
XII	PERSPECTIVAS	98
XIII	ANEXOS	99
XIV	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	100

INDICE DE TABLAS

	CONTENIDO	PAGINAS
Tabla 1	Ejemplo de clasificación de lectinas vegetales.	16
Tabla 2	Actividad Hemaglutinante (AE) del EC de chaya.	41
Tabla 3	Diferentes muestras de hoja de chaya.	45
Tabla 4	Actividad Hemaglutinante (AE) de diferentes muestras de chaya.	47
Tabla 5	Concentración proteica de los diferentes ES de hoja de chaya.	48
Tabla 6	Actividad Hemaglutinante (AE) de la fracción proteica (FP).	50
Tabla 7	Actividad Hemaglutinante (AE) del intervalo salino 0-20%.	51
Tabla 8	Actividad Hemaglutinante (AE) del intervalo salino 20-40%.	52
Tabla 9	Actividad Hemaglutinante (AE) del intervalo salino 40-60%.	53
Tabla 10	Actividad Hemaglutinante (AE) del intervalo salino 60-80%.	53
Tabla 11	Actividad Hemaglutinante (AE) del intervalo salino PP 80-100%.	54
Tabla 12	Actividad Hemaglutinante (AE) del intervalo salino SB 80-100%.	55
Tabla 13	Comparación de la actividad específica (AE) con sangre de diferentes animales.	56
Tabla 14	Actividad Hemaglutinante (AE) de la fracciones obtenidas por cromatografía de Exclusión Molecular	59
Tabla 15	Actividad Hemaglutinante (AE) de las fracciones	62

	obtenidas por cromatografía de Exclusión Molecular con agarosa	
Tabla 16	Porcentaje de recuperación de proteínas	66
Tabla 17	Afinidad a carbohidratos con EC, FP y PP salinas	68
Tabla 18	Afinidad a carbohidratos con Me1 y 2 (Me 1 y Me2). Cromatografía de exclusión molecular	69
Tabla 19	Dependencia de pH de EC, FP y PP salinas	70
Tabla 20	Termoestabilidad de EC, FP y PP salinas	72
Tabla 21	Dependencia de cationes EC, FP y PP 20-40%	73
Tabla 22	Evaluación de la concentración inhibitoria minima (CIM) de EC	75
Tabla 23	Diluciones del antibiótico	77
Tabla 24	Diluciones de levofloxacino	77
Tabla 25	Concentraciones del antibiótico	78
Tabla 26	Halos de inhibición bacteriana y cálculos de la CIM	79

INDICE DE GRAFICAS

	CONTENIDO	PAG
Gráfica 1	Actividad hemaglutinante (AE) del extracto crudo (EC).	41
Gráfica 2	Actividad hemaglutinante (AE) de fracción proteica (FP).	50
Gráfica 3	Actividad Hemaglutinante de la fracción salina 0-20%.	52
Gráfica 4	Actividad Hemaglutinante de la fracción salina 20-40%.	53
Gráfica 5	Actividad Hemaglutinante de la fracción salina 40-60%.	54
Gráfica 6	Actividad Hemaglutinante de la fracción salina 60-80%.	55
Gráfica 7	Actividad Hemaglutinante del intervalo de concentración PP 80-100%	56
Gráfica 8	Actividad Hemaglutinante del intervalo de concentración SB 80-100%	57
Gráfica 9	Crecimiento bacterianos de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 vs EC, FP, PP 20-40% y antibiótico	80
Gráfica 10	Crecimiento bacterianos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 vs EC, FP, PP 20-40% y antibiótico.	81
Gráfica 11	Crecimiento bacterianos de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 vs EC, FP, PP 20-40% y antibiótico	79
Gráfica 12	Crecimiento bacterianos de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 vs EC, FP, PP 20-40% CchL y antibiótico	82

83

INDICE DE FIGURAS

	CONTENIDO	PAG
Figura 1	Diferentes estructuras de lectinas de plantas.	17
Figura 2	Modelo propuesto para la formación de poros en la membrana.	26
Figura 3	Hojas de chaya (<i>Cnidoscolus chayamansa</i>) de diferente tamaño	46
Figura 4 y 4a	Pigmentos removidos de la hoja de chaya	51
Figura 5	Gel de electroforesis (SDS-PAGE) EC, FP e intervalos de concentración salina (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100%)	59
Figura 6	Cromatografía de Exclusión molecular	60
Figura 7	Gel de electroforesis (SDS-PAGE). Fracciones de Cromatografía de exclusión molecular.	62
Figura 8	Cromatograma. Fracciones obtenidas con cromatografía de exclusión molecular en gel de agarosa.	63
Figura 9	Gel de electroforesis (SDS-PAGE). Fracciones de cromatografía de exclusión molecular. Gel agarosa.	65

ABREVIATURAS

AE	Actividad Específica
ATCC	American Type Culture Colection
BSA	Albúmina Sérica Bovina
°C	Grados Centígrados
cm	Centímetros
Col	Colaboradores
CRD	Dominio de Reconocimiento a Carbohidratos
EC	Extracto Crudo
EE	Error Estándar
FP	Fracción Proteica
Fuc	Fucosa
g	Gramos
Gal	Galactosa
GalAcet	Galactosa Acetilada
GalNAc	N-Acetil-galactosamina
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-Acetil-glucosamina
Ig	Inmunoglobulina
Lac	Lactosa
Man	Manosa
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
nm	Nanómetros
NANA	Ácido N-Acetil Neuramínico

pH	Concentración de iones de hidrogeno
PM	Peso Molecular
PMA	Peso Molecular Aparente
PBS	Buffer de Fosfato Salino
Rib	Ribosa
Rf	Movilidad Relativa
ROS	Especies Reactivas de Oxigeno
rpm	Revoluciones por minuto
Sac	Sacarosa
sb	Sobrenadante
UHA	Unidades de Hemaglutinación
Xyl	Xilosa
μg	Microgramos
\bar{x}	Media Aritmética
σ	Desviación Estándar

RESUMEN

La chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) es usada como planta medicinal para tratar diversas enfermedades, también es considerada como complemento en la dieta debido a su alto poder nutritivo. La infusión de hojas contiene las siguientes propiedades farmacológicas reportadas: como antioxidante, hipoglucemiante, hipocolesteronémico y hepatoprotector se considera que los flavonoides presentes son los responsables de dichas actividades.

Este trabajo describe la purificación, caracterización bioquímica y antibacteriana de lectinas en la hoja de chaya.

Se comprobó la presencia de lectinas en la hoja mediante el ensayo de hemaglutinación en el extracto crudo utilizando los diferentes grupos sanguíneos humanos, la mayor actividad se obtuvo con el tipo sanguíneo humano A₁. El proceso de purificación se inició utilizando una precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Las lectinas presentes en los diferentes intervalos de concentración reconocen principalmente a los carbohidratos GalNAc >GlcNAc > Sac > Rib >NANA >Glycoconjugado. Presentan estabilidad con temperaturas de 4 a 80°C y pH de 5.2 a 6.8. El intervalo que presentó la mayor actividad específica y la mayor concentración de proteínas fue 20-40%(NH₄)₂SO₄ por lo que fue el que se utilizó para continuar con el proceso de purificación. Se realizaron cromatografías de exclusión molecular (con Sephadex G75 y Agarosa) con el que se purificó una lectina a la que se le denominó lectina de *Cnidoscolus chayamansa* (CchL). Esta lectina tiene un peso molecular aparente de 31,303 kDa y una actividad específica con A₁. Presenta afinidad para Galactosa. Con dependencia de cationes a Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ K⁺ y Na⁺. Se obtuvo un rendimiento final de lectina del 3.2%

Se observó que el extracto crudo (EC) de hoja de chaya tiene efecto antibacteriano contra *Escherichia coli* (ATCC 25922) CIM 0.34 mg/mL, *Pseudomonas aeruginosa* CIM 0.69 mg/mL, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), y *Salmonella typhimorium* ambas con una CIM de 2.7. La fracción proteica (FP) tiene un efecto antibacteriano contra todas las bacterias, teniendo una mayor afinidad para contra *Salmonella typhimorium* y contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ambas con una CIM de 0.34mg/mL. La actividad antibacteriana se conservó en el intervalo de concentración de 20-40%. La lectina purificada tiene actividad antibacteriana contra *Salmonella typhimorium* con una CIM 0.043 mg/mL.

El presente trabajo constituye el primer reporte a nivel mundial donde se reporta la identificación, purificación y caracterización de una lectina de chaya (*Cnidoscolus chayamansa*).

PALABRAS CLAVE: Chaya, *Cnidoscolus chayamansa*, lectinas, purificación, caracterización bioquímica, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

The Chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) is a domesticated leafy green vegetable that is used in traditional medicine to treat different ailments and also is considered like a food complement with high nutrients. The pharmaceutical analyses have detected that the leaf infusion has antioxidant, hypoglycemic, hypocholesterolemic properties and also as a liver protector all attributed to flavonoids.

This work describes the purification, biochemical and antibacterial characterization of a lectin from chaya leaves.

The crude leaf extract presents hemagglutinating activity using human blood types, indicating the presence of lectins. The highest activity was obtained when using human blood type A1. The purification process was initiated using ammonium sulfate precipitation. In the different intervals the lectins present have different carbohydrate affinities mainly to GalNAc >GlcNAc > Sac > Rib >NANA >Glycoconjugate. With thermal resistance in the range 4 – 80 °C, and stability from pH 5.2 to 6.8. The highest activity and protein concentration was present in the 20-40% (NH₄)₂SO₄ range so this was used to continue the purification using molecular exclusion chromatography. The pure lectin was named “*Cnidoscolus chayamansa* lectin (CchL)” it has an apparent molecular weight of 31,303 kDa. CchL has an affinity to Galactose with a cation dependency of Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ K⁺ and Na⁺. The recovery in the purification process was 3.2%.

The crude extract of chaya leaves has an antibacterial effect against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, the first with MIC of 0.34 mg/mL, *Pseudomonas aeruginosa* MIC 0.69 mg/mL, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), and *Salmonella typhimorium* both with a MIC of 2.7mg/mL. The protein fraction had an antibacterial effect against all the bacteria tested, particularly against *Salmonella typhimorium* and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) both with a MIC of 0.34mg/mL. The interval protein concentration of 20-40% has an antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* with MIC 0.29 and 0.072 mg/mL, respectively. The lectin CchL has an antibacterial effect against *Salmonella typhimorium* with a MIC of 0.043 mg/mL.

This work constitutes the first report of the purification and characterization of a lectin (CchL) from chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) leaves.

KEY WORDS: Chaya, *Cnidoscolus chayamansa*, lectins, purification, biochemical characterization, antibacterial activity.

I.- INTRODUCCION

1. Descripción de las plantas medicinales.

Las plantas medicinales han sido empleadas desde la antigüedad utilizando sus propiedades curativas como auxiliares en el tratamiento de diversos padecimientos que aquejan al ser humano. Su uso se ha conservado gracias a la tradición oral y escrita, de esta manera se pueden conocer y aprovechar las propiedades curativas de un sin número de plantas. A pesar del avance tecnológico para la creación de nuevos medicamentos, las plantas medicinales siguen siendo usadas sin perder su importancia ya que constituyen la base de medicamentos (Hoogester, 1994).

Algunos de los beneficios que las plantas medicinales nos dan son que al emplearlos como medicamentos alternativos son de bajo costo y como medicamento preventivo ayuda a disminuir la frecuencia de enfermedad. Es importante mencionar que su manejo terapéutico exige una cuidadosa administración tal como ocurre con los medicamentos farmacéuticos (Parra *et al.*, 2005; Quesada, 2008).

En particular, la chaya (*Cnidoscolus chayamansa*), es usada como planta medicinal para tratar diversas enfermedades, también es considerada como complemento en la dieta debido a su alto poder nutritivo (Ocampo y Balick, 2010). Sus nutrientes son dos o tres veces mayores que la mayoría de hortalizas de hoja verde proporcionando así macronutrientes esenciales y necesarios para la salud humana (Kuti y Torres, 1996).

Los arbustos de chaya, por sus características fisiológicas, son capaces de soportar sequia y su crecimiento es rápido. Debido a lo anterior, su aprovechamiento es en casi todas las épocas del año (Kuti y Torres, 1996).

2. DESCRIPCIÓN DE LA CHAYA (*Cnidoscolus chayamansa*)

La chaya es un vegetal de hoja verde conocido en las regiones tropicales. El nombre de *Chaya* proviene del maya *Chay*. Otros nombres con los que se puede identificarla son: *espinaca de árbol*, *col de hoja verde*, *kikilchay* y *chaykeken*.

La chaya es una planta altamente estudiada y consumida en México, América Central y en la población latina al sur de Texas y Florida, USA. El arbusto de chaya puede llegar a medir de 3 a 5 m, esta altura la hace pertenecer a la familia de las Euforbiáceas siendo muy similar en la morfología a *Cnidoscolus aconitifolius*, excepto en la forma de las hojas (Kuti y Kuti, 1999).

Las hojas de la chaya son lobuladas y gruesas, amplias y de color verde. Miden aproximadamente de 10-20 cm de largo, con peciolo carnudo. La chaya produce flores todo el año las cuales son pequeñas, blancas y están agrupadas en pequeños racimos (Kuti y Kuti, 1999).

El género *Cnidoscolus* comprende 40 o más especies, pero *chayamansa* solo pertenece a una variedad de chaya (Stephens, 2009). La especie que ha sido utilizada en este trabajo fue corroborada y tipificada por el departamento de herbolaria de la facultad de Biología perteneciente a la UMSNH (Anexo 1) la cual corresponde a la siguiente clasificación:

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

Subfamilia: Crotonoidae

Tribu: Manihoteae

Género: *Cnidoscolus*

Especie: *chayamansa*



(Fuente propia)

(Catalogue of life, 2010)

2.1 Usos en la Medicina Tradicional

En diferentes lugares esta especie de chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) es usada medicinalmente para el tratamiento de diversas enfermedades, como lo son: la diabetes, para bajar los niveles altos de colesterol, como hepatoprotector, contra diversas infecciones gastrointestinales y urinarias, obesidad, para el mejoramiento de la memoria, por su alto valor nutricional, también para la preparación de diferentes platillos, en la elaboración de pastas y como suplemento alimenticio para animales de crianza, así como por su alto poder antioxidante (Ocampo y Balick, 2010). Sus hojas y brotes conforman la alimentación básica de indígenas de la península de Yucatán (México) y de algunas otras comunidades indígenas de Kekchi en Alta Verapaz (Guatemala) (Kuti y Kuti, 1999).

Resaltando un poco en la historia el uso de la chaya, durante las exploraciones realizadas dentro de la información sobre plantas medicinales en México, un conocido

maestro de la ciencia Maya como lo fue José Díaz Boglio (1906-1998) mencionaba en uno de sus escritos dedicado a la chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) que al ser combinaba con maíz y semillas de calabaza daba lugar a un alimento excepcional capaz de asegurar la subsistencia del ser humano durante largo tiempo. (Fernández, 2009). Lo anterior demuestra que el uso de esta planta ha sido documentado desde las épocas prehispánicas y que en la actualidad es empleada en la elaboración de platillos típicos, en su mayoría, en la región de la península de Yucatán, México. Entre los platillos que se destacan están los tamales envueltos en hoja de chaya y los mezclados con ella (Almazara, 2008). También la combinan con pipián, con pepita molida y limón, con huevo, frita con tomate y cebolla. A parte, se elaboran también bebidas mezcladas con frutas de temporada. Todo lo anterior da origen a recetas deliciosas que son caracterizadas como comida típica de esta región (Art. En línea en: chinessa.blogspot.com, 2009).

2.2 Compuestos activos

Se ha estudiado y analizado que las plantas y organismos animales ofrecen una amplia diversidad de componentes, los cuales pueden servir como fármacos. A su vez, se pueden revelar nuevos mecanismos de acción que ayudan en el control de enfermedades, como por ejemplo, en el caso de infecciones, para ayudar a disminuir la aparición de cáncer, entre otros usos.

Se sabe también que los principios activos son sustancias que se encuentran en distintas partes u órganos de las plantas y que alteran el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal. Durante la investigación científica de las plantas se ha demostrado que una gran gama de principios activos tienen dichos efectos, entre los cuales los más importantes, desde el punto de vista de la salud, son los aceites esenciales, los alcaloides, los glucósidos o heterósidos, los mucilagos y gomas, los taninos y lectinas. Por otro lado, existen en las plantas también otros principios activos relevantes denominados nutrientes esenciales, entre los que se encuentran las vitaminas, minerales, aminoácidos, proteínas, carbohidratos y fibras, diversos

azúcares, ácidos orgánicos, lípidos y compuestos con función antibiótica (En línea: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal.com>).

Los principios activos se clasifican según su estructura química, y a su vez, se pueden agrupar en productos que resultan del metabolismo primario y los que resultan del metabolismo secundario.

- Productos resultantes del metabolismo primario: resultan de los procesos químicos que intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción, dando como resultado a glúcidos, lípidos, derivados de aminoácidos y proteínas (lectinas).
- Productos derivados del metabolismo secundario: estos compuestos no son esenciales para el metabolismo. Son sintetizados como compuestos para defensa, adaptación, etc., y son los más importantes como principios activos, entre los cuales están los terpenoides, alcaloides, polifenoles, heterósidos, entre otros (Ramawat, 2009; En línea: <http://ocw.upm.es>).

En el caso de la chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) se han aislado flavonoides a los cuales son atribuidas las propiedades medicinales. Entre los estudiados se encuentran el ácido gálico (71.3 ± 1.7 mg equivalentes/g de extracto seco) y (+)-catequina (42.7 ± 3.7 mg equivalentes/g de extracto seco) los cuales fueron obtenidos del total de fenoles y flavonoides respectivamente. También se ha reportado que la chaya contiene 1.2 ± 0.02 μ g y 0.7 ± 0.28 μ g de ácido clorogénico equivalente/g de peso fresco y 67.1 ± 5.4 μ g y 58.3 ± 5.8 μ g de flavonol (kaemferol y quercentina)/g de peso fresco, esto evaluado en hoja de chaya cruda y cocinada respectivamente. Además, presenta ácido protocatético en concentraciones de 0.242 ± 0.001 mg/g y rutina en concentraciones 2.00 ± 0.097 mg/g. Algunos de estos compuestos también están presentes en otras plantas, lo que permite estudiar tanto sus usos como sus efectos (Loarca-Piña *et al.*, 2010; Kuti y Konoru, 2004; González *et al.*, 2003).

Por otro lado, al estudiar los componentes de la chaya también se han encontrado compuestos tóxicos como los glucósidos cianhídricos, los cuales son parte de la composición química de la planta. Se sabe que estos glucósidos cianogénicos sufren hidrólisis dando origen al ácido cianhídrico (HCN). Este ácido se produce cuando las hojas de la planta han sufrido algún daño, liberándose e hidrolizándose para crear una especie de protección ante el daño sufrido. Sin embargo, en un estudio realizado por Torrico *et al.*, sobre el efecto tóxico que presenta la ingesta de chaya, se calculó la dosis letal media ($DL_{50} = 140 \text{ mg/ kg de hoja}$) al emplear diferentes preparados de la chaya, sugiriendo así que se necesitan altas dosis para observar un efecto visiblemente tóxico en el organismo (Torrico *et al.*, 2003). Debido a lo anterior, antes de consumir las hojas de chaya se recomienda hervirlas de 5 a 10 minutos, después este tiempo los glucósidos cianhídricos se volatilizan haciendo segura la chaya para su consumo (Berkelaar, 2006). Estos glucósidos cianhídricos también son encontrados en muchos vegetales como frijoles, yuca y otros vegetales de hoja verde (Kuti y Torres, 1996).

2.3 Valor Nutricional

Dada la facilidad para cultivarla su productividad potencial y sobre todo su valor nutritivo, se ha propuesto a la chaya como un vegetal con propiedades nutricionales importantes.

Se han realizado evaluaciones donde es comparada con la espinaca y otros vegetales de hoja verde. Al realizar los análisis bromatológicos correspondientes se ha encontrado que por cada 100 g de hoja fresca de chaya existe un alto contenido de proteína (8.25 mg), hierro (11.4 mg), fósforo (63.0 mg), calcio (199.4 mg), magnesio (90.0 mg), potasio (277 mg). Contiene también carbohidratos (7.23 mg), grasa (0.4 mg) y fibra (2.1mg). Así mismo, se ha evaluado el contenido de vitamina C (350.83 mg), rivotravina (0.17 mg), tiamina (0.18 mg) y β -carotenos (0.085 mg), y los ácidos grasos entre los que se encuentran el palmítico (1.4 mg), esteárico (0.7 mg), oleico (1.5 mg) y linoleico (2.0 mg). En contraste con la alta cantidad de proteína encontrada en la chaya,

se han cuantificado importantes cantidades de aminoácidos esenciales para la nutrición humana entre los que destacan isoleucina (1.4 mg), leucina (3.2 mg), lisina (2.0 mg), metionina (1.6 mg) (Palos-Suárez *et al.*, 2007; Kuti y Kuti, 1999).

Algunas de las útiles aplicaciones de importancia de la chaya es la de su uso en la industria alimenticia. Por un lado, Arnaud y Lorenz (1999) se dieron a la tarea de elaborar una pasta con características nutricionales mejores que las de la pasta normal, esto debido a que es muy consumida, sin embargo su valor nutritivo no es el suficiente. Al complementar la harina para elaborar esta pasta con preparados de harina-chaya incrementaron su poder nutricional dando como resultado una pasta altamente enriquecida con vitaminas, minerales, proteínas y calcio (Arnaud y Loren, 1999). Por otro lado, se han realizado estudios sobre el complementar con chaya las fórmulas alimenticias empleadas en animales de consumo humano como lo son las aves en los que se observó un aumento de peso, de producción y una disminución en el tiempo de crianza. (Aguilar *et al.*, 2000) y el pescado (tilapia) en los que se obtuvo una mejor reproducción y aumento del número de especies (Poot y Gasca, 2005).

2.4 Efectos Farmacológicos

El desarrollo de la medicina y de la química así como el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánica dieron lugar al aislamiento y síntesis de compuestos para la producción de medicamentos. El poder estudiar los efectos fisiológicos y farmacológicos que estos producían ha permitido realizar ensayos en organismos vivos (*in vivo*) y a nivel laboratorio (*in vitro*) donde se han probado diversos medicamentos diseñados a partir de plantas medicinales. Durante algunas observaciones se descubrió que diferentes medicamentos eran poco eficaces y que estos podían producir intoxicaciones e intolerancias, cosa que no ocurría en comparación con la utilización de la planta entera (Vidal, 2003). En fechas recientes la investigación sobre el potencial farmacológico que tienen este tipo de plantas ha ido incrementándose y con ello su uso frecuente, lo anterior con el fin de mejorar la condición de la salud humana (Dahanukar *et al.*, 2000).

Sin embargo, no hay que olvidar que los remedios a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que no se lleguen a acumular en el organismo y que sus efectos indeseables sean menos marcados, por lo que al ir avanzando con estas investigaciones se plantea que algunas plantas medicinales son realmente eficaces para ciertos tratamientos (Vidal, 2003).

Hablando específicamente del uso popular que se le da a la chaya, se ve evidenciado en un estudio realizado por Bautista y colaboradores (2011) en la ciudad de Oaxaca, donde se ha constatado que la chaya es utilizada para tratar diversas afecciones como diabetes, colesterol alto, hepatoprotector, desordenes renales, presión alta, obesidad, infecciones gastrointestinales y urinarias, inflamación de brazos y piernas, como antioxidante natural, para mejorar la memoria y disminuir el insomnio (Bautista *et al.*, 2011; Awoyinka *et al.*, 2007).

- **Actividad Antioxidante**

Las sustancias antioxidantes son aquellas que están presentes en el organismo humano en bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (e.g, biomoléculas) y que a su vez retardan o previenen la oxidación de dicho sustrato. Estas sustancias van a prevenir la formación de radicales libres en cantidades perjudiciales por lo que son estimulados algunos de los mecanismos de reparación endógena que actúan en contra del daño causado por el ataque de dichos radicales (Sen *et al.*, 2010).

Los radicales libres son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado haciéndolos altamente reactivos. Se generan mediante reacciones redox (de óxido-reducción) incluyendo a los siguientes radicales: óxido nítrico (NO•), oxígeno siglete (O₂•), superóxido (O₂⁻•), hidróxilo (HO•), peróxido de hidrógeno (genera OH•), ácido hipocloroso (HOCl), peroxilo (ROO•) y peroxhidrilo (HOO•) (Sen *et al.*, 2010).

Algunos de los factores que intervienen en la producción de estos radicales en el organismo son en general la exposición prolongada a los rayos UV, al humo del cigarro y contaminación ambiental, a las radiaciones X, gamma, por mencionar algunas. También son producidos por reacciones en cadena durante el metabolismo celular (e.g, la oxidación de fosfolípidos de la membrana celular), el consumo de ciertos agentes farmacológicos y toxicológicos (generalmente relacionados con los tratamientos de patologías cancerosas), pesticidas e insecticidas. Estos radicales son altamente inestables en nuestro organismo se generan unos 10,000 radicales libres/ día. La alta concentración de estos radicales (mejor conocidos como ROS) pueden ser importantes mediadores de daño en la estructura celular, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (Sen *et al.*, 2010).

Algunas de las consecuencias que los ROS generan en el organismo humano son la falta de regulación en el crecimiento celular, la inactivación de los mecanismos de defensa (mecanismos inmunológicos), la pérdida o disminución de los procesos de traducción de señales entre diversos sistemas biológicos. Lo anterior se traduce en la aparición de enfermedades de importancia clínica como en el caso de Diabetes Mellitus (1 y 2), envejecimiento, cáncer, enfermedades respiratorias, infecciones, enfermedad de Alzheimer, hepatopatías, artritis reumatoidea, SIDA, entre muchas otras (Sen *et al.*, 2010; Lolito *et al.*, 2006).

Sin embargo, las moléculas antioxidantes son capaces de neutralizar estos ROS donando uno de sus electrones previniendo así daño celular. Entre los antioxidantes más conocidos están las enzimas endógenas antioxidantes, proteínas unidas a un ion metálico, pero haremos mayor énfasis en los nutrientes antioxidantes entre los cuales se encuentran los fito-contituyentes (Sen *et al.*, 2010).

Para tal caso, en la chaya se ha visto que presenta un alto contenido de antioxidantes entre los que destacan los β -carotenos y la vitamina C (Bautista *et al.*, 2011). En un estudio realizado por Palos y colaboradores (2007), a ratas con diabetes inducida químicamente se les administró extractos de chaya en diferentes concentraciones, midiéndose después la capacidad antioxidante en base a la competencia en una reacción donde el donador de radicales libres peróxido (ROO^*) es

inhibido por un antioxidante, el cual puede ser vitamina C o carotenoides (Palos *et al.*, 2007).

- **Actividad Hipoglucemiante**

La diabetes es un proceso crónico-degenerativo que es posible controlar con los tratamientos que actualmente están disponibles. El tratamiento para la diabetes tiene como objetivo principal disminuir la hiperglicemia, aunque el mecanismo a través del cual ejerce su acción es muy variado y depende de la naturaleza química del componente empleado (Palos *et al.*, 2007). Existen numerosas especies vegetales con actividad hipoglucemiante y algunas de ellas están siendo estudiadas con el fin de encontrar tratamientos menos costosos y más efectivos para reducir los niveles altos de glucosa circulante (Loarca-Piña *et al.*, 2010).

La chaya popularmente se emplea como auxiliar en el tratamiento de Diabetes Mellitus. Para observar dicho efecto en un estudio realizado por Figueroa *et al.*, (2009) se demostró en un modelo de ratas macho Wistar a las cuales se les indujo diabetes químicamente, se les administró el extracto de chaya en dosis que van de 0.5 a 1.5 mg/kg, esta administración fue por vía intragástrica durante 30 días demostrando así que los niveles de glucosa se reducían significativamente (Figueroa *et al.*, 2006).

Haciendo referencia a lo anterior se conoce el efecto de uno de los componentes presente en la chaya, como lo es la quercentina. Se sabe que este compuesto es un eficaz inhibidor de los receptores para insulina, mediante la cual la enzima “cinasa de tirosina” cataliza al azar un co-polímero de ácido glutámico-tirosina, mientras que la insulina estimula la autofosforilación del propio receptor. En adipocitos de rata, la quercentina inhibe el transporte de glucosa, la oxidación y la incorporación de lípidos (Shisheva y Shechter, 1992). Con respecto a la alteración de los sistemas de transporte de membrana. Vale la pena señalar que el transporte de hexosa en una línea diploide de fibroblastos humanos fue inhibida por la quercentina (Salter *et al.*, 1978).

- **Actividad Hipocolesterolémica**

La hipercolesterolemia se asocia a un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular precoz y queda definida por valores de colesterol total y colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (cLDL) superiores a los 200 mg/dL y superior a 130 mg/dL respectivamente (López *et al.*, 2009).

En el estudio realizado por Miranda-Velásquez *et al.* (2010) también se ha estudiado el efecto hipocolesterolémico que presenta la chaya. Se demostró que en ratones Balb/c (25-28 g de peso) que fueron sometidos *ad libitum* a una dieta alta en colesterol por 5 días y a los cuales se les administró extractos de hoja de chaya que fueron disueltos en agua y administrados por medio de un tubo gástrico en dosis de 50 hasta 100 mg/kg una vez por día durante un tiempo establecido. En los resultados obtenidos se demostró una disminución significativa en los niveles de colesterol (de 50-60% a 27.9-31.31 %) $p < 0.01$ comparado con un grupo control (Miranda *et al.*, 2010).

- **Efecto Hepatoprotector**

Recientemente el uso de plantas medicinales para curar en varias formas algunas enfermedades hepáticas y disfunciones del hígado se ha ido incrementado popularmente. Algunos de los daños producidos que alteran el buen funcionamiento hepático son causados por el consumo excesivo de alcohol, paracetamol y agentes quimioterapéuticos, entre otros.

La chaya ha demostrado tener efecto hepatoprotector. En el estudio realizado por Oyagbemi y Odetola (2010) en un modelo en ratas a las cuales se le administraron dosis de paracetamol (3 g/kg) por medio de un tubo gástrico solo los días 8 y 9, recibieron con anterioridad un pre-tratamiento con extractos de chaya en dosis de 100, 500 y 1000 mg/kg respectivamente durante 7 días. Durante los resultados obtenidos se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) de las enzimas pancreáticas 48 h después de la administración y la intoxicación por paracetamol, en comparación con el grupo

control. Sin embargo, a los animales que fueron pre-tratados con extractos de hojas de chaya mostraron niveles bajos de estas enzimas (Oyagbemi y Odelota, 2010).

3. LECTINAS

3.1. Definición

Las lectinas fueron descubiertas hace 100 años en las plantas, actualmente se sabe que están presentes en toda la naturaleza (Varki *et al.*, 2009). El término lectina fue propuesto por Boyd en 1954 y proviene etimológicamente de la palabra latina *legere* que significa “elegir” surgiendo como consecuencia de la propiedad que tienen estas moléculas para aglutinar eritrocitos de determinado grupo sanguíneo (Elola *et al.*, 1995). Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que tienen la capacidad de enlazarse y reconocer carbohidratos de manera específica y reversible, no son enzimas ni anticuerpos (Barondes, 1981). La primera lectina extremadamente toxica estudiada y aislada de las semillas de ricino (concaivalina A) fue descubierta por Stillmarck en 1888. En la actualidad se han identificado cientos de lectinas, de orígenes no inmunitarios y ubicuos en toda la escala evolutiva (Gallego del Sol *et al.*, 2006).

3.2. Descripción general

Basándose en el conocimiento de la secuencia de aminoácidos que presentan las lectinas, Drickamer en 1988, propuso que el reconocimiento a estos carbohidratos se debe a un segmento limitado de polipéptidos, el cual fue posteriormente designado como el dominio de reconocimiento a carbohidratos o CRD por sus siglas en inglés (Sharon y Lis, 2004). Las lectinas presentan por lo menos dos sitios o dominios de reconocimiento a carbohidrato (CRD) llevándose a cabo por medio de enlaces tipo puentes de hidrogeno, enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas, siendo esta una de sus principales características (Hernández *et al.*, 2005).

Las lectinas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, desde microorganismos, hongos, animales hasta plantas dentro de las cuales pueden tener diferentes funciones entre las que destacan la regulación fisiológica, defensa mecánica contra el ataque de microorganismos, almacenamiento de proteínas, transporte de carbohidratos, estimulación mitogénica, reconocimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium*, entre muchas más (Gallegos del Sol *et al.*, 2006; Castillo *et al.*, 2005).

Su importancia se debe fundamentalmente a sus propiedades biológicas, siendo la principal la interacción con grupos sanguíneos específicos. También aglutinan diferentes células como linfocitos, eritrocitos, espermatozoides, plaquetas, bacterias y células tumorales, y son clave importante en la inducción de la mitosis en el linfocito y algunas presentan efectos citotóxicos sobre estos (Castillo *et al.*, 2005).

Por mucho tiempo estas proteínas fueron conocidas como “fitohemaglutininas” ya que fueron descubiertas en las plantas. Para 1936, James B. Summer caracterizó mejor la lectina de *Canavalia* (Con A) reportando los polisacáridos y glicoproteínas que la Con A precipitaba y que además esta precipitación se veía inhibida por manosa y glucosa. Summer sugirió que estas reacciones eran consecuencia de la interacción que tenía la lectina con los carbohidratos de la superficie del eritrocito. De hecho, la prueba de inhibición de la hemaglutinación o la precipitación de polisacáridos con el panel de carbohidratos todavía es un ensayo que sirve para establecer la especificidad de una lectina (Sharon y Lis, 2001).

Debido a las propiedades específicas las lectinas son utilizadas como herramientas en la bioquímica, biología celular, inmunología, genética y biomedicina, esto con propósitos analíticos y preparativos, así como para el diagnóstico y terapia en el cáncer (Castillo *et al.*, 2005).

Las lectinas son a menudo clasificadas de acuerdo a la especificidad de un carbohidrato.

3.3 Clasificación

Las lectinas son a menudo clasificadas de acuerdo a la especificidad a un carbohidrato. Otra clasificación es en base a la familia a la que pertenece, a su función y su estructura, siendo esta última la característica determinante para su verdadera clasificación. Algunas lectinas están dentro de las siguientes clases: (a) simples, (b) de mosaico (o multidominio) y (c) de ensamblajes macromoleculares. Y, a su vez, en cada una se agrupan familias con secuencias y propiedades estructurales similares (Sharon y Lis, 1998).

3.4 Funciones

Las lectinas estudiadas hasta el momento han sido un importante foco de atención, ya que se sabe que realizan un reconocimiento determinante en diversos procesos biológicos. Las glicoproteínas están incluidas en un espacio dentro del sistema circulatorio y controlan el tráfico celular de las mismas, la adhesión de agentes infecciosos a células blanco, el reclutamiento de leucocitos en sitios de inflamación, así como la interacción celular con el sistema inmune durante un cáncer maligno o una metástasis. La base del reconocimiento de las lectinas es la forma de interacción entre las moléculas y sus estructuras complementarias, en este caso, la combinación de un sitio de reconocimiento (CRD) de la lectina y un carbohidrato (a menudo referido como lectina-ligando) en la superficie celular de interacción, o entre una célula y una molécula en solución. Estos procesos son análogos a los que existen entre una enzima y su sustrato (o inhibidor) y entre un anticuerpo y el antígeno. Además, pueden ser bloqueados por azúcares apropiados, no solo *in vitro* sino también *in vivo*. Esta inhibición es la base de los intentos actuales para el desarrollo de nuevas terapias en contra de infecciones microbianas, inflamaciones u otras enfermedades (Sharon y Lis, 2004; 2001).

3.5 Tipos de lectinas

LECTINAS DE PLANTAS

Las plantas continúan siendo la más rica fuente de lectinas con muchas de ellas ya estudiadas. Algunas son aisladas de las semillas pero también se han obtenido de diversos tejidos vegetales como las hojas, tallos, cortezas, raíces y frutos. Al ser aisladas de un solo tipo de tejido pueden corresponder a una sola familia con estructura similar, pero cabe mencionar que las especificidades pueden ser diferentes (Sharon y Lis, 2001).

La primera lectina obtenida en forma cristalina fue la concavalina A (Con A) del frijol de *Canavalia ensiformis*. A partir de este descubrimiento se han detectado en diferentes estudios que, en las plantas, las lectinas están contenidas en su mayoría en los cotiledones y endospermos de las semillas y que constituyen del 2 al 10% del total de las proteínas (Hernández *et al.*, 1999). Las aisladas a partir de plantas tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos de un gran número de animales, casi con la misma intensidad, pero con el paso del tiempo y el avance de estudios sobre las lectinas los investigadores han realizado ensayos en los que se inhibiera esta hemaglutinación utilizando azúcares simples, demostrando así que algunos de estos resultaron eficaces debido a su configuración estereoquímica (Elola y Fink, 1994).

Boyd (1954) fue el primer investigador que descubrió la propiedad de hemaglutinación de las lectinas de plantas. Al inicio de esta demostración se encontró que los extractos de las semillas de *Phaseolus limensis* aglutinaban eritrocitos humanos de los grupos sanguíneos A y B únicamente. A partir de ese momento se efectuaron numerosos estudios en plantas, hallándose aglutininas de diversas especificidades frente a los hematíes humanos (Elola y Fink, 1994). Una gran variedad de ellas han sido aisladas y caracterizadas a detalle respecto a su capacidad específica que tienen al reconocer a carbohidratos, a su estructura molecular y sus propiedades bioquímicas. Las lectinas de diferentes especies de plantas, se ha visto, se diferencian

en su estructura y afinidad, siendo esta última la determinante para poder asilarla de manera artificial (*in vitro*) (Elola y Fink, 1994). Estas lectinas tienen diversas funciones entre las que destaca su participación en interacciones entre las bacterias fijadoras de nitrógeno con la raíz de plantas de leguminosas, además que poseen actividad mitogénica y pueden tener efectos protectores en contra de la acción patogénica de ciertos microorganismos (Hernández *et al.*, 2005).

Las lectinas vegetales se caracterizan por reconocer carbohidratos por enlaces tipo puente de hidrógeno, iones, interacciones hidrofóbicas, entre otras. Estructuralmente existen características comunes entre las lectinas de una familia determinada, lo que ha permitido el estudio de la interacción lectina-carbohidrato. Suelen clasificarse de diferente manera y un ejemplo de esta clasificación se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1. Ejemplo de clasificación de lectinas vegetales.

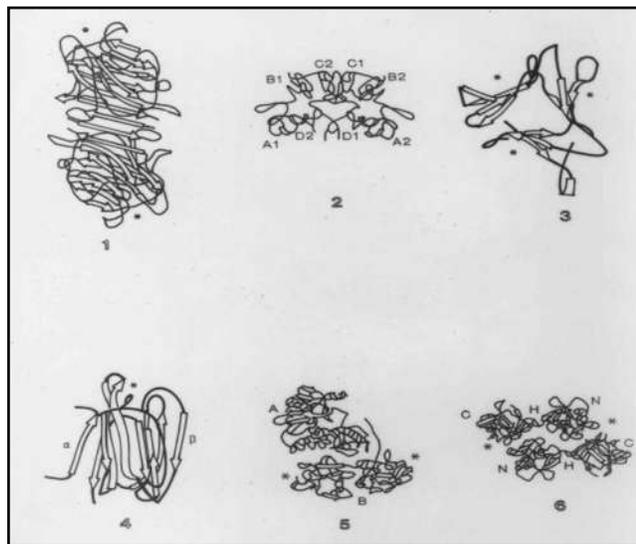
Lectinas vegetales utilizadas para el estudio de glicoproteínas y su clasificación según su especificidad hacia monosacáridos		
MONOSACARIDO	LECTINA	ABREVIATURA
α -D-manosa, α -D-glucosa	<i>Canavalia ensiformis</i> .	ConA
	<i>Lens culinaris</i> .	LCA
β -galactosa, N-acetil- α -D-galactosamina	<i>Ricinus communis</i>	RCA
	<i>Glycine max</i>	SBA
	<i>Arachis hypogaea</i>	PNA
	<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL
N-acetil- β -D-glucosamina	<i>Triticum vulgare</i> .	WGA
α -D-fucosa	<i>Lotus tetragonolobus</i> .	LTA
	<i>Ulex europeus</i> .	UEA
α -N-acetilneuramínico	<i>Limulus polyphemus</i> .	LPA

Hernández Cruz y cols. REB (1): 21-27, 2005.

Donde se encuentran las lectinas que reconocen a N-glicanos (oligosacáridos unidos a un residuo de asparagina en las proteínas mediante una N-acetilglucosamina) y lectinas que reconocen O-glicanos (oligosacáridos unidos a un residuo

de serina o treonina en las proteínas mediante N-acetil-galactosamina (Hernández *et al.*, 2005).

Actualmente debido a la gran cantidad de datos cristalográficos de lectinas vegetales se ha propuesto una nueva clasificación de estas lectinas en base a su estructura molecular como se ve en la siguiente figura:



Hernández Cruz *et al.*, REB (1): 21-27, 2005.

Figura 1. Diferentes estructuras de lectinas de plantas.

De acuerdo con lo anterior, a continuación se describe cada uno de los tipos de lectinas vegetales:

- **Lectinas aisladas de leguminosas.**

Esta familia de lectinas vegetales es la más estudiada, generalmente se encuentran constituidas por dos o cuatro subunidades idénticas de 25 a 30 kDa. Cada subunidad contiene un sitio de unión para los iones metálicos Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} . Una de las subunidades es homologa a las demás y contiene 250 aminoácidos y se constituye por

doce hojas β que forman parte del sitio de reconocimiento a carbohidratos (Hernández *et al.*, 2005).

- **Lectinas con dominio tipo heveína o específicas de quitina.**

Generalmente presentan dos tipos de subunidades idénticas ricas en cisteínas. Una sola subunidad está constituida por cuatro dominios tipo heveína y presentan cuatro enlaces disulfuro. Cada dominio representa un sitio de reconocimiento a carbohidratos sin la necesidad de un ion metálico (Hernández, *et al.*, 2005).

- **Lectinas aisladas de monocotiledoneas específicas de manosa.**

A este grupo pertenecen las de orquídeas, ajo y amarilis, con secuencias de aminoácidos altamente conservadas. Son tetraméricas, donde cada monómero tiene un peso molecular de 12 kDa. El sitio de reconocimiento a carbohidrato está constituido por cuatro hojas α antiparelelas unidas entre sí por giros. El conjunto se asocia de manera que forma una corona aplanada dejando aparecer un gran túnel central (Hernández *et al.*, 2005).

- **Lectinas en forma de prisma β o del tipo jacalina.**

Estas presentan estructuras tridimensionales muy similares a la lectina de *Artocarpus integrifolia* (jacalina). Son tetraméricas y están glicosiladas. Cada subunidad contiene una cadena pesada α y una ligera β (Hernández, *et al.*, 2005).

- **Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas.**

Estas proteínas forman parte de los venenos más tóxicos. Su estructura molecular es compleja y están constituidas por dos cadenas diferentes (A y B) unidas por puentes disulfuro. La cadena A es responsable de la toxicidad (actividad de la N-glicosidasa sobre el ribosoma que inactiva la traducción) y la cadena B (posee actividad de lectina presentando 4 subunidades) (Hernández, *et al.*, 2005).

- **Lectinas tipo amaranto.**

Esta proviene de diferentes especies de amaranto. Cada proteína está formada por dos monómeros en los que se encuentran dos dominios (N y C) estos unidos por una pequeña hélice (Hernández, *et al.*, 2005).

Por el contrario, la presencia de al menos un dominio no catalítico que se una reversible y específicamente a carbohidratos es solo un prerequisite para incluir a lectinas vegetales dentro de las lectinas que reconocen a glicoconjugados promoviendo así la precipitación celular (e. g., la hemaglutinación). Por lo que basado en lo anterior, se pueden incluir en tres grandes grupos a los que algunas lectinas pertenecen:

a) Merolectinas.

Son proteínas que se constituyen exclusivamente de un solo dominio para carbohidratos. Son pequeñas proteínas con una única cadena polipeptídica, que debido a su naturaleza, pueden ser monovalentes e incapaces de precipitar glicoconjugados o aglutinar células. Algunos ejemplos son las de tipo heveína y los monómeros de unión a manosa (Pneumans *et al.*, 1995).

b) Hololectinas

Son proteínas constituidas con dominios de unión a carbohidratos y a su vez contienen dos o más dominios, ya sea idénticos u homólogos. Este grupo se compara con todas las lectinas que presentan múltiples sitios de unión, y por ende, aglutinan y precipitan células. La mayoría de las lectinas estudiadas de plantas son de este tipo, ya que todas tienen las propiedades de “hemaglutininas” (Pneumans *et al.*, 1995).

c) Quimerolectinas.

Son proteínas fusionadas a un dominio de unión a carbohidrato dispuestos en tándem cubiertos por un dominio no establecido, el cual tiene una actividad catalítica bien definida (que es otra actividad biológica) que actúa independientemente de el dominio de unión a carbohidratos. Dependiendo de los sitios de unión que presente, su comportamiento puede ser como merolectinas u hololectinas (Pneumans *et al.*, 1995).

LECTINAS ANIMALES

Las lectinas animales fueron clasificadas de acuerdo a los tipos de carbohidratos que son capaces de reconocer. Al estudiar más detalladamente fueron clasificadas en base a las secuencias altamente conservadas de aminoácidos encontrados en los dominios donde las lectinas reconocerán a los carbohidratos, dentro de las cuales se encuentran solo dos grupos de lectinas. El primero corresponden a las que requiere Ca^{++} para presentar actividad (lectinas de tipo C) y el segundo corresponde a las lectinas que tienen grupos tioles libres y los requieren para ser estables (lectinas del tipo S) (Drickamer, 1988).

- **Lectinas animales tipo C**

Estas lectinas animales se caracterizan por ser una de las más grandes familias, son dependientes de iones como el Ca^{++} y esta familia se compone por subfamilias entre las que se encuentran las colectinas, selectinas, receptores endocíticos y proteoglicanos, y que entre ellas comparten una homología conservada en su sitio de reconocimiento a carbohidrato presentando aproximadamente de 115-130 aminoácidos. Algunas de estas proteínas son secretadas y algunas otras son parte de las membranas (Varki *et al.*, 2009; Sharon y Lis, 2001).

A su vez, las lectinas de animales tipo **C** se pueden clasificar en dos grandes grupos según su función: las que reconocen ligandos endógenos y las que reconocen ligandos exógenos (Drickamer, 1988).

- **Lectinas que reconocen ligandos endógenos**

Son receptores anclados a membranas con diferentes especificidades. Se ha observado en animales que el receptor de asialoglicoproteínas (en células hepáticas) es específico para Gal (Galactosa) y GalNAc (N-acetilgalactosamina), y participan en el recambio de glicoproteínas con complejas unidades de oligosacáridos. En este mismo grupo, en la superficie de los macrófagos se encuentra un receptor endocítico que participa en la defensa antimicrobiana estimulada por organismos infecciosos. Estos contienen manosa en su superficie y de esta manera son reconocidos y destruidos por los macrófagos mediante fagocitosis, este proceso es mediado por lectinas. Este tipo de defensa que no necesita de anticuerpos para agentes infecciosos se conoce como inmunidad innata.

Otro tipo de lectinas pertenecientes a este grupo, son las **Colectinas** que reconocen a carbohidratos localizados en patógenos invasores. La unión a microorganismos provoca su aglutinación aumentando su eliminación sin la participación de anticuerpos formando trímeros que se pueden unir en grandes oligómeros. Cada cadena polipeptídica de colectina contiene cuatro regiones: una pequeña en la región N-terminal, una región similar a colágeno, una región alfa-hélice super enrollada y una región para la unión a carbohidrato, y que pueden o no presentar varios sitios de reconocimiento a carbohidratos (CRD) en forma de ramillete (Varki *et al.*, 2009; Sharon y Lis 2001; Drickamer, 1988).

- **Selectinas**

También pertenecen a las lectinas tipo **C**. Son una familia de las moléculas de adhesión celular y representante importante de las lectinas que participan en el reconocimiento entre células, reconociendo a antígenos endógenos. Regulan la

adhesión de leucocitos en circulación a células endoteliales de vasos sanguíneos para posteriormente efectuar el proceso de extravasación o diapedesis, realizados en procesos de infección o inflamación. Existen tres tipos de selectinas: L (en leucocitos), P (en plaquetas) y E (en endotelio) (Sharon y Lis, 2001).

- **Galectinas**

Se unen típicamente a β -galactósidos aislados o en glicoconjugados y comparten homología estructural primaria en sus dominios de unión a carbohidratos (CRD). Se les conoce como galectinas o **lectinas tipo S**. Representan un grupo de proteínas que constituyen la clase mayormente expresada de lectinas en todos los organismos. Son una familia de proteínas extremadamente conservadas a través de la evolución. No dependen de iones y se encuentran en forma de monómeros y algunas en dímeros no covalentes con masas moleculares de 14 kDa y aproximadamente 130 aminoácidos. La mayoría son intracelulares y su estructura tridimensional es semejante a las de las leguminosas. Se han relacionado con un amplio espectro de eventos biológicos jugando un papel principal en procesos relacionados con la regulación de la respuesta inmune (Varki *et al.*, 2001)

- **Lectinas animales tipo R**

Estas lectinas contienen un dominio de reconocimiento a carbohidratos (CRD) que es estructuralmente igual al de la ricina. Además de ser parte de animales, están presentes en bacterias y en las plantas contienen por separado una subunidad que potencialmente toxica (Varki *et al.*, 2009).

- **Lectinas de microorganismos**

Muchos microorganismos aprovechan los glicanos y receptores de la superficie celular para atacar y colonizar un tejido. Un gran número de especies patógenas dependen de esta interacción para llevar a cabo una infección. Sharon y colaboradores

(1991) describieron la primer lectina en una superficie bacteriana en los 70's. Esta lectina tiene una actividad hemaglutinante, pero su función primaria es facilitar la unión y adherencia de la bacteria a la célula huésped, un pre requisito para la colonización bacteriana e infección.

En algunas bacterias, virus y parásitos se ha encontrado que poseen componentes proteínicos llamados "adhesinas" en sus superficies, y que se unen estereoquímicamente de forma específica para complementar moléculas, o "receptores" en la superficie del tejido. Estas adhesinas son lectinas y se unen al azúcar receptor, pero algunas lectinas se unen a proteínas receptoras (Gibbons, 1989). Todas las toxinas son capaces de intoxicar células interfiriendo directamente con la membrana citoplasmática o usando sistemas en la membrana para ganar el acceso al interior de la célula para deliberadamente activar los receptores (Rádis *et al.*, 2008). 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 (Varki *et al.*, 2009).

3.6 Actividad antibacteriana de las lectinas.

Las bacterias contienen lectinas que les permiten reconocer a su célula blanco. Por ejemplo; se pueden asociar a células de tejido (humano) causando infección como es el caso de *Escherichia coli*, que tiene preferencia por los sitios de reconocimiento que presentan D-galactosa, causando con esto diversos síntomas como son diarrea y vómito. Estas lectinas se localizan en la superficie celular o en los pilis o fimbrias (Facinelli *et al.*, 1994; Hart, 1980).

- **Descripción de diferentes lectinas con actividad antibacteriana**

La primera línea de defensa contra los microorganismos corresponde a la inmunidad innata, seguida por una respuesta inmune adaptiva que es asociada a la

activación de las células T y B, y que posteriormente son dirigidos contra agentes específicos. En el tracto respiratorio, el sistema de defensa innata del huésped se complementa con otros mecanismos para proteger las vías respiratorias, que es el primer lugar donde existe una interacción con microorganismos. Los componentes del líquido y de la superficie de las vías respiratorias contienen péptidos con actividad antimicrobiana (lectinas). El primer péptido antimicrobiano identificado en las vías respiratorias lo descubrió Alexander Fleming, y lo llamo lisozima (Rivas *et al.*, 2006). Algunos de estos péptidos son moléculas catiónicas, con un espacio hidrofóbico separado de regiones cargadas. Estas estructuras son las señas de identidad y son importantes para proponer mecanismos de acción (Bals, 2000).

Estos péptidos son secretados por macrófagos y neutrófilos y pueden ser clasificados en base a su estructura conformacional y la posición de su puente disulfuro (Rivas *et al.*, 2006). También son expresados en forma constitutiva e inducible, dependiendo del tejido u organismo en el que se presente la infección teniendo un amplio espectro antimicrobiano y múltiples mecanismos de acción (Téllez *et al.*, 2010).

Debido a su importancia, se han observado 600 péptidos antimicrobianos que parecen ser capaces de reclutar y promover la respuesta inmune innata. Su diversidad varía según su estructura química y composición, y la activación de los genes que generan estos péptidos antimicrobianos se consigue mediante la detección de patógenos (en el caso de bacterias Gram positivas) por una combinación de receptores de reconocimiento. Estos incluyen peptidoglicano, proteínas de reconocimiento (PGRPs) y glucanos de proteínas unidas a la membrana (GNBPs) (Téllez *et al.*, 2010).

En el campo de la microbiología, se han estudiado lectinas que reconocen y aglutinan bacterias. La superficie celular bacteriana es potencialmente rica con sitios reactivos para lectinas como son peptidoglicanos, ácidos teicoicos, lipopolisacáridos y el material capsular bacteriano. Por esta razón son utilizadas para realizar la identificación taxonómica bacteriana (Facinelli *et al.*, 1994).

- **Mecanismos de acción.**

Los péptidos antimicrobianos presentan también una característica única es su habilidad de penetrar en las membranas, suponiendo así que los péptidos antimicrobianos pueden matar a los microorganismos mediante mecanismos no mediados por receptores, aunque algunos péptidos pueden unirse a los componentes de la pared celular bacteriana (Schmidt *et al.*, 2005).

Un mecanismo alternativo para la formación de un canal o un poro en la membrana consiste en la inserción del péptido (α -barril) por el mecanismo de apalancamiento mediado (LM). De acuerdo con el modelo, los receptores que son sitios reconocidos por las lectinas (glicodeterminantes) que se ensamblan alrededor de un anillo en forma de lipoproteínas (lipoporina o hexamerina). Esta adhesión de moléculas oligoméricas se va a dar de manera cruzada con los receptores de la membrana, usando unos receptores de flexión que se encuentran alrededor de unas lipoproteínas, haciendo una función similar a la que hace una “bisagra”. En este modelo, la configuración del complejo proporciona cierta influencia para curvar la membrana internalizando así los receptores, lo anterior, en un grupo de complejos LM que afectan y provocan cambios tanto en la forma de la célula como en sus propiedades adhesivas. Dado que muchas toxinas que forman poros (e. g, las toxinas de cristal de *Bacillus thuringiensis* o Bt-toxinas) y que son lectinas. Su inserción en la membrana puede estar mediada por una reacción de absorción de apalancamiento mediado o LM, como se puede ver en la siguiente figura (Schmidt *et al.*, 2005).

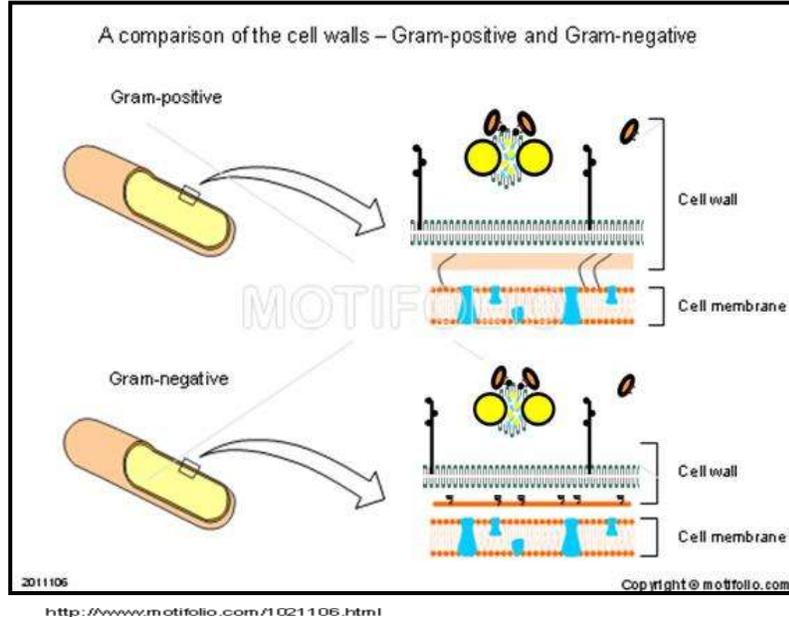


Figura 2. Modelo propuesto para la formación de poros en las membranas. Las lectinas (círculos naranjas) son las responsables de reconocer a los carbohidratos que están en la pared de bacterias.

II. JUSTIFICACIÓN

Se han demostrado los efectos farmacológicos que tiene la chaya en donde se han observado efectos hipoglucemiantes, hepatoprotectores e hipocolesterolémicos, al consumirla en infusión (té) (Figuroa-Valverde *et al.*, 2009). Otros de los efectos farmacológicos demostrados es su alto poder antioxidante (Gutiérrez *et al.*, 2007) y efecto antifúngico en algunas variedades de chaya (Ferner *et al.*, 2006). Se han reportado a los flavonoides como componentes activos atribuyéndoles las propiedades medicinales. Sin embargo, no existen estudios de lectinas en ésta planta por lo que el presente trabajo de investigación representa la primera investigación a nivel mundial enfocada al estudio de lectinas en esta planta. Lo que representa una importante aportación dentro de la proteómica.

III. HIPÓTESIS

La hoja chaya contiene lectinas con actividades antibacterianas.

IV. OBJETIVO GENERAL

Identificar, purificar y caracterizar propiedades bioquímicas y antibacterianas de las lectinas presentes en las hojas de chaya.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar la presencia de lectinas en extractos de chaya.
- Purificar las lectinas presentes en extractos de hoja de chaya.
- Caracterizar las lectinas en sus propiedades bioquímicas y antibacterianas.

VI. MATERIALES

- Hojas de chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) recolectadas del arbusto en estudio
- Panel de fenotipo con los cuatro grupos sanguíneos (A₁, A₂, B y O)
- Reactivos con grado analítico.
- Cepas bacterianas ATCC

VII. MÉTODOS

- **Extracción de pigmentos: acetónica y alcohólica.**

Los pigmentos vegetales son los encargados de dar color a las plantas y se encuentran en los cloroplastos. Su color depende de la absorción y de la reflexión de la luz a ciertas longitudes. En las plantas, la clorofila es el pigmento más abundante existiendo dos tipos: clorofila A, la cual constituye aproximadamente el 75% de toda la clorofila; la clorofila B, que es un pigmento accesorio presente en vegetales y otras células fotosintéticas complejas. Ambas se involucran directamente en la transformación de la energía lumínica en energía química (fotosíntesis) y es un pigmento que les proporciona el color verde, siendo más abundante en las hojas. Aunque también se encuentran diferentes pigmentos presentes como las xantofilas, carotenos, entre otros. Se diferencian entre sí por pequeños detalles en su estructura molecular y por que absorben longitudes de onda distintas. La extracción y reconocimiento de estos pigmentos es interesante para el estudio y conocimiento de sus propiedades. Los pigmentos clorofílicos no son solubles en agua, pero si son solubles en solventes orgánicos gracias a su afinidad química (Mancilla *et al.*, 1990).

En el caso de la chaya, la extracción de pigmentos de la hoja se realiza por medio de inmersión en solventes polares utilizando acetona (al 99%) y alcohol etílico

(al 70%). Las hojas previamente limpias se pesaron obteniendo la cantidad de 1 kg. Se cortaron en pequeños trozos y posteriormente se colocaron en un frasco de vidrio con tapa donde se les adiciono 1L de acetona. El tiempo de inmersión puede variar según la planta y la cantidad de pigmentos que contenga. Una vez realizado los lavados sucesivos con acetona se procedió a lavar con alcohol etílico, con el fin de que solventes orgánicos mas fuertes no destruyan a las lectinas que se desea estudiar. Se recuperaron y concentraron los pigmentos, y los solventes fueron recuperados por medio de una destilación simple para finalmente almacenar los pigmentos obtenidos se en frascos cubiertos de la luz y congelarlos para su posterior análisis. (Mendoza, 2004; Mancilla *et al.*, 1990).

- **Obtención del extracto crudo.**

El primer paso para la purificación de proteínas es elaborar una preparación a la cual se le denomino extracto crudo (EC). En él se ven contenidas una mezcla de proteínas y algunas macromoléculas adicionales que provienen del citoplasma celular así como de la membrana. El EC es preparado mediante la lisis celular, utilizando para tal fin métodos mecánicos o químicos. La preparación del EC requiere remover las proteínas mediante una centrifugación (Philips, 2010).

Para la obtención del extracto crudo (EC) de hojas de chaya se trituraron 5 g de hojas fresca en un mortero, a la cual se le adiciono 15 mL de buffer de fosfato salino (PBS 0.1 M, pH 7.5). La mezcla obtenida se separó mediante una filtración y una centrifugación simple (a 3000 rpm durante 15 minutos). El sobrenadante resultante, que es el que contiene las proteínas, fue separado y refrigerado para su posterior análisis. Cabe mencionar que es importante que se controle la temperatura, ya que se sabe que las proteínas se pueden desnaturalizar y como consecuencia cambiar sus propiedades al haber variaciones abruptas de temperatura (Voet, 2003; Cap.7, pp. 192).

- **Ensayo de hemaglutinación.**

El ensayo de hemaglutinación consiste en la agregación sistemática de células mediada por macromoléculas específicas que reconocen estructuras moleculares determinadas sobre la superficie celular. Este ensayo se realizó utilizando un panel de fenotipo conocido formado por los siguientes tipos sanguíneos humanos (A₁, A₂, B y O) donados por el Banco Central de Sangre, IMSS México. Adicionalmente, se realizaron estos ensayos con sangre de especies animales, entre las cuales están bovino, ovino, porcino y cunícula. Este ensayo se desarrolló en placas de 96 pozos (Corning incorporated NY 14831) utilizando el proceso de dilución serial (Debray *et al.*, 1981). Los resultados se expresaron como unidades de hemaglutinación y como actividad específica. Una unidad de hemaglutinación (UHA) 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 y 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 (C) necesaria para producir hemaglutinación se obtiene con la última dilución que conserva la actividad. El ensayo se desarrolló con un control negativo (carente de hemaglutinación) y con uno positivo (con una fuente de hemaglutinación conocida) (Fenton N. B *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2004).

- **Cuantificación de proteínas.**

Para cuantificar proteínas existentes en muestras obtenidas en los diferentes pasos de purificación: extracto crudo (EC), fracción proteica (FP), precipitaciones salinas (PP) y lectina pura de la chaya, se utilizó el método de Bradford. Este método consiste en medir la extinción provocada por el cambio de luz en el espectro visible del colorante Azul de Coomassie G-250, cuando este se une a las proteínas que tienen la capacidad de absorción máxima de 465 nm (longitud de onda) y con el colorante

cambia a 595 nm. Esta unión se realiza a través de los grupos ionizados, donde además se comprueba la proporcionalidad que hay entre el colorante y las proteínas de las muestras. La determinación del contenido proteico de cada una de las muestras requirió de comparar los valores de absorbancia (Abs) con los medidos en muestras a partir de cantidades conocidas de proteínas, que para tal caso se utilizó BSA (albumina bovina), con lo que se construye una curva de calibración donde a mayor cantidad de proteínas mayor color desarrollado y por lo tanto, mayor absorbancia (Phillips, 2010; En línea: <http://biotech.about.com/od/protocols/a/ProteinPurify.htm>; Bradford, 1976). En éste ensayo se realizó una curva patrón utilizando BSA (albumina bovina), amortiguador (PBS 0.1M pH 7.5) y reactivo de Bradford. Se midieron a una longitud de onda de 595 nm y las concentraciones de las muestras problema se obtienen interpolando las absorbancias obtenidas en la curva patrón.

- **Precipitación fraccionada (con sulfato de amonio) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$**

El siguiente paso de purificación de las proteínas es la precipitación salina. Este paso consiste en someter a la solución de proteínas a una alta fuerza osmótica la cual será proporcionada por la sal de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A esta técnica también se le conoce como “*salting out*”, y tiene la propiedad de insolubilizar a las proteínas al exponerlas a altas concentraciones de sal mediante una precipitación. Las proteínas son precipitadas de acuerdo con el peso molecular, donde a menor concentración de sal se separan las de mayor peso, y al llegar a la saturación se separan las de menor peso. (Phillips, 2010; Stryer *et al.*, 2003, Voet, 2003). El precipitado de proteínas se separa mediante una centrifugación en fracciones proteicas: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100% PP y 80-100% SB, hasta llegar a la saturación. La eliminación de la sal se realizó mediante diálisis.

- **Diálisis.**

Para dializar los PP de proteínas, se utilizó una membrana de celulosa porosa de marca Spectra/Por®, No. 3 para moléculas de 3500 Da de peso molecular. Las moléculas que son de mayor tamaño al poro son retenidas dentro de la bolsa formada por esta membrana y en donde existe la salida de iones al medio (en este caso es agua destilada) para alcanzar el equilibrio osmótico. Esta técnica resulta muy útil para la separación de sales y otras moléculas pequeñas en una mezcla de proteínas (Stryer *et al.*, 2003).

- **Cromatografía de filtración en gel o exclusión molecular**

En este tipo de cromatografía, la separación de proteínas es en base a su peso molecular. Las proteínas más grandes no penetran en los poros de la matriz de filtración, por lo que su desplazamiento es con mayor rapidez. Las proteínas más pequeñas son retenidas logrando penetrar en los poros de las partículas del polímero. La amplitud de los poros internos de la fase estacionaria varía de acuerdo al polímero que se use para la separación (Mathews *et al.*, 2002; Voet 2003). El volumen de elución es recolectado en una serie de tubos en los que están separadas las proteínas en base al tiempo de elución. En este trabajo se utilizó como resina Sephadex G-75 (de la marca SIGMA) ya que permite la separación adecuada de la mezcla de proteína (Phillips, 2010). Se hizo pasar por la columna un volumen de 200 mL. El volumen de columna es calculado mediante la siguiente fórmula:

$$V = (\text{radio de columna})^2 * (\pi) * (\text{altura de columna})$$

- **Electroforesis SDS-PAGE (Dodecil Sulfato de Sódio-Electroforesis de Gel de Poliacrilamida).**

El peso molecular aparente se determinó utilizando una electroforesis en microgeles de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) de 1 cm de grosor por 10 cm de longitud utilizando el sistema de amortiguadores de Laemmli (1970) en cámaras Hoefer mini VE (Amersham Pharmacia Biotech). El gel concentrador se preparó al 4% de acrilamida y al 12% el gel separador. Las muestras se corrieron bajo condiciones reductoras con la presencia de 5% 2-mercaptoetanol y no reductoras (nativas). Las muestras se calentaron a 100°C por 10 min. Los geles se tiñeron con azul de Coomasie (μg) y con plata (Hg). Los marcadores moleculares (marca PIERCE #26681) utilizados fueron los siguientes: Miosina (214,000 kDa), fosforilasa B (121,500 kDa), BSA (86,950 kDa), ovalbúmina (49,500 kDa), anhidrasa carbónica (32,900 kDa), inhibidor de tripsina (26,400 kDa) y lisozima, (18,200 kDa). Se elaboraron curvas con las distancias recorridas (R_f) por los marcadores y se interpoló la distancia recorrida por las muestras problema, obteniéndose así el peso molecular aparente.

ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

Se analizaron a las proteínas obtenidas las siguientes propiedades bioquímicas: peso molecular aparente, especificidad hacia carbohidratos, dependencia de pH, temperatura y de cationes.

- **Especificidad a carbohidratos**

Las lectinas tienen la propiedad de unirse a carbohidratos (monosacáridos, oligosacáridos y glicoproteínas) de manera reversible y con una alta especificidad. Cada lectina presenta en su estructura dos o más sitios de combinación los cuales son di o polivalentes (Kawsar *et al.*, 2010). La especificidad de las hemaglutininas por los diferentes grupos sanguíneos humanos juegan un papel importante en las investigación de lectinas, ya que la hemaglutinación es debida a que ellas reconocen los carbohidratos que están en la superficie de los eritrocitos de cada grupo sanguíneo humano y su importancia se basada en la interacción no covalente (reversible) que presentan las lectinas con los carbohidratos de la superficie del eritrocito, dando como resultado la unión de muchas células y su posterior precipitación (Ambrosi *et al.*, 2005). Los grupos sanguíneos (A₁, A₂, B y O) contienen carbohidratos superficiales a los cuales constituyen el 55% de azúcares neutros (D-Glucosa, D-Galactosa, D-Manosa y L- Fucosa); 27.8% corresponden a hexosaminas (N-acetil-D-Glucosamina y N-acetil-D-Galactosamina) y el 16.7% a N-acetil-D-ácido neuramínico (Schenkel-Brunner, 1995; Bladier *et al.*, 1979).

Para este ensayo se utilizaron los siguientes carbohidratos: galactosa (Gal), N-acetilgalactosamina (GalNAc), galactosa acetilada (GalAcet), glucosa (Glu), N-acetilglucosamina (GluNAc), fucosa (Fuc), manosa (Man), fructosa (Fruc), xilosa (Xyl), sacarosa (Sac), ribosa (Rib), lactosa (Lac), ácido neuramínico (NANA), maltosa (Malt) y glicoconjugado (Glyco).

- **Dependencia de pH**

El efecto del pH en las membranas de muchas células influye fuertemente en la adhesión de moléculas externas a la membrana. Este proceso es considerado importante ya que la acidificación o basificación en la cabeza polar de los fosfolípidos que están cargados negativamente permitirán o no la adhesión de dichas molécula. La interacción de las lectina de plantas (e. g., Con A) con la bicapa lipídica cambia la interacción electrostática en la capa externa de la membrana. Esto es porque los componentes lipídicos de la membrana están influenciados por un determinado pH que ayuda en la interacción entre moléculas externas y varias partes de la membrana (Doltchinkova *et al.*, 2002). Por otro lado, en las proteínas el pH o punto isoeléctrico variara según la composición del medio puesto que ellas pueden unirse a aniones o cationes (Voet, 2003).

- **Dependencia de temperatura**

La temperatura es una consideración importante cuando durante la purificación de una proteína se tiene generalmente varios valores “óptimos” de temperatura en función de los pasos secuenciales de purificación. Una buena regla general es que las proteínas son más estables a temperaturas bajas, especialmente cuando los agentes proteolíticos (e. g., proteasas) están presentes. Aunque las temperaturas más bajas sean las que influyen en la estabilidad, ya que por lo general tienen un efecto negativo sobre los métodos de purificación. La temperatura óptima de las proteínas para que su actividad biológica se conserve no es necesariamente la misma que la de su estabilidad. (Random Primers, 2007. En línea: <http://www.opsdiagnostics.com/notes/ranpri/rpproteinstability2.htm>).

Para este ensayo se tomó en consideración un intervalo de temperatura que varía desde los 4º, 15º, 22º, 36º, 40º, 60º, 80º hasta 100º C con el fin de observar si los cambios de temperatura influyen y afectan la actividad biológica de las proteínas (lectinas).

- **Dependencia de cationes**

Las lectinas usualmente son metaloproteínas que contienen predominantemente cationes divalentes como Ca^{++} , Mn^{++} y Mg^{++} . La unión al ion metálico de las lectinas parece ser fuerte, por lo que estas proteínas son tratadas con ácido etilendiaminoatetraacético (EDTA). Las lectinas libres de iones se pueden preparar en soluciones con pH bajo para estudiar su unión a carbohidratos, su estructura y su actividad biológica. Está bien establecida que la relación que existe los iones metálicos y la actividad de algunas lectinas así como su unión a carbohidratos. Esta actividad es evaluada mediante ensayos de hemaglutinación (Lönnerdal *et al.*, 1983).

ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS

- **Actividad antibacteriana**

Para estudiar debidamente a los microorganismos así como su susceptibilidad a diversos antimicrobianos es necesario cultivarlos en condiciones de laboratorio. Para lograr esto es preciso saber cuáles son los nutrientes y condiciones físicas que se requieren debido a que las necesidades nutricionales de cada microorganismo varían de acuerdo a su género y especie (Pelczar *et al.*, 1982). Haciendo referencia a lo anteriormente descrito, un cultivo de bacterias es cualquier preparación en la que ha habido crecimiento artificial de microorganismos y un medio de cultivo es un substrato o solución de nutrimentos en que se cultivan los microorganismos en el laboratorio. Lo anterior permite identificar y obtener un cultivo puro que puede ser aislado de muestras clínicas. Este aislamiento se lleva a cabo después de haber observado las características físicas y genéticas del microorganismo, lo cual ocurre empleando diferentes técnicas tanto de siembra (método por estrías) o de identificación (diferenciación microscópica por medio de la tinción de Gram) (Carpenter, 1979).

Para evaluar la actividad antibacteriana se utilizaron las siguientes cepas ATCC (*American Type Culture Collection*). De las Gram negativas se consideraron a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y de las Gram positivas se consideró a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Las pruebas de sensibilidad bacteriana se hicieron mediante el método de difusión en disco que valora la actividad inhibitoria de un antimicrobiano frente a un microorganismo determinado (método de Kirby-Bauer) donde el crecimiento bacteriano debe ser 0.5 en escala de Mc Farland (crecimiento conocido de microorganismos que equivale a 1.5×10^8 UFC/mL) (Henry, 2007).

En el método de difusión en disco el agente antibiótico se ve incorporado en discos de papel filtro (con 6 mm de diámetro) en una concentración conocida, los cuales se colocan sobre la superficie de una caja de agar (Mueller-Hinton) sembrado masivamente con el microorganismo en estudio (Lizcano *et al.*, 2008). Luego de incubar por 24 h a una temperatura de 37°C se observaron los halos de inhibición de crecimiento. Las ventajas de este método es que se utilizó una pequeña cantidad de la muestra a evaluar (50 µL de EC, FP, pigmentos) y que ofrece la posibilidad de ensayar varias sustancias contra un mismo microorganismo.

Para que existiera una adecuada determinación de la actividad antibacteriana fue necesario tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- Se verificó la concentración de bacterias en el medio de enriquecimiento (caldo Mueller-Hinton) la cual se baso en la escala de Mc Farland (0.5), lo anterior con el fin de evitar una sobrepoblación en el cultivo (de acuerdo con el National Committee for Clinical Laboratory Standards: *NCCLS*).
- Como control positivo se utilizaron antibióticos comerciales (para Gram negativas: gentamicina 80 mg/2 mL, levofloxacino 750 mg y para Gram positivas ampicilina 500 mg/ 2 mL) los cuales se estandarizaron para lograr obtener un halo de inhibición de 0.5 cm y que fuera comparable con los resultados.

-
- El EC, FP se diluyeron al igual que el antibiótico en agua destilada estéril para garantizar una inocuidad en el ensayo; los pigmentos (acetónicos y etanólicos) se diluyeron en DMSO.
 - Para una mejor observación del efecto antibacteriano de EC, FP, intervalo salino 20-40%, pigmentos (PI OH Y ACET) y CchL (lectina de chaya) se tomo en cuenta el efecto que producían en el crecimiento bacteriano, graficando curvas donde se muestra la absorbancia (medidos a una longitud de onda de 630 nm) en función del tiempo.

Para evidenciar la actividad microbicida de pigmentos (etanólicos y acetónicos) EC, FP, PP salinas y lectina pura de chaya, se compararon con controles positivos que fueron los antibióticos comerciales. Tomando en cuenta que la efectividad de un antibiótico es mayor que la de los productos naturales se consideró la relación entre la concentración de antibiótico y muestra vegetal, lo anterior para que los resultados fueran comparables, tal como lo menciona en su trabajo Lizcano *et al.* (2008). El antibiótico se estandarizó alcanzando un halo de inhibición máximo de 5 mm en comparación con el halo de inhibición más grande de la muestra vegetal (Lizcano *et al.*, 2008).

A continuación se describen brevemente los antibióticos utilizados:

- **Gentamicina (80 mg/ 2 mL) sol. inyectable.**

Es un agente bactericida y actúa inhibiendo la síntesis de proteínas de bacterias susceptibles causando una muerte celular. Es activo en contra de bacterias Gram negativas incluyendo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.*, entre otras más. Es también activo en contra de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*. *In vitro* la gentamicina es activa también contra *Salmonella* y *Shigella*. Es utilizada en como tratamiento de bacteremia, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario. La gentamicina es metabolizada y excretada

por filtrado glomerular, sin embargo se sabe que ototóxico y nefrotóxico (Doc, PDF. 2005, en línea: <http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/g/Gentamicininj.pdf>).

Se eligió este antibiótico ya que las cepas utilizadas en este trabajo son susceptibles a él y además de que es un antibiótico de amplio espectro, ayudando a combatir infecciones causadas por microorganismos resistentes a otros antibióticos.

- **Ampicilina (500 mg/ 2 mL) sol inyectable**

Es una ampicilina es una penicilina semisintética con alto poder antibacterial. Es efectiva en contra de bacterias Gram negativas y positivas. Es usada comúnmente para tratar gonorrea, infecciones intestinales, urinarias y respiratorias. A diferencia de la penicilina, la presencia de un grupo amino ayuda a que la droga penetre la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Actúa como un inhibidor competitivo de la enzima transpeptidasa, la cual es necesaria para que la bacteria pueda sintetizar su pared celular evitando que las bacterias lleven a cabo fisión binaria (Katzung, 2007).

- **Levofloxacino (750 mg) tabletas**

Es un quimioterapéutico sintético que deriva de una fluoroquinolona y es usado como antibiótico cuando se presentan infecciones resistentes a otros antibióticos. Este antibiótico interactúa con otras drogas así como con numerosos compuestos herbales y suplementos naturales, aumentando el riesgo de arritmias, cardio-toxicidad, anti coagulación y toxicidad sistémica. Se asocia con numerosos procesos y reacciones adversas en especial con hepatotoxicidad. Es usada para tratar infecciones respiratorias, celulitis, infecciones urinarias, ántrax, endocarditis, entre otras (En línea: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01137>).

Por otro lado, para observar el efecto antibacteriano que tiene EC, FP, pigmentos (PI ACET y OH), intervalo salino 20-40%, y la lectina de chaya CchL de manera más específica se realizaron curvas en donde se grafico el efecto antibacteriano (crecimiento de bacterias) medido en un intervalo de tiempo.

La medición del crecimiento bacteriano se llevo a cabo mediante métodos turbidimétricos, en donde se midió la reducción de la transmisión de la luz debido a partículas de una suspensión cuantificando la luz residual en relación directa con la longitud de onda y al tamaño de la partícula (Bustos, 2011).

Los cultivos bacterianos actúan como suspensiones coloidales absorbiendo y reflejando la luz que incide sobre ellos, observándose una visible turbidez. Dentro de un rango, la luz absorbida o dispersada por una suspensión bacteriana es directamente proporcional a la concentración de células en el cultivo. Por ello, un procedimiento rápido, fácil y preciso de estimar el número de bacterias en un cultivo es la medida de turbidez, utilizando un espectrofotómetro. Este aparato proporciona luz monocromática por medio de un filtro que permite sólo el paso de la longitud de onda elegida (normalmente las longitudes de onda usadas para medir la turbidez bacteriana están en el rango 540 – 660 nm) (Bustos, 2011).

Como se ha comentado anteriormente, una aplicación directa de la turbidimetría y del recuento de microorganismos por diluciones seriadas es la realización de una curva patrón en la que se relaciona la medida de la absorbancia con el número de células viables del cultivo. Sin embargo, una mayor simplificación la ofrece la estandarización de Mc Farland, útil en análisis microbiológicos sencillos. La escala de Mc Farland relaciona la turbidez de unos patrones de sulfato bórico (mezcla de cloruro bórico al 1% y ácido sulfúrico al 1%) con el número de bacterias presentes en una muestra (Bustos, 2011).

Para la evaluación del efecto antibacteriano nos basamos en el método descrito por Othmann *et al.*, 2011. Inicialmente, se ajustó el numero de cada una de las bacterias analizadas para tener 1.5×10^8 UFC/mL (Absorbancia a 630 nm= 0.6). En el ensayo se utilizó una concentración de 1.5×10^4 UFC/mL (Abs 630 nm =0.3) debido a la

dilución con las muestras problema. Se analizó el efecto antibacteriano que ejercieron EC, FP, intervalo salino 20-40% y la lectina de chaya CchL, evaluando la disminución en la absorbancia obtenida (Othmann *et al.*, 2011).

El caldo de Mueller Hinton presenta un incremento en la absorbancia a 630nm conforme pasa el tiempo de incubación a 37°C (Conlon JM *et al.*, 2010), debido a la desnaturalización de sus componentes. De la misma manera los compuestos presentes de los extractos como pigmentos entre otros, presentan un incremento en la absorbancia conforme pasa el tiempo de incubación (Hoepffner *et al.*, 1991, Muñoz *et al.*, 2007, Mireles, 2011). Debido a lo anterior los datos obtenidos de las muestras problema, inicialmente se les resto el blanco (medio de cultivo) a todos los datos obtenidos. Posteriormente para poder evidenciar el efecto antibacteriano del EC, FP, intervalo de concentración 20-40%, pigmentos acetónicos y etanólicos, se resto el blanco de cada uno de estos, que consistió en la absorbancia de cada uno sin bacterias en los tiempos analizados que corresponde al delta. Se graficaron como el efecto antibacterinano (delta) Vs el tiempo de incubación.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para realizar el análisis de los datos, se aplicó estadística descriptiva donde se usaron las medidas de tendencia central como media (\bar{x}), desviación estándar (S) y error estándar (E.E). Así mismo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Kruskal-Wallis para establecer una correlación estadística entre la actividad específica (AE) de los diferentes grupos sanguíneos humanos en una sola muestra por duplicado y así poder determinar su nivel de significancia estadística ($P \leq 0.05$). También se evaluó la correlación entre grupos por medio de pruebas de Tukey y U de Mann-Whitney. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad® Prisma versión 5.0 y para comprobar los datos analizados también se utilizó el programa Estadis® versión 1.1.

IX. RESULTADOS

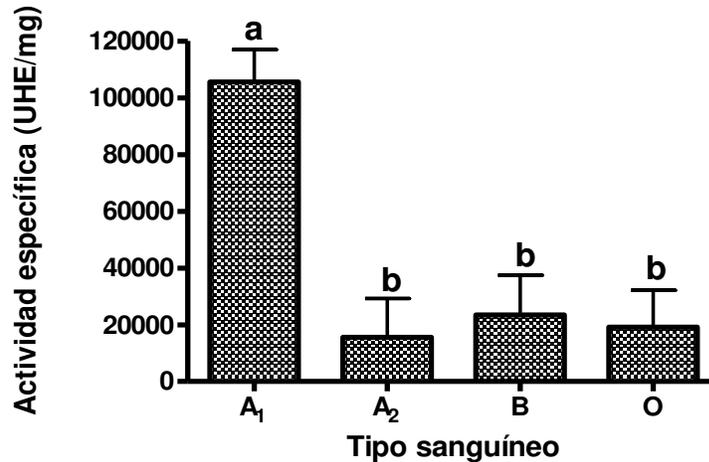
Obtención del extracto crudo

Para llevar a cabo la purificación y caracterización de las lectinas en las hojas de chaya se inicio con la elaboración de un extracto crudo para comprobar que las hojas de chaya si están presentes las lectinas. El extracto crudo se obtuvo al homogeneizar las hojas con el amortiguador (PBS 0.1M, pH 7.4) con el fin de diluir sus componentes. Una vez obtenida la mezcla fue centrifugada a 3000 rpm, separada y el sobrenadante (que es el que contiene las lectinas) se probó en un ensayo de hemaglutinación para evaluar la actividad hemaglutinante AE (UHA/mg de proteína) como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2: Actividad Hemaglutinante (AE) de EC de la Chaya.+

Grupos Sanguíneos	UHA	AE	C
A₁	140,434 ± 15,108	105,590 ± 11,360	0.84 ± 0.12
A₂	20,693 ± 18,144	15,559 ± 13,642	7.14 ± 7.63
B	31,147 ± 18,698	23,419 ± 14,059	3.45 ± 3.51
O	34,560 ± 17,656	19,148 ± 12,960	3.79± 3.73

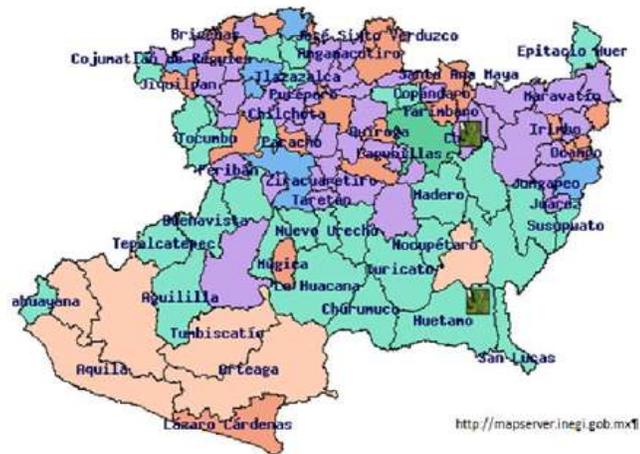
Los resultados representan la media de 7 ensayos independientes por duplicado. UHA (Unidades de hemaglutinación), AE (actividad específica: UHA/mg de proteína), C (Mínima concentración de proteína necesaria para generar una hemaglutinación en µg/mL). Concentración de proteínas (1.33 mg/ mL ± 0.16).



Grafica 1. Actividad Hemaglutinante (AE) del Extracto crudo (EC). Los resultados representan la actividad específica (AE), la media \pm el Error Estándar de $n=7$ ensayos independientes por duplicado con diferencia significativa ($p<0.05$).

En la gráfica anterior se puede ver que existe una mayor AE para el grupo A₁ en comparación con los demás grupos. Con este ensayo de hemaglutinación se comprobó que en las hojas de *chaya* (*Cnidoscolus chayamansa*) si están presentes lectinas, mostrando así una actividad hemaglutinante con los cuatro grupos sanguíneos humanos (A₁, A₂, B y O). La mayor afinidad se observa con el grupo sanguíneo A₁ (Tabla 2, C)

Con el fin de comprobar la presencia lectinas presentes en la hoja de *chaya* se considero (de acuerdo a tamaño y ubicación geográfica) evaluar la AE de diferentes muestras, las cuales se describen en la siguiente tabla:



El recuadro en verde muestra el lugar de procedencia, que corresponde a los municipios de Morelia y Huetamo, Mich.

Tabla 3. Diferentes muestras de hoja de chaya.

	Características	Lugar de procedencia	Tamaño de hoja
M0*	Hoja fresco, de color verde claro	Arbusto estudiado, Morelia, Mich.	12 cm
M1	Hoja fresco, de color amarillo-verdoso	Mercado independencia, Puesto 1. Morelia Mich	12 cm
M2	Hoja fresca, de color verde	Mercado independencia, Puesto 2 Morelia, Mich.	15 cm
M3	Hoja fresca, de color verde	Fac. Csc. Med. Y Biol. "Dr. Ignacio Chávez", Morelia, Mich.	7 cm
M4	Hoja seca, de color verde	Huetamo, Mich.	16 cm



Figura 3. Hojas de chaya (*Cndoscolus chayamansa*) de diferente tamaño (Fuente propia).

Las hojas recolectadas se limpiaron para elaborar los extractos crudos (EC) respectivos y posteriormente se evaluó la actividad específica (AE). De los ensayos de hemaglutinación hechos se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 4. Actividad específica (AE) de las diferentes muestras de hoja de chaya.

ACTIVIDAD ESPECIFICA (AE)								
Grupos Sanguíneos								
EXTRACTOS	A ₁		A ₂		B		O	
	AE	C (µg/ mL)	AE	C (µg/ mL)	AE	C (µg/ mL)	AE	C (µg/ mL)
EC M0	140,434	0.84	20,693	7.14	31,147	3.45	34,560	3.8
EC M1	198,620	10.2	52,966	1.7	149,809	1.2	124,841	2.0
EC M2	94,523	0.92	70,892	2.82	15,815	291.2	33,477	9.7
EC M3	57,857	1.4	114,573	0.7	42,965	2.1	28,643	2.8
EC M4	77,283	1.1	344	1.55	176,172	16.82	0	0

AE (actividad específica: UHA/mg de proteína) y C (Mínima concentración de proteína necesaria para generar una hemaglutinación en µg/mL).

En la tabla anterior se puede ver que las muestras M0 existe una AE mayor en A₁ al igual que en la M1 y M2. En el caso de M3 se muestra una mayor actividad con A₂. En M4 por el contrario, se observó una mayor actividad con B a diferencia de las demás muestras. Cabe mencionar que la AE de las diferentes muestras de chaya a pesar de que fueron de la misma especie se vio una diferente afinidad para los diferentes grupos sanguíneos humanos. Con respecto a la cantidad de proteína necesaria para llevar a cabo la hemaglutinación (C) también se puede apreciar que varía en relación con AE.

Teniendo en consideración que el objeto de estudio son las proteínas (lectinas) y que en este especie de chaya existe un alto contenido proteico tal como lo menciona Kuti y Torres (1997) y Rafiu y Olufunmilola (2010), también se procedió a cuantificar la concentración proteica de cada unas de las muestra recolectadas como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 5. Concentración proteica de diferentes extractos crudos de hojas de chaya.

CONCENTRACION PROTEICA (mg prot./mL)	
<i>Diferentes muestras</i>	
EC M0	1.33
EC M1	1.16
EC M2	1.30
EC M3	1.43
EC M4	1.06

En la tabla anterior se puede observar que la cantidad de proteína se mantiene similar en las diferentes muestras, aún en la M4, por lo que podemos ver que en la cantidad de proteína no existe una variación considerable de arbusto a arbusto.

Una vez que se demostró lo anterior, los pigmentos de las hojas de chaya fueron removidos y con esto se pudo iniciar el proceso de obtención y purificación de las lectinas.

- **Remoción de pigmentos de las hojas de chaya.**

Las hojas utilizadas fueron recolectadas de un arbusto de Morelia Michoacán y confirmadas que corresponden al género y especie deseado. Esto fue validado por el departamento Herbario de la Facultad de Biología perteneciente a la UMSNH (ver ANEXO 1) y la cantidad recolectada para iniciar con la purificación de lectinas fue de 1 kg de hojas. Las hojas fueron cortadas en pequeños trozos y sometidas a la acción de la acetona realizando lavados sucesivos para posteriormente sumergirlas en etanol, también realizando lavados hasta que la hoja no presente más pigmentos, tal como se observa en las siguientes figuras:



Figuras 4 y 4a. Pigmentos removidos de las hojas de chaya (Fuente propia).

Estos pigmentos fueron concentrados mediante una destilación simple, donde el solvente fue recuperado. Una vez concentrados fueron resguardados de luz y congelados para su posterior análisis.

Una vez obtenidas las hojas sin pigmentos se inició con la purificación de lectinas.

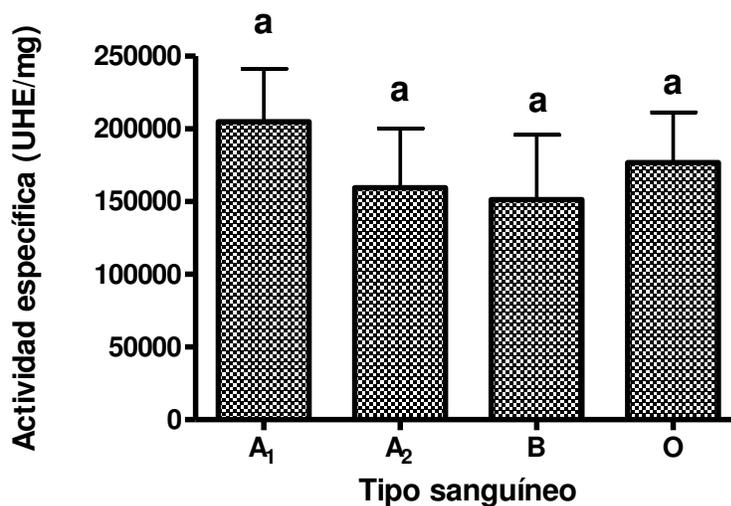
- **Obtención de la fracción proteica**

Las hojas a las cuales se le han removido los pigmentos fueron secadas y trituradas en un mortero para obtener un polvo fino. De este polvo se pesaron 0.5 g y se mezclaron en 10 ml de PBS hasta formar una mezcla homogénea. Mediante una centrifugación (a 1500 rpm) el sobrenadante se separó y se tomaron pequeñas muestras para realizar un ensayo de hemaglutinación y verificar así la presencia de lectinas. Al evaluar la AE se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 6. Actividad Hemaglutinante (AE) de la fracción proteica (FP) de la Chaya.

Grupos Sanguíneos	UHA	AE	C
A ₁	112,640 ± 20,111	204,800 ± 36,565	0.54 ± 0.12
A ₂	87,680 ± 22,535	159,418 ± 40,974	1.44 ± 1.01
B	83,200 ± 24,536	151,273 ± 44,610	0.97 ± 0.62
O	102,400 ± 18,961	176,873 ± 34,474	0.44 ± 0.12

Los resultados representan la media ± Error Estándar de 8 ensayos independientes por duplicado. UHA (Unidades de hemaglutinación), AE (actividad específica: UHA/mg de proteína), C (Mínima concentración de proteína necesaria para generar una hemaglutinación en µg/mL). Concentración de proteínas (1.08 mg/mL ± 0.1 mg/mL).



Gráfica 2. Actividad hemaglutinante de la fracción proteica (FP). Los resultados representan la actividad específica (AE) la media ± Error Estándar de n=8 ensayos independientes por duplicado sin diferencia significativa ($p>0.05$).

La fracción proteica también presentó una alta actividad específica para los diferentes grupos sanguíneo como se muestra en la gráfica anterior confirmándose así la presencia de lectinas y demostrando que la extracción de pigmentos no dañó las actividades de las mismas.

Se continuó con el proceso de purificación utilizando una mayor cantidad de hojas sin pigmentos (16g) estas se trituraron, rehidrataron, filtraron y centrifugaron, y al

sobrenadante resultante se le llamó fracción proteica (FP), a partir del cual se separaron las proteínas por medio de una precipitación salina.

- **Precipitación con sulfato de amonio**

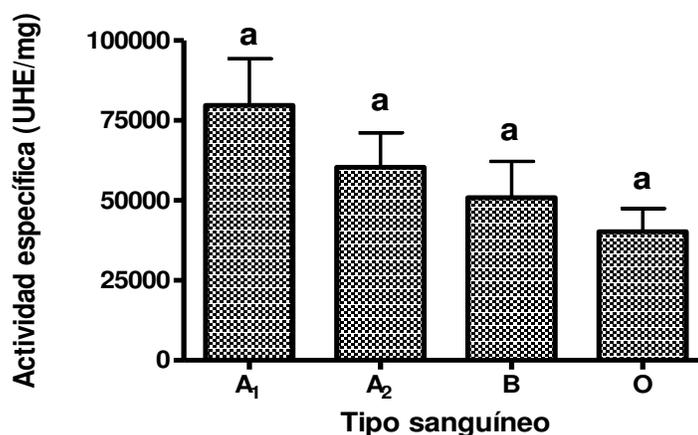
Para separar las proteínas se utilizó una separación fraccionada con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$ desde cero a la saturación (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100% PP y 80-100% SB) de esta manera las proteínas se separan en base a su solubilidad y peso molecular. Una vez obtenidas las proteínas en los diferentes intervalos de precipitación se evaluó la presencia de lectinas mediante ensayos de hemaglutinación obteniendo los siguientes resultados:

- **Intervalo de concentración de 0-20%**

Tabla 7: Actividad Hemaglutinante (AE) de la fracción salina 0-20% de la Chaya.

Grupos Sanguíneos	UHA	AE	C
A₁	70,400 ± 13,064	79,694 ± 14,582	8.68 ± 1.81
A₂	49,493 ± 9,558	60,352 ± 10,773	2.86 ± 0.39
B	45,013 ± 10,130	50,873 ± 11,341	13.37 ± 3.60
O	28,400 ± 5,403	40,173 ± 7,253	85.59 ± 29.56

Los datos corresponden a la media ± Error Estándar de 6 ensayos independientes por duplicado. Concentración de proteínas (0.42 mg/mL). UHA (Unidades de hemaglutinación), AE (actividad específica en UHA/mg de proteína), C (Mínima concentración de proteína necesaria para generar una hemaglutinación en µg/mL).



Grafica 3. Actividad hemaglutinante de la fracción salina 0-20%. Los resultados representan la actividad específica (AE) la media \pm Error Estándar de n=6 ensayos independientes por duplicado sin diferencia significativa ($p < 0.05$).

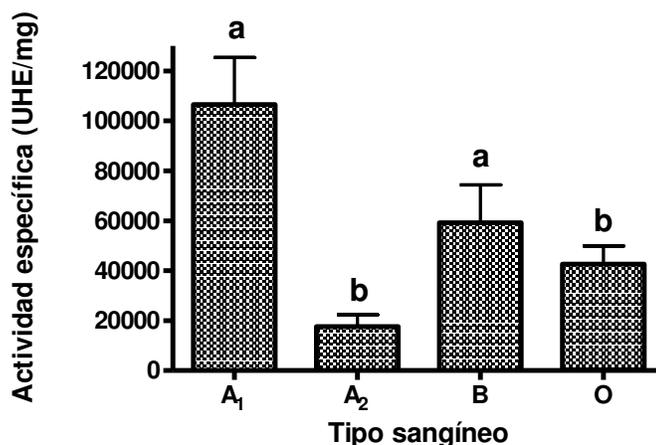
En la fracción 0-20% de la precipitación con sulfato de amonio se observa una actividad hemaglutinante con afinidad hacia los cuatro grupos sanguíneos como se muestra en la grafica 3. También se puede observar que existe actividad diferente al utilizar los tipos sanguíneos humanos y que esta actividad va descendiendo lo que indica que están presentes más de una lectina.

- **Intervalo de concentración de 20-40%**

Tabla 8: Actividad Hemaglutinante (AE) de la fracción 20-40% de la Chaya

Grupos Sanguíneos	UHA	AE	C
A ₁	71,680 \pm 12,908	106,598 \pm 18,831	0.58 \pm 0.13
A ₂	10,347 \pm 2,631	17,589 \pm 4,798	16.12 \pm 5.64
B	40,213 \pm 10,373	59,174 \pm 15,250	14.83 \pm 4.44
O	28,160 \pm 4,998	42,598 \pm 7,305	2.90 \pm 0.65

Los datos corresponden a la media \pm Error Estándar de 6 ensayo independiente por duplicado. Concentración de proteínas (0.42 mg/mL). UHA (Unidades de hemaglutinación), AE (actividad específica en UHA/mg de proteína), C (Mínima concentración de proteína necesaria para generar una hemaglutinación en μ g/mL).



Grafica 4. Actividad hemaglutinante(AE) de la fracción salina 20-40%. Los resultados representan la actividad específica (AE) la media \pm Error Estándar de n=6 ensayo independiente por duplicado con diferencia significativa ($p < 0.05$).

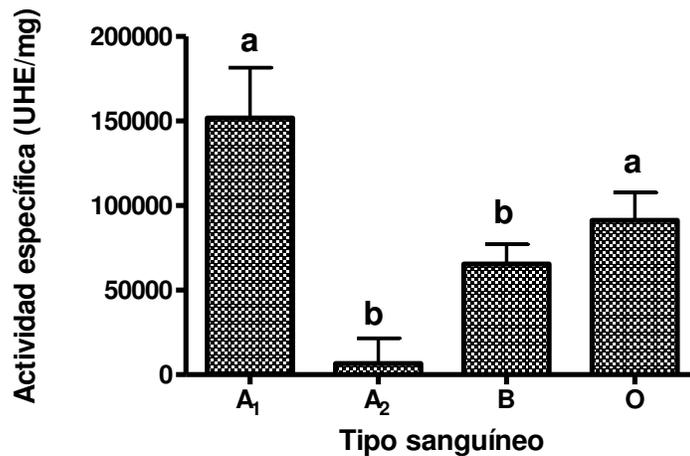
En la fracción 20-40% la actividad específica es preferencial para el grupo sanguíneo A₁, como se muestra en la gráfica 4. Sin embargo, existe una menor afinidad para el grupo O y B existiendo una diferencia significativa respecto del grupo A₁.

- **Intervalo de concentración de 40-60%**

Tabla 9. Actividad Hemaglutinante (AE) de la fracción salina 40-60% de la Chaya.

Grupos Sanguíneos	UHA	AE	C
A ₁	68,280 \pm 13,422	151,733 \pm 29,826	75.15 \pm 30.61
A ₂	29,880 \pm 6,748	66,400 \pm 14,995	76.90 \pm 30.47
B	29,440 \pm 5,257	65,422 \pm 11,682	10.33 \pm 2.30
O	41,040 \pm 7,464	91,200 \pm 16,586	56.47 \pm 15.66

Los datos corresponden a la media \pm Error Estándar de 6 ensayos independientes por duplicado. Concentración de proteínas (0.35 mg/mL). UHA (Unidades de hemaglutinación), AE (actividad específica en UHA/mg de proteína), C (Mínima concentración de proteína necesaria para generar una hemaglutinación en μ g/mL).



Grafica 5. Actividad hemaglutinante de la fracción 40-60%. Los resultados representan la actividad específica (AE) la media \pm Error Estándar de n=6 ensayos independientes por duplicado con diferencia significativa ($p < 0.05$).

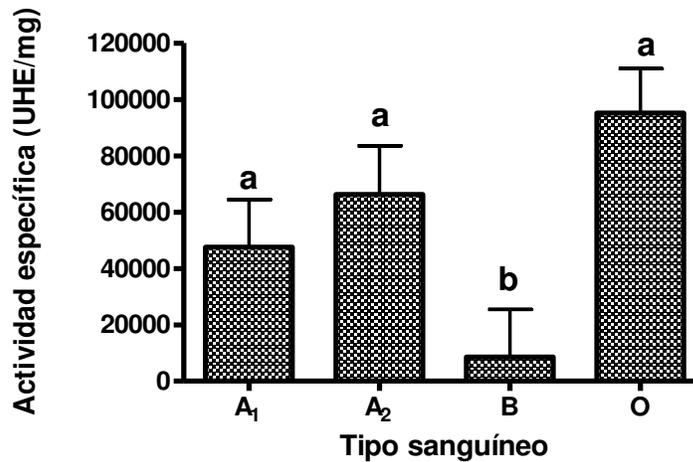
En la fracción 40-60% la actividad se mostro mayor en A₁, existiendo una diferencia significativa en relación con los grupos A₂ y B, tal como se muestra en la gráfica 5. Se puede ver que la afinidad es preferencial para A₁ y esto concuerda con lo encontrado para el EC y FP, lo cual sugiere que en esta fracción existe una lectina que presenta mayor afinidad para los carbohidratos de este grupo.

- Intervalo de concentración de 60-80%

Tabla 10. Actividad Hemaglutinante (AE) de la fracción 60-80% de la Chaya.

Grupos Sanguíneos	UHA	AE	C
A ₁	30,933 ± 10,935	47,590 ± 16,823	7.25 ± 2.73
A ₂	43,093 ± 11,186	66,297 ± 17,210	4.39 ± 1.34
B	55,467 ± 11,013	85,333 ± 16,943	1.96 ± 0.67
O	61,867 ± 10,270	95,179 ± 15,800	3.86 ± 1.35

Los datos corresponden a la media ± Error Estándar de 6 ensayos independientes por duplicado. Concentración de proteínas (0.38 mg/mL). UHA (Unidades de hemaglutinación), AE (actividad específica en UHA/mg de proteína), C (Mínima concentración de proteína necesaria para generar una hemaglutinación en µg/mL).



Gráfica 6. Actividad hemaglutinante (AE) de la fracción salina 60-80%. Los resultados representan la actividad específica (AE) la media ± Error Estándar de n=6 ensayos independientes por duplicado con diferencia significativa ($p < 0.05$).

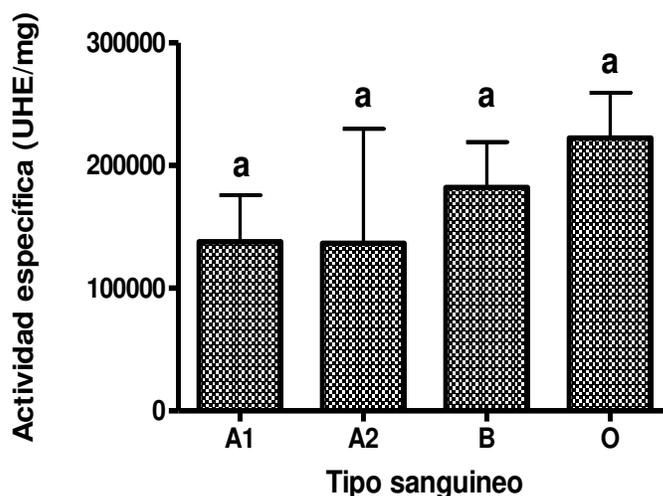
En la fracción 60-80% la actividad específica solo se observó mayor para el grupo O, como se muestra en la grafica 6, existiendo una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo B que es en donde muestra la menor afinidad.

- **Intervalo de concentración de 80-100 % PP**

Tabla 11. Actividad Hemaglutinante (AE) de la fracción 80-100 % PP salino de la Chaya.

Grupos Sanguíneos	UHA	AE	C
A ₁	28,075 ± 11,087	137,956 ± 37,911	1.64 ± 0.63
A ₂	40,960 ± 27,981	136,533 ± 93,270	0.7 ± 0.05
B	54,613 ± 11,148	182,044 ± 37,160	0.10 ± 0.02
O	27,723 ± 11,114	222,287 ± 37,048	1.59 ± 0.64

Los datos corresponden a la media ± Error Estándar de 6 ensayos independientes por duplicado. La concentración de proteínas (0.19 mg/mL). UHA (Unidades de hemaglutinación), AE (actividad específica en UHA/mg de proteína), C (Mínima concentración de proteína necesaria para generar una hemaglutinación en µg/mL).



Gráfica 7. Actividad hemaglutinante (AE) de la fracción 80-100% PP salino. Los resultados representan la actividad específica (AE) la media ± Error Estándar de n=6 ensayos independientes por duplicado sin diferencia significativa ($p < 0.05$).

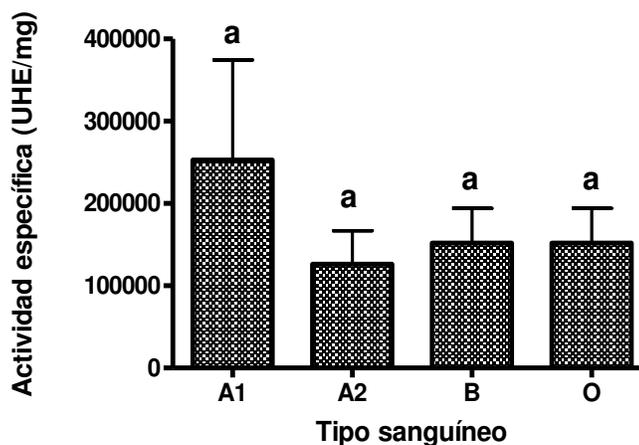
En la fracción 80-100% de la precipitación con sulfato de amonio se presentó mayor actividad específica para los grupos O y B, como se ve en la grafica 7.

- **Intervalo de concentración de 80-100 % SB**

Tabla 12. Actividad Hemaglutinante (AE) de la fracción 80-100 % SB de la Chaya.

Grupos Sanguíneos	UHA	AE	C
A₁	44,373 ± 27,178	252,840 ± 121,784	0.09 ± 0.04
A₂	34,133 ± 126,420	126,240 ± 40,507	0.11 ± 0.04
B	40,960 ± 11,423	151,704 ± 42,308	0.07 ± 0.02
O	40,973 ± 11,422	151,753 ± 42,302	45.07 ± 18.37

Los datos corresponden a la media ± Error Estándar de 6 ensayos independientes por duplicado. La concentración de proteínas (0.12 mg/mL). UHA (Unidades de hemaglutinación), AE (actividad específica en UHA/mg de proteína), C (Mínima concentración de proteína necesaria para generar una hemaglutinación en µg/mL).



Gráfica 8 Actividad hemaglutinante de la fracción 80-100% SB. Los resultados representan la actividad específica (AE) la media ± Error Estándar de n=6 ensayos independientes por duplicado sin diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la fracción 80-100% del sobrenadante se observó que actividad específica se mantiene casi constante para los grupos A₂, B y O manteniéndose una afinidad preferencial por A₁ como se encontró para el EC. Lo anterior sugiere que aun que la precipitación de las proteínas fue casi completa y que en el SB existen todavía lectinas, aunque en menor cantidad, a pesar de que en esta fracción la concentración proteica es muy baja.

Adicionalmente se también se evaluó la actividad específica (AE) de EC, FP y PP salina 20-40% utilizando eritrocitos sanguíneos de diferentes animales, tal y como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 13: Comparación de la Actividad específica (AE) con sangre de diferentes animales.

TIPO DE SANGRE	EC		FP		PP 20-40%	
	AE	C	AE	C	AE	C
Bovino	6,919	11.56	9,481	8.4	1,103	72.5
Ovino	13,838	5.78	593	135.0	2,207	36.25
Porcino	55,351	1.45	1,185	67.5	0	0
Cunícola	6,919	11.56	4,741	16.9	0	0

UHA (Unidades de hemaglutinación), AE (actividad específica en UHA/mg de proteína), C (Mínima concentración de proteína necesaria para generar una hemaglutinación en µg/mL). [Proteínas]= EC (1.33 mg/mL), FP (1.08 mg/mL) y PP 20-40% (0.42 mg/mL).

En la tabla anterior se puede observar que las lectinas presentes en las hojas de chaya también muestran una afinidad para los diferentes grupos sanguíneos animales. Se puede ver que las lectinas muestran una mayor afinidad para el grupo sanguíneo porcino en el caso de EC; en la FP se muestra mayor afinidad para el grupo sanguíneo de bovino y en la fracción salina de 20-40% se ve una mayor afinidad para el grupo sanguíneo de ovino.

Una vez comprobada la presencia de lectinas en las diferentes fracciones obtenidas por la precipitación con sulfato de amonio se seleccionaron las que presentaron mayor actividad hemaglutinante y las que presentaron una mayor cantidad de proteína, lo anterior con la finalidad de iniciar la separación y purificación de las lectinas así como su identificación particular.

- **Electroforesis SDS-PAGE.**

Con el fin de determinar el grado de heterogeneidad de las fracciones proteicas obtenidas y calcular el peso molecular aparente se realizó una electroforesis en SDS-PAGE la cual se muestra en la siguiente figura:

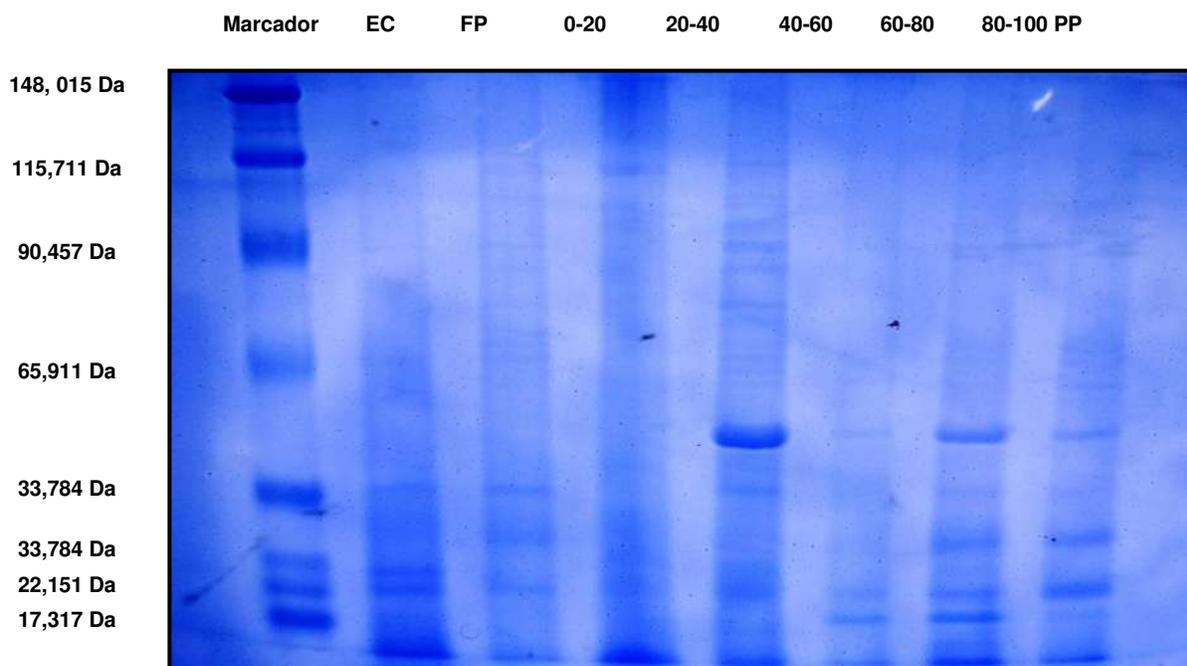


Figura.5. Gel de electroforesis (SDS-PAGE). Se muestran gran cantidad de bandas que corresponden a diferentes fracciones utilizadas: EC (extracto crudo), FP (fracción proteica) y fracciones de obtenidas por precipitación con sulfato de amonio 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100% .El peso molecular aparente (PMA) aproximado va de 148,015 a 17,317 Da.

Se puede apreciar que tanto en el EC como en la FP se encontró una gran cantidad de proteínas. En el resto de la fracciones se muestran diferentes tipos de proteínas que se separaron en base a los diferentes intervalos de concentración salina

El intervalo de 20-40% fue en el que se observó la mayor concentración de proteínas y la mayor actividad específica y por lo tanto fue la que se consideró para continuar el proceso de purificación mediante cromatografía.

- **Cromatografía de exclusión molecular**

Una vez montada la columna la muestra concentrada (liofilizada) se resuspendió en 1.2 mL de PBS y el cual se hizo pasar por la columna. Se colectaron muestras a diferentes intervalos de tiempo mediante un colector automático. Al terminar la separación de la muestra se cuantificó la cantidad de proteína graficando los datos obtenidos en un cromatograma como se muestra a continuación:

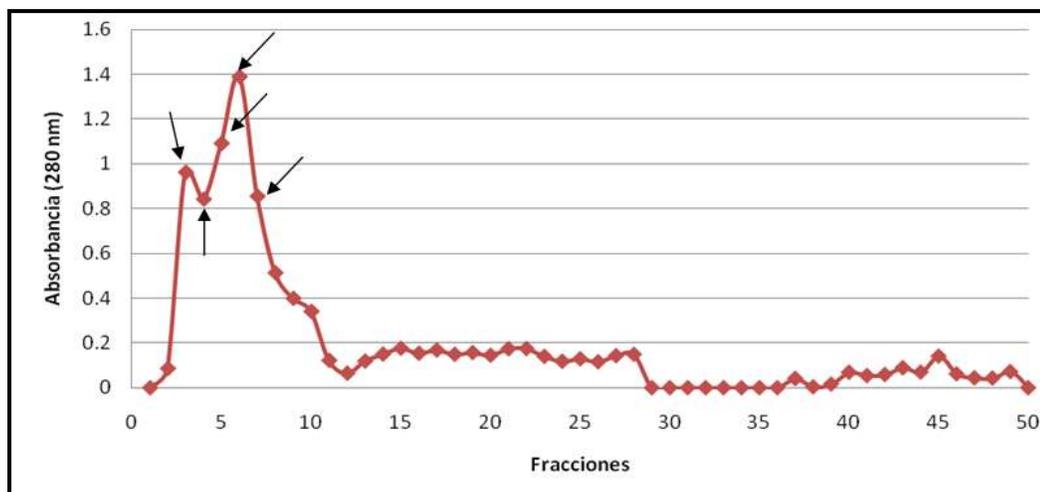


Figura.6. Cromatograma. Muestra (intervalo salino 20-40%) separada por Cromatografía de Exclusión Molecular.

A las fracciones obtenidas se les determinó la actividad hemaglutinante para identificar las fracciones que contienen lectinas. Los resultados se muestran a continuación

Tabla 14. Actividad Hemaglutinante (AE) de fracciones obtenidas por Cromatografía de exclusión molecular.

Fracciones	LHA				AE (UHE/mg prot)				C (ug/mL)			
	A1	A2	B	O	A1	A2	B	O	A1	A2	B	O
3	163,840	2,560	1,280	640	132710	1971	985	492	0.38	24.06	48.12	96.25
4	10240	0	163840	163840	246	0	126,147	126,147	6.32	0	0.38	0.38
5	163840	0	163840	20480	126,147	0	126,147	15,769	0.38	0	0.38	3.00
7	0	0	160	160	0	0	123	123	0	0	385.00	385.00
8	0	0	0	40960	0	0	0	33,177	0	0	0	1.58
9	0	20,480	0	0	0	17,203	0	0	0	0.33	0	0.00
10	1,280	163,840	0	5,120	1,100	140,902	0	4,403	53.75	0.42	0	1.68
14	0	81,920	0	0	0	75,366.00	0	0	0	0.90	0	0
17	0	40,960	0	0	0	36,454.00	0	0	0	1.74	0	0
20	0	5,120	0	0	0	4,710	0	0	0	14.38	0	0
22	0	0	5,120	40,960	0	0	4,966	39,731	0	0	15.16	1.90
23	20,480	320	20,480	1,280	40,140	627	40,140	2,508	7.66	490.00	7.66	122.50
26	0	0	163,840	163,840	0	0	38,912	38,912	0	0	0.47	0.47
28	163,840	0	163,840	163,840	152,371	0	152,371	152,371	0.46	0	0.46	0.46
29	40,960	160	1,280	2,560	27,033.00	105.00	844	1,689	1.30	330.00	41.25	20.63

Tomando en cuenta la tabla anterior se seleccionaron las fracciones que presentaron mayor actividad hemaglutinante (fracciones 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 14 y 18) y en base a esto se decidió realizar una electroforesis (SDS-PAGE) para determinar la heterogeneidad y pureza de las lectinas presentes en cada una de las fracciones tal como se muestra en la siguiente figura:

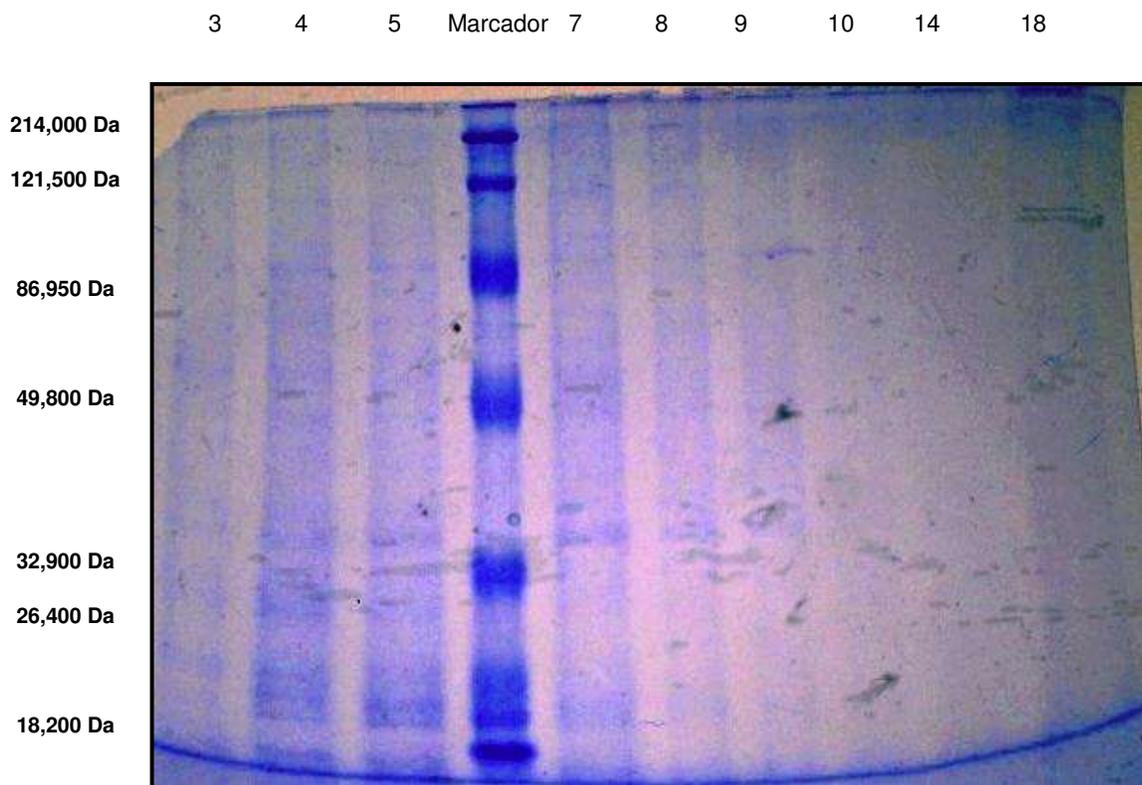


Figura.7. Gel de electroforesis (SDS-PAGE). Fracciones obtenidas por cromatografía exclusión molecular. Marcadores de Peso Molecular (PM) conocido para calcular PMA (Peso Molecular Aparente).

Se observa en el gel que las fracciones analizadas presentaron 7 proteínas mayoritarias con diferente patron de elusion. El peso molecular aparente (PMA) de dichas proteínas es: 148,015; 115,711; 90,45; 65,91; 33; 22,15 y 17,317 Da respectivamente.

- **Cromatografía se exclusión molecular en gel de agarosa**

Para continuar con la purificación de las lectinas se realizó una cromatografía de exclusión molecular pero ahora se considero separarlas en gel de agarosa. Las mezclas de proteínas en las que se observaron 7 proteínas diferentes. Se concentraron (mediante liofilización) y se re-suspendieron en PBS colocándose en la columna de separación. Durante la separación se recolectaron muestras a diferentes intervalos de tiempo mediante un colector automático y al terminar la separación se cuantificó la cantidad de proteína. Los datos anteriormente obtenidos se graficaron en un cromatograma como se muestra a continuación:

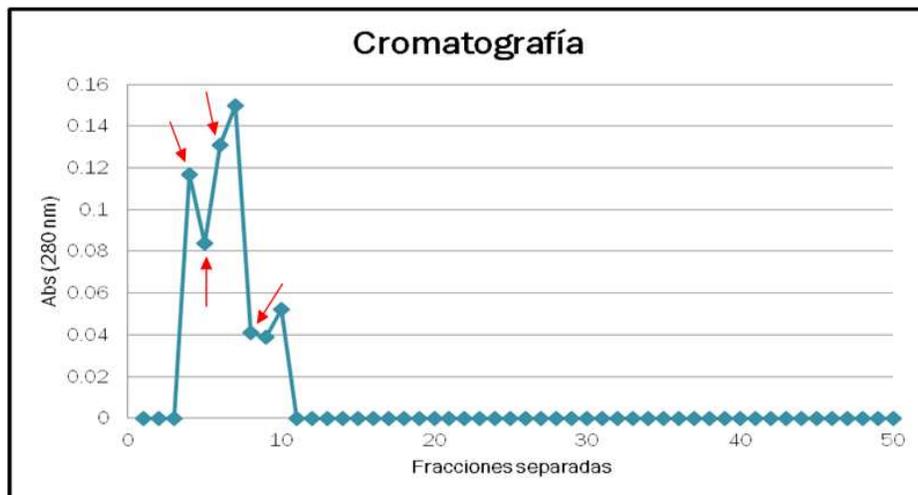


Figura.8. Cromatograma. B) Fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular con gel de agarosa, se señalan (con flechas negras) las fracciones que presentaron actividad específica.

Una vez obtenidas las fracciones se procedió a evaluar la actividad hemaglutinante (AE) arrojando los siguientes resultados:

Tabla 15. Actividad hemaglutinante (AE) de las fracciones obtenidas por cromatografía en agarosa.

Fracciones	AE (UHE/mg prot)				C (ug/mL)			
	A ₁	A ₂	B	O	A ₁	A ₂	B	O
4	350,085	0	0	0	0.23	0	0	0
5	60,952	0	0	0	1.310	0	0	0
6	78,168	0	0	0	1.02	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	15,610	0	0	0	5.13	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0

AE (actividad específica en UHA/mg de proteína), C (Mínima concentración de proteína necesaria para generar una hemaglutinación en $\mu\text{g/mL}$). [Proteínas]= 4 (0.117 mg/mL), 5 (0.08 mg/mL), 6(0.131 mg/mL) y 8 (0.041 mg/mL)

Como se puede observar en la tabla anterior, las fracciones que tuvieron actividad fueron 4, 5, 6 y 8. Cabe destacar que en cada fracción se observa una persistente actividad hemaglutinante (AE) solo con A₁, lo que sugiere que las lectinas presentes en cada una de las fracciones solo reconocen a los carbohidratos terminales de este tipo sanguíneo (N-Acetil-Galactosamina-D-Galactosa-L-Fucosa) mostrando una mayor actividad en la fracción 4. Lo anterior nos dio la pauta para continuar con el proceso de purificación.

Se decidió realizar otra electroforesis pero ahora de las fracciones anteriormente mencionadas. El gel fue teñido con plata como se muestra a continuación:

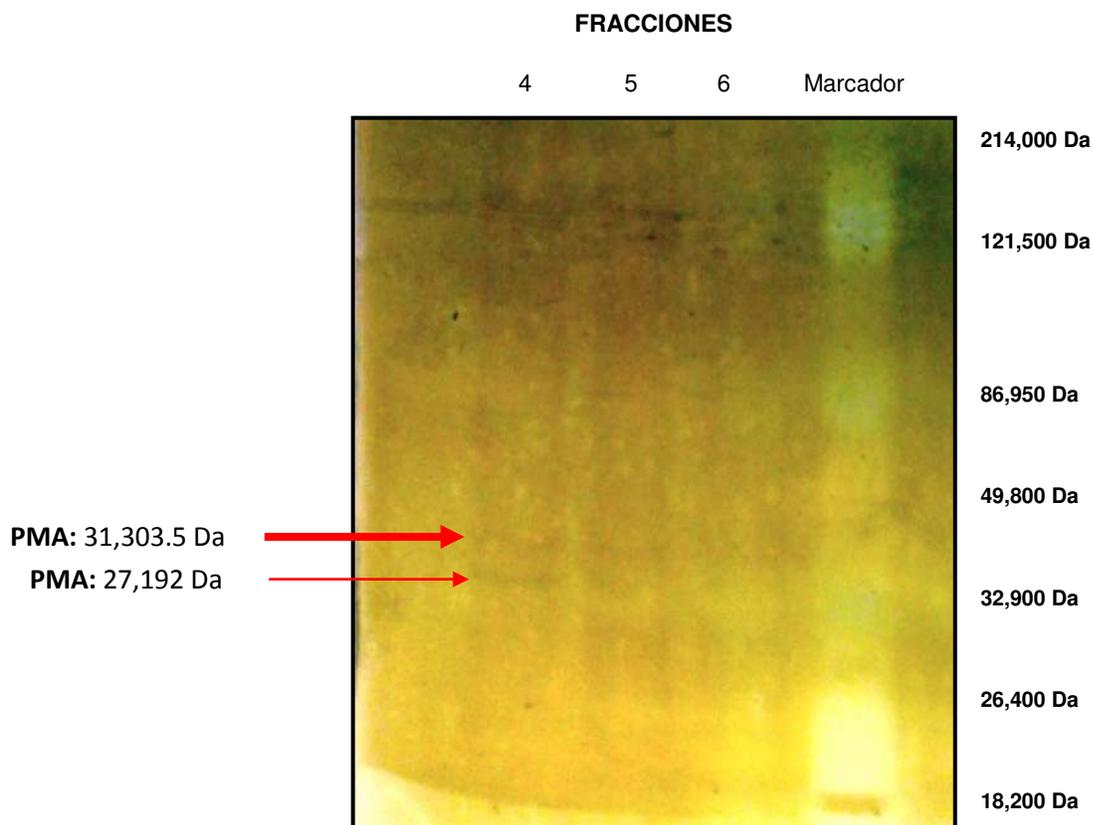


Figura. 9 .Gel de electroforesis (SDS-PAGE). Fracciones obtenidas por cromatografía con agarosa. Marcadores de Peso Molecular (PM) conocido para calcular PMA (Peso Molecular Aparente).

En el gel anterior se puede observar que en las fracciones 4, 5 y 6 teniendo un mismo patrón de bandas. En el caso de la fracción 4 se pueden ver 2 diferentes bandas que corresponden a dos lectinas diferentes con peso molecular aparente de 31,303 y 27,192 Da, respectivamente. Al igual que las demás fracciones (5 y 6) se observa la misma banda, y esta última corresponde a un solo tipo de lectina con peso molecular aparente (PMA) de 31,303 Da.

Por lo pronto, hasta ahora se tiene una lectina mayoritaria purificada con PMA de 31.303 kDa, con una actividad hemaglutinante de 40, 960 (UHA/mg de proteína) y que afín para el grupo sanguíneo A₁. Esta lectina reconoce a los carbohidratos superficiales de los eritrocitos de este grupo sanguíneo (N-Acetil-Galactosamina-D-Galactosa-L-Fucosa). Este resultado concuerda con lo que se ha visto en los ensayos anteriores.

Tomando en cuenta que en cada paso de purificación se reducía la cantidad de proteínas, se procedió a elaborar una tabla en la se estiman el porcentaje (%) de recuperación desde la cuantificación en el EC hasta la lectina pura como lo muestra la siguiente tabla:

Tabla 16. Porcentaje de recuperación de proteínas. Eficacia del método de purificación.

Eficacia del método de purificación de lectinas en hoja de Chaya (<i>Cnidoscolus chayamansa</i>)				
FRACCIÓN	CANTIDAD PROTEICA (μg proteína/ mL)	UHA	AE (UHA/mg proteína)	RENDIMIENTO (%)
Extracto Crudo	1330	140,434	105,590	100
Fracción proteica	1080	112,640	204,800	81.2
20-40% PP	580	71,680	106,598	43.6
Me1	150	10,240	68,267	11.3
Lectina de chaya (CchL)	43	5,120	119,070	3.2

Como se muestra en la tabla 16 se confirmo que el método de purificación es el indoneo, ya que tiene 13 veces mas recuperación de la proteína recuperada (4.3 mg de proteína). Al ser comparado con otro metodo de purificacion (por afinidad) como lo menciona Bashir *et al.* (2010) en su trabajo, en la purificacion obtienen 2.3% de rendimiento (que corresponde a 0.6 mg de proteína) (Bashir *et al.*, 2010) y en otro trabajo obtienen 0.15% de rendimiento (que equivale a 7.33 mg de proteína) (Adenike

et al., 2004). Con esto queda demostrado que el método utilizado en este trabajo es eficiente y el porcentaje de recuperación es bueno.

EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS

Afinidad a carbohidratos

Para determinar la afinidad que tienen las lectinas presentes en la chaya hacia diferentes carbohidratos se le realizó un ensayo en el cual se sometió al extracto crudo (EC), fracción proteica (FP) y intervalos salinos (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, PP 80-100% y SB 80-100%) a la acción de una mínima concentración de carbohidratos simples capaces de inhibir la hemaglutinación. Se tomó en consideración el tipo sanguíneo con el cual se mostró la mayor actividad hemaglutinante, que para tal caso fue el grupo A₁. En este ensayo se utilizaron los siguientes carbohidratos: Galactosa (Gal), N-Acetil-galactosamina (GalNac), Galactosa Acetilada (GalAcet), Glucosa (Glc), N-Acetil-glucosamina (GlcNAc), Fucosa (Fuc), Manosa (Man), Fructosa (Fruc), Xilosa (Xyl), Sacarosa (Sac), Ribosa (Rib), Lactosa (Lac), Ácido N-Acetil Neuramínico (NANA), maltosa (Malt) y un glicoconjugado (Glyco), y los resultados se pueden apreciar en la siguiente tabla:

Tabla 17. Afinidad a carbohidratos de EC, FP y PP salinas.

AFINIDAD A CARBOHIDRATOS (mMol)									
	EC	FP	0-20%	20-40%	40-60%	60-80%	PP 80-100%	SB 80-100%	Me 1
Gal	2.38419E-05	0.0015	0.00038	4.76837E-05	0.00005	2.38419E-05	4.76837E-05	0.024	4.76837E-05
GalNAc	2.38419E-05	0.00038	0.0015	4.76837E-05	4.76837E-05	2.38419E-05	9.53674E-05	0.00038	100
GalAcet	0.78125	4.76837E-05	0.00019	0.00038	9.53674E-05	2.38419E-05	0.00038	0.024	0.024414063
Glc	200	0.00076	0.012	1.56	0.20	0.00038	0.0031	0.78	0.024414063
GlcNAc	2.38419E-05	0.049	0.05	9.53674E-05	0.024	0.00076	1.56	100	3.125
Fuc	0.000190735	0.024	0.00038	0.00038	3.13	50	0.39	100	3.125
Man	4.76837E-05	0.024	6.25	0.39	0.024	50	0.39	100	100
Fruc	0.0031	12.5	6.25	2.38419E-05	100	25	2.38419E-05	12.5	100
Xyl	0.024	0.012	0.39	4.76837E-05	1.56	2.38419E-05	4.76837E-05	25	200
Sac	0.00076	0.0015	0.391	0.0015	0.0031	100	0.20	0.00038	3.125
Rib	0.098	0.00610	0.00076	0.39	0.78	0.098	0.0031	50	200
Lac	50	100	25	1.56	50	3.125	25	200	200
NANA	0.024	0.00305	0.024	2.38419E-05	50	0.098	50	25	25
Malt	25	25	50	25	200	0.098	0.39	25	200
Glyco	2.38419E-05	0.012	1.56	0.20	0.39	12.5	0.024	0.78	200

En la tabla anterior se puede apreciar que el extracto crudo presenta una mayor afinidad para la Galactosa (Gal)> N-Acetil-galactosamina (GalNAc)> N-Acetil-Glucosamina (GlcNAc)> glicoconjugado (Glyco). En caso de la FP se puede apreciar que la mayor afinidad es para galactosa acetilada (GalAcet)> N-Acetil-galactosamina (GalNAc), que también se observa en EC pero en menor afinidad, y glucosa (Glc).

En la fracción 20-40%, fracción de donde se obtuvo la lectina CchL, se puede apreciar una afinidad mayor para GlcNAc> GalNAc> Fruc> ácido neuramínico (NANA). Estas afinidades también se observaron para EC.

Por otro lado, se tomó en consideración para realizar afinidad a carbohidratos a las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular. Donde, mediante una electroforesis se ven evidenciadas siete proteínas mayoritarias, lo que dio como consecuencia que dichas fracciones fueran mezcladas. En la mezcla 1 (Me1) están contenidas las fracciones que mostraron mayor actividad hemaglutinante (fracciones 3,

4, 5 y 6) que corresponden a los picos más sobresalientes en el cromatograma (Figura 7). En la mezcla 2 (Me2) se encuentran las fracciones restantes, que también presentan una alta actividad hemaglutinante (fracciones 22, 23, 26, 28, 29). En ambas mezclas dicha actividad demuestra la presencia de lectinas.

Tabla 18. Afinidad a carbohidratos de la mezcla 1 y 2 (Me1 y Me2) Cromatografía de exclusión molecular.

CARBOHIDRATOS	Mínima concentración (mMol)	
	Me 1	Me 2
Gal	4.76837E-05	3.125
GalNAc	100	200
GalAcet	0.024414063	200
Glc	0.024414063	4.76837E-05
GlcNAc	3.125	0.000190735
Fuc	3.125	200
Man	100	100
Fruc	100	200
Xyl	200	200
Sac	3.125	200
Rib	200	200
Lac	200	200
NANA	25	25

En la tabla anterior se puede apreciar que en la Me1 existe una marcada afinidad hacia Galactosa (Gal), seguida de Galactosa acetilada (GalAc)> Glucosa (Glc) y el resto de los carbohidratos analizados. Esto concuerda con las afinidades vistas con el extracto crudo (EC) y la fracción proteica (FP) donde se puede observar que se mantiene una afinidad mayor hacia Galactosa (Gal)>galactosa acetilada (GalAcet)> glucosa (Glc) (Tabla 17). En cambio, en la mezcla 2 (Me2) se puede apreciar que la mayor afinidad es para Glucosa (Glc) >N-acetilglucosamina (GlcNAc) >Galactosa (Gal).

Dependencia de pH

Para observar la actividad de las lectinas con respecto al pH se evaluó la AE variando el pH del PBS usado en el ensayo de hemaglutinación en intervalos de ± 0.2 . Se utilizó el grupo sanguíneo con el que se observó mayor actividad hemaglutinante, que como lo hemos visto en ensayos anteriores fue el grupo A₁, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 19. Dependencia de pH para EC, FP y PP salinas.

	DEPENDENCIA DE pH							
	ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE (UHA/mg prot)							
	EC	FP	0-20 %	20-40%	40-60%	60-80%	80-100% pp	80-100% sb
5.0	27,676	1,185	9,660	17,655	334,367	287,439	409,600	1,024,000
5.2	110,703	593	9,660	8,828	334,367	287,439	409,600	1,024,000
5.4	110,703	593	4,830	8,828	334,367	287,439	409,600	16,000
5.6	110,703	37,926	4,830	8,828	334,367	287,439	409,600	32,000
5.8	110,703	37,926	1208	653	287,439	6,400	409,600	32,000
6.0	110,703	9,481	1208	552	334,367	17,965	409,600	32,000
6.2	55,351	9,481	1208	1103	334,367	17,965	409,600	128,000
6.4	110,703	9,481	1208	4,414	83,592	17,965	409,600	64,000
6.6	110,703	4741	2,415	70,621	167,184	143,719	409,600	128,000
6.8	110,703	37,926	1208	141,241	167,184	17,965	409,600	128,000
7.0	27,676	9,481	77283	141,241	167,184	143,719	409,600	128,000
7.2	55,351	4,741	77283	141,241	334,367	143,719	51,200	51,200
7.4	55,351	2,370	38642	141,241	334,367	143,719	51,200	128,000
7.6	55,351	2,370	19321	282,483	334,367	143,719	51,200	256,000
7.8	55,351	1,185	19,321	70,621	334,367	287,439	51,200	128,000
8.0	55,351	37,926	9,660	282,483	334,367	287,439	51,200	128,000
8.2	55,351	9,481	1208	282,483	334,367	287,439	102,400	128,000
8.4	55,351	9,481	1,208	282,483	334,367	287,439	51,200	128,000
8.6	55,351	9,481	38,642	282,483	334,367	287,439	51,200	128,000
8.8	55,351	4,741	38,642	70,621	10,449	287,439	51,200	128,000
9.0	55,351	4,741	38,642	282,483	20,898	287,439	51,200	4,000

En la tabla anterior se puede observar que la mayor actividad en el EC se da en un intervalo de pH 5.2-6.2, donde hay una disminución y un aumento a 6.4 a 6.8. En el caso de la FP, se da una AE mayor a pH 5.6, 5.8, 6.8 y 8.0.

Haciendo referencia a intervalo salino 20-40%, se observó la mayor actividad en los intervalos de pH 6.8 a 7.6 y 8.0 a 8.6. Con esto podemos ver que las lectinas presentes tienen actividad hemaglutinante a pH poco ácidos y en el intervalo 20-40% se da actividad a pH casi neutros y con baja alcalinidad. En el intervalo salino 0-20% las lectinas muestran una AE mayor a pH neutro de 7.0-7.2, para disminuir gradualmente conforme aumenta el pH. En cambio, en el intervalo salino 40-60%, se observó que la AE de veía aumentada y estable a pH 5.0 a 6.2 disminuyendo en 6.4 para alcanzar de nuevo una estabilidad en la AE en 7.2 a 8.6.

En el intervalo salino 60-80% la AE se presenta mayor en dos diferentes intervalos de pH el primero fue a 5.0-5.6, y el segundo fue a 7.8-9.0. Aquí se pudo observar que las lectinas presentes se mantienen estables en pH ácidos y básicos, sin pasar por la neutralidad. En los intervalos salinos donde se encuentra la menor cantidad de lectinas, la AE se mantuvo estable a pH de 5.0 a 7.0, lo anterior para el intervalo salino 80-100% PP. En el caso de 80-100% SB, se ve que la AE es mayor a pH ácido de 5.0-5.2 disminuyendo paulatinamente hasta observar que de nueva cuenta aumentaba la AE a pH de 7.4-8.8, manteniéndola estable.

Con este ensayo se observó que las lectinas presentes variaban su actividad específica (AE) de acuerdo al pH. Adicionalmente, se vio que muchas de ellas se adaptaban a las diferentes condiciones del medio ya sea que fuera alcalino o ácido.

Dependencia de temperatura

La dependencia de las proteínas a la temperatura se ve reflejada en la desnaturalización de las mismas, por lo que se sometió a diferentes condiciones de temperatura a EC, FP e intervalos salinos evaluando así AE mediante ensayos de hemaglutinación mostrando los siguientes resultados:

Tabla 20. Termoestabilidad de EC, FP y PP salinas.

Temperatura	AE (UHA/mg proteína)							
	EC	FP	0-20 %	20-40%	40-60%	60-80%	PP 80-100%	SB 80-100%
4°C	55,351	75,852	9,660	8,828	10,449	17,965	6,400	2,000
15°C	55,351	37,926	19,321	5,52	2,612	17,965	6,400	1,000
22°C	110,703	9,481	4,830	1,306	2,246	1,600	6,400	1,000
36°C	110,703	4,741	4,830	1,103	2,612	1,126	6,400	1,000
40°C	110,703	37,926	4,830	4,414	5,224	2,246	1,600	1,000
60°C	55,351	18,963	4,830	4,414	5,524	2,246	1,600	1,000
80°C	110,703	18,963	9,660	17,655	5,224	8,982	800	0
100°C	110,703	9,481	4,830	17,655	5,224	8,982	800	0

En la tabla anterior se pueden ver la actividad hemaglutinante de las proteínas que están presentes en EC, FP y los intervalos de precipitación salina (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, PP 80-100% y SB 80-100%). Las diferentes muestras se incubaron a temperaturas de 4, 15, 22, 36, 40, 60, 80 y 100° C. El grupo sanguíneo que se utilizó fue el A₁, este grupo es el que se ha ido utilizando en los ensayos anteriores.

Se pudo observar que las lectinas en el EC mantienen una actividad óptima a temperatura de 22 a 100°C. Esto es un dato interesante ya que nos puede sugerir que las proteínas (lectinas) siguen viables aun después de someter la hoja de chaya a cocción. En la FP se observa la mayor AE a una temperatura de 40°C.

En el intervalo de 0-20% la mayor AE se muestra a 15°C. En el intervalo de 20-40% se encontró que la mayor AE esta de 80-100°C, lo que claramente indica que las lectinas en ésta fracción son termo-resistentes. Con respecto a 40-60%, se observó que la mayor AE se obtuvo con 4°C, además se la AE se mantuvo estable de 40-100°C. En el intervalo 60-80%, se observó que se mantiene la AE en todas las temperaturas analizadas, pero sobre todo la mayor actividad se observó de 4-15°C, lo que indica que las lectinas presentes en ésta fracción son más sensibles a la

temperatura. Esta sensibilidad se evidenció mucho más en las fracciones de saturación de 80-100% PP y SB, donde las lectinas presentes pierden AE conforme se da el aumento de temperatura, dando como resultado una muestra de su evidente desnaturalización.

Dependencia de cationes

Para determinar la dependencia de cationes se utilizaron las siguientes sales en solución: Cloruro de calcio (CaCl_2), Cloruro de Magnesio (MgCl_2), Fosfato de potasio (KH_2PO_4) y fosfato de sodio (Na_2HPO_4). Cada muestra se trató con un agente quelante (EDTA) y posteriormente se realizaron ensayos de hemaglutinación para comparar la AE de las lectinas presentes en las diferentes muestras con y sin tratamiento con EDTA, lo anterior para comprobar la dependencia de cationes. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 21. Dependencia de cationes de EC, FP e intervalos de precipitación salina.

EDTA	CONTROL		CaCl_2		MgCl_2		KH_2PO_4		Na_2HPO_4	
	AE	C	AE	C	AE	C	AE	C	AE	C
EC	292571	0.27	292571	0.273	1170286	0.068	1170286	0.068	292571	0.273
FP	146286	0.55	2340571	0.034	2340571	0.034	1170286	0.034	36571	2.188
0-20 %	1024000	0.08	16384000	0.005	16384000	0.005	2340571	0.005	4096000	0.020
20-40%	85333	0.94	10922667	0.007	10922667	0.007	16384000	0.007	10922667	0.007
40-60%	6553600	0.01	6553600	0.012	6553600	0.012	6553600	0.012	6553600	0.012
60-80%	819200	0.10	6553600	0.012	6553600	0.012	6553600	0.012	6553600	0.012
80-100% pp	0	0.00	5461333	0.015	5461333	0.015	5461333	0.015	5461333	0.015
80-100% sb	0	0.00	81920000	0.001	81920000	0.001	81920000	0.001	81920000	0.001
S/EDTA	CONTROL		CaCl_2		MgCl_2		KH_2PO_4		Na_2HPO_4	
	AE	C	AE	C	AE	C	AE	C	AE	C
EC	292571	0.27	1170286	0.068	1170286	0.068	1170286	0.068	292571	0.273
FP	146286	0.55	2340571	0.034	1170286	0.034	2340571	0.034	73143	1.094
0-20 %	4096000	0.02	16384000	0.005	2340571	0.005	16384000	0.005	16384000	0.005
20-40%	10922667	0.01	10922667	0.007	16384000	0.007	10922667	0.007	10922667	0.007
40-60%	1638400	0.10	6553600	0.012	10922667	0.012	6553600	0.012	6553600	0.012
60-80%	6553600	0.01	6553600	0.012	6553600	0.012	6553600	0.012	6553600	0.012
80-100% pp	170667	0.47	2730667	0.029	2730667	0.015	2730667	0.029	2730667	0.029
80-100% sb	80000	1.00	163840000	0.0005	163840000	0.0005	163840000	0.0005	163840000	0.0005

En la primera parte de la tabla se muestran los resultados sin el tratamiento con EDTA de las muestras analizadas (control) y añadiendo cada uno de los iones probados. Como se puede apreciar los valores obtenidos en el control son idénticos a los previamente obtenidos, sin embargo cuando se añadieron los iones los valores incrementaron en las fracciones donde contienen lectinas dependientes de cationes.

Esto se comprobó con el tratamiento del agente quelante, en el control se encontró que tanto el EC y FP no mostraron cambios debido a la acción amortiguadora del resto de las proteínas presentes. En los intervalos de concentración que poseen diferentes tipos de proteínas se comportaron de diferentes formas dependiendo de la dependencia de cationes, es sorprendente que en la fracción de saturación se encuentran todas las proteínas dependientes ya que sin cationes no se observó actividad.

Por otro lado, la fracción proteica al ser tratada con EDTA muestra la misma actividad que la observada en el control, sin embargo al exponerla a KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 disminuye, lo que hace suponer que las lectinas presentes son más activas en presencia de K^+ y Na^+ .

En el intervalo salino de precipitación 20-40%, que es con el que se siguió la purificación de la lectina de chaya, se observó que con el tratamiento con EDTA se disminuye la AE de forma importante con respecto a control, sin embargo mantiene su AE al tratarla con iones. En el intervalo de concentración 0-20% la AE disminuye al haberla tratado con el agente quelante EDTA, sin embargo al someterla a la acción de KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 su actividad se elevó, lo cual supone que las lectinas presentes en este intervalo dependen de K^+ y Na^+ para llevar a cabo la hemaglutinación.

En el intervalo de 40-60% se observó una disminución de AE después del tratamiento con EDTA y al ser tratada con MgCl_2 se observó que la AE disminuyó lo cual nos dice que las lectinas que están presentes dependen de Mg^{++} para su actividad.

En el intervalo 60-80% se observo que la AE se redujo después del tratamiento con el agente quelante en comparación con el control, pero al ser expuesta a los diferentes iones no se observaron cambios.

Con respecto a los intervalos de PP y SB 80-100% se observó una evidente ausencia de actividad después del tratamiento el agente quelante EDTA en el control, y esta actividad es recuperada posteriormente en baja actividad después de tratarlas con los diferentes iones. A pesar de que en estos intervalos se encuentra una concentración de lectinas mucho menor, la AE muestra que las lectinas presentes dependen de Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ y Na^+ para llevar a cabo la hemaglutinación.

Actividad antibacteriana

Dentro de la actividad biológica se evaluó la acción que ejerce el extracto crudo (EC) y la fracción proteica (FP) de la chaya frente a bacterias patógenas para el hombre las cuales son causantes de infecciones tanto gastrointestinales como urinarias. La actividad antibacteriana se determinó por medio del método de difusión en disco.

Para iniciar con la evaluación biológica (antibacteriana) de la lectina de chaya, primero se realizo una prueba con EC:

Tabla 22. Evaluación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de EC.

MICROORGANISMO	HALOS DE INHIBICION	
	CIM	
	EC [1.48 mg prot/mL]	C(+) [40 mg/mL]
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.8 cm	1.5 cm

EC= Extracto crudo

C (+) = gentamicina (80 mg/2mL)

CIM=Concentración mínima inhibitoria (mg/mL)

En la tabla anterior se muestran una importante actividad antibacteriana por parte de EC de la hoja de chaya, con lo cual confirmamos su uso popular como antibacteriano natural. Como control positivo se eligió un antibiótico comercial (gentamicina de 80 mg/ 2mL) para el caso de una bacteria Gram (-) como lo es *Escherichia coli*.

En esta prueba se observa que existe una actividad antibacteriana de la chaya en contra de *Escherichia coli* ATCC 25922 representando una CIM de 1.48 mg proteína/mL.

- **Estandarización del antibiótico**

Como control positivo para el ensayo se eligió gentamicina de 80 mg/ 2mL y levofloxacino para bacterias Gram (-); este último se uso en presentación de tabletas de 750 mg que se pulverizaron y re-suspendieron en 5 mL de H₂O estéril. También se eligió ampicilina de 500 mg/ 2mL para bacterias Gram (+). Es importante mencionar que la estandarización se realiza con fines comparativos, tal como lo describe Álvarez *et al.* 2006 en su trabajo, lo anterior en relación con el efecto antibacteriano que de los productos naturales que se desea evaluar y los antibióticos comerciales.

Inicialmente se probó el antibiótico frente a las cepas antes mencionadas en donde se hicieron diluciones seriadas del antibiótico obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 23. Diluciones de antibiótico.

Microorganismo	Halos de inhibición (mm)										
	Diluciones antibiotico										
	1_1	1_2	1_4	1_8	1_16	1_32	1_64	1_128	1_256	1_512	1_1024
<i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC 27543	13	10	11	1.2	9	8	8	5	4	3	2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11	11	11	1.1	10.0	11	9	6	5	3	3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11	11	11	11	11	11	7	7	5	5	5

En el caso *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 se utilizó el antibiótico levofloxacino, en donde se tuvieron que hacer más diluciones como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 24. Diluciones de antibiótico levofloxacino.

Microorganismo	Halos de inhibición (cm)					
	Diluciones antibiotico					
	1:2,048	1:4,096	1:8,196	1:16,384	1:32,768	1:65,536
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	0.7	0.6	0.5	0.5	0.3	0.3

Como se puede observar en las tablas anteriores las diluciones corresponden a un halo de inhibición igual a 0.5 cm, las cuales representan las siguientes concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) del antibiótico:

Tabla 25. Concentración del antibiótico.

Dilución estándar Halos de inhibición =0.5 cm		Concentración mínima inhibitoria (mg/mL)
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27543	1:128	0.63
2. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1:256	1.95
3. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1:256	0.31
4. <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	1:8,196	0.18

Una vez estandarizado el antibiótico se procedió a realizar las inhibiciones bacterianas con EC, FP, pigmentos (acetónicos y etanólicos). El ensayo se inició creciendo las cepas en 5 mL de caldo Mueller-Hinton con un ajuste de crecimiento a 0.5 escala de Mc Farland (Henry, 2007).

Tanto el EC y la FP se diluyeron en base a la concentración de proteínas que inicialmente tenía cada uno. Se hace referencia a lo anterior debido a que es el objeto de estudio y con lo que se pretende demostrar la acción antibacteriana de dichas proteínas (lectinas).

Tomando en consideración la cantidad de proteínas que hay en cada dilución se procedió a realizar ensayos de inhibición evaluando la concentración inhibitoria mínima (CIM) en mg de proteína/ mL. El medio de cultivo utilizado para realizar esta actividad antibacteriana fue el agar Mueller-Hinton (de acuerdo con la *NCCLS*). También se realizó la inhibición bacteriana probando pigmentos separados al inicio de la investigación. Estos fueron diluidos en DMSO, el cual también fue tomado como control negativo. En el caso de EC y FP como control negativo se tomó agua estéril, tal como se muestra a continuación:

Tabla 26. Inhibición bacteriana y cálculo de la CIM.

Halos de inhibición (cm)							
EC							
CIM (mg/mL)	1.48	0.74	0.37	0.19	C (+)	C (-)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	-	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	-	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.2	0.2	0.2	0.1	0.5	-	
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	0.1	0.2	0.2	0.2	0.5	-	
FP							
CIM (mg/mL)	1.08	0.54	0.27	0.14	C (+)	C (-)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	-	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	-	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.2	0.2	0.2	0.1	0.5	-	
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-	0.1	0.1	0.1	0.5	-	
PI ACET							
CIM (mg/mL)	100	50	25	12.5	C (+)	C (-)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.2	0.2	-	-	0.5	-	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	0.1	0.1	0.5	-	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	0.1	0.1	0.1	0.5	-	
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	0.1	-	-	-	0.5	-	
PI OH							
CIM (mg/mL)	100	50	25	12.5	C (+)	C (-)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	0.5	-	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	-	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	-	
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-	-	-	-	0.5	-	

EC= Extracto crudo

C (+) para Gram (-)= gentamicina (80 mg/2mL);
levofloxacino (750 mg)

C (+) para Gram (+)= ampicilina (500 mg/2mL)

C (-) para pigmentos= DMSO

C (-) para FP y EC= agua estéril

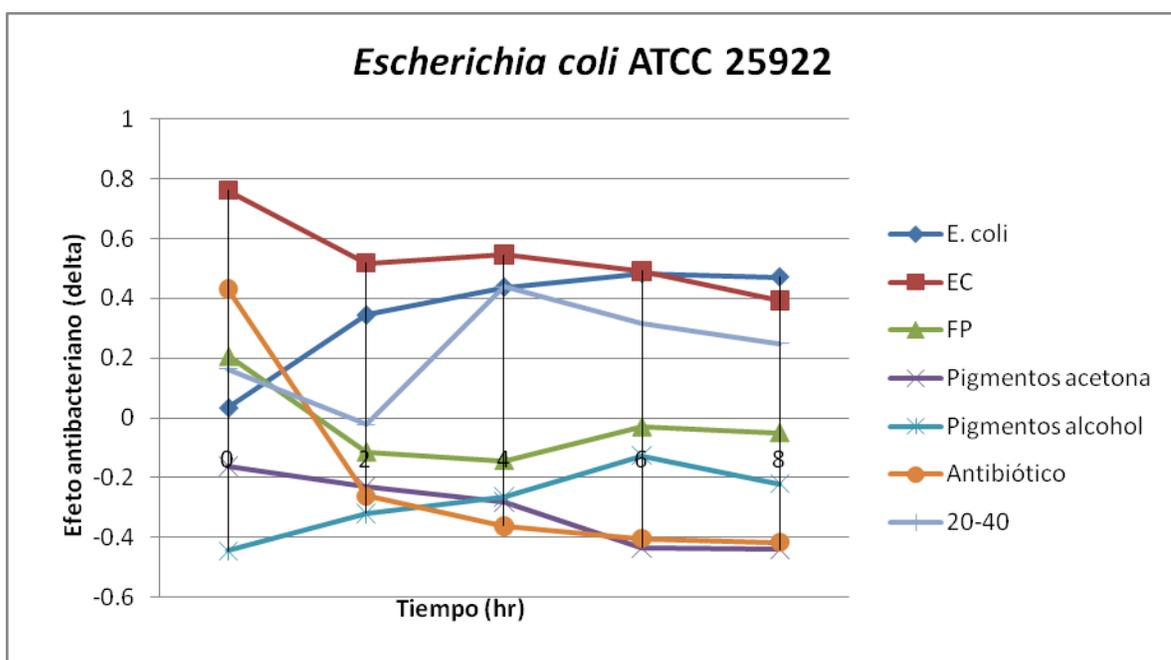
CIM=Concentración mínima inhibitoria (mg/mL)

PI ACET= Pigmentos acetónicos

PI OH= Pigmentos alcohólicos

Comparando los resultados obtenidos para EC y FP con la técnica de Kirby-Bauer (Henry, 2007) actividad antibacteriana se ve en EC observándose casi similar en la FP, lo que supone que las proteínas y los pigmentos etanólicos son los mayores responsables de este efecto.

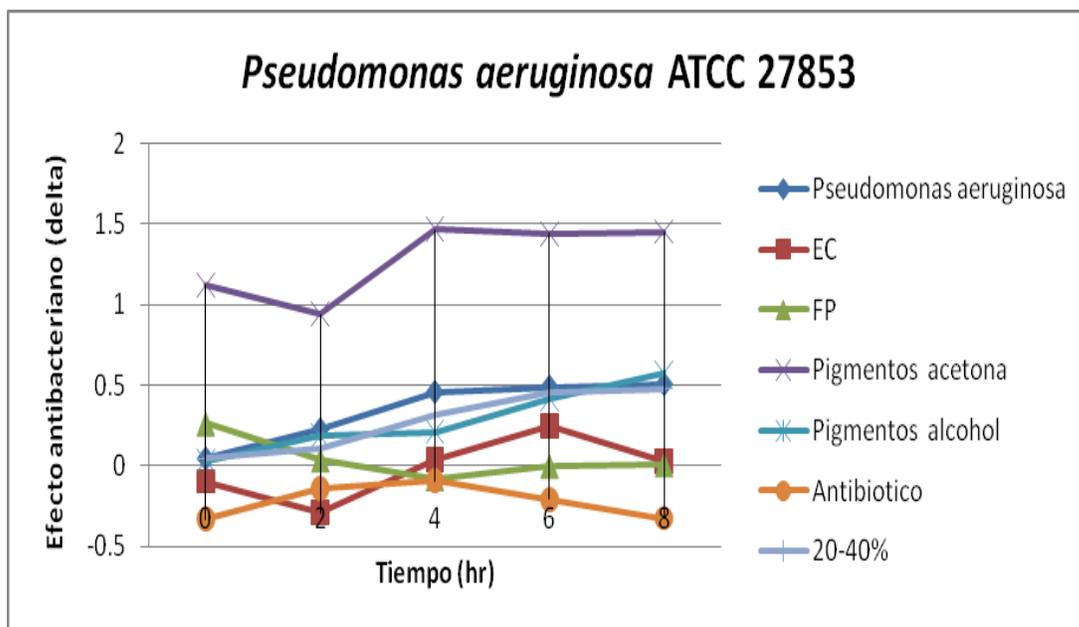
Para ver con mayor especificidad el efecto antibacteriano se realizaron curvas de crecimiento bacteriano como se explica en métodos, donde se sometieron a las especies bacterianas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 a la acción del EC, FP, PP 20-40% midiendo absorbancia a una longitud de onda de 630 nm, con el fin de confirmar el efecto antibacteriano a lo largo del tiempo, tal y como se muestra a continuación:



Gráfica 9. Crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* ATCC 25922 vs EC, FP, PP salino 20-40% y antibiótico (Gentamicina 80 mg/ 2mL).

Para confirmar el resultado obtenido y saber tanto el efecto a lo largo del tiempo así como la obtención de la CIM se graficó el efecto contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gráfica 9), corroborando el resultado obtenido con los halos de inhibición donde la CIM obtenida fue de 0.34 mg/mL, siendo la mayor especificidad del extracto crudo

contra ésta bacteria. En el caso de la FP se observó un decremento importante en el crecimiento, este efecto es medido con la diferencia de los blancos (tanto del medio de cultivo como el de FP). Lo anterior hizo más evidente dicho efecto y este fue observado a partir de las 2 h con una CIM de 0.67 mg proteína/ mL. Con respecto al intervalo salino 20-40%, al realizar la resta de los blancos (del medio de cultivo y FP) se observo el efecto a las 2 h con una CIM de 0.072 mg proteína/ mL. En cambio los pigmentos acetónicos, al restar los blancos se evidencio un efecto a partir de 2 h con una CIM 100 mg pigmentos/ mL. Los pigmentos etanólicos redujeron el efecto con una CIM igual a la anterior, pero se puede apreciar que los pigmentos separados con acetona mostraron un mayor efecto antimicrobiano que los pigmentos etanólicos.

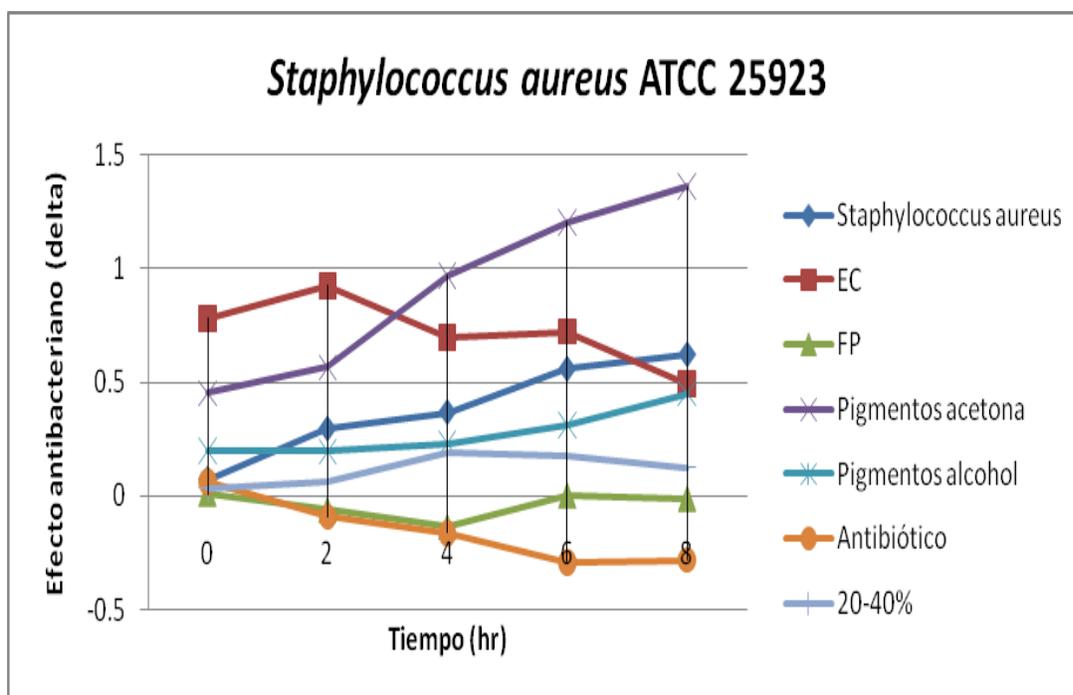


Gráfica 10. Crecimiento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 vs EC, FP, intervalo salino 20-40% y antibiótico (Gentamicina 80mg/ 2mL).

Al comprobar el resultado obtenido y saber tanto el efecto a lo largo del tiempo así como la obtención de la CIM, las curvas de crecimiento graficadas muestran efecto contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gráfica 10) en donde los resultados se comparan con los obtenidos con los halos de inhibición y donde la CIM obtenida fue de 0.69 mg/mL. El extracto crudo contra ésta bacteria evidencia una disminución del crecimiento a las 2 h (restando la absorbancia del medio de cultivo y EC, como tal) una

importante reducción en el crecimiento bacteriano. En cambio, en la FP se ve el efecto (al hacer la diferencia de la absorbancia total menos la de los blancos) a las 4 h con una CIM de 0.029 mg proteína/ mL. En este punto la reducción en el crecimiento coincide con la del antibiótico a pesar de que se tratan de un compuesto natural y uno sintético, respectivamente y que tienen CIM diferentes.

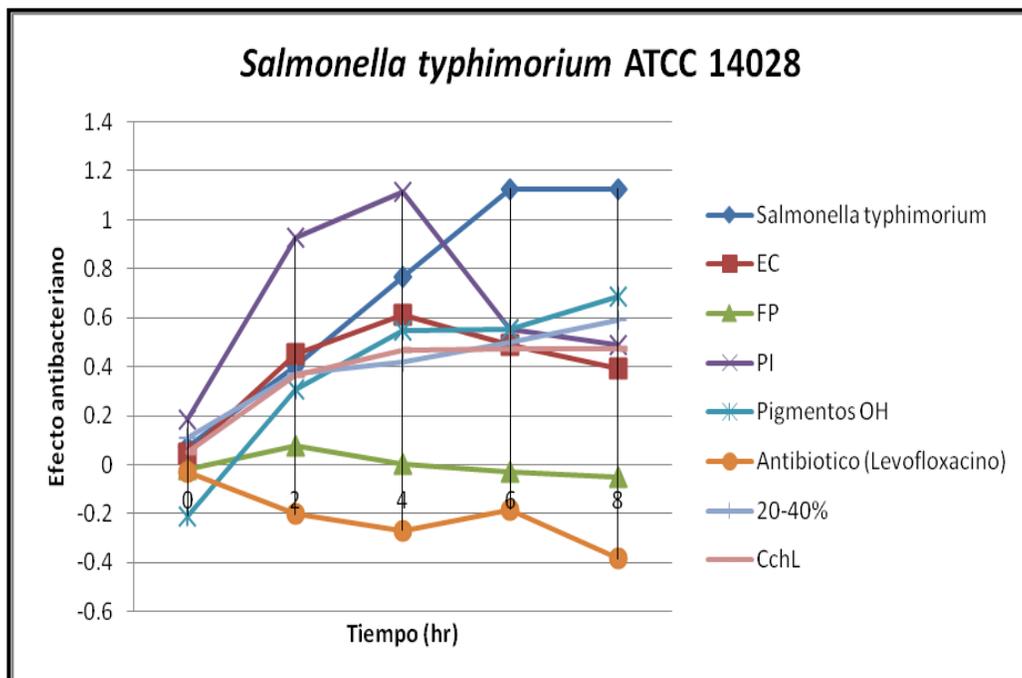
Los pigmentos tanto etanólicos como acetónicos no mostraron ningún efecto visible. El intervalo salino 20-40% tampoco mostro ningún efecto y el crecimiento bacteriano se observo ligeramente disminuido como se observa en la Gráfica 10.



Gráfica 11. Crecimiento bacteriano de *Saphylococcus aureus* ATCC 25923 vs EC, FP, PP salino 20-40% y antibiótico (Ampicilina 500 mg/ 2mL).

Con respecto al efecto contra *Saphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gráfica 11) se ve evidente (al realizar la diferencia de la absorbancia total menos los blancos de medio de cultivo, EC, FP, intervalo salino 20-40%, pigmentos etanólicos y acetónicos) que los resultados obtenidos mostraron que EC tiene un efecto antibacteriano a partir de las 4 h con una CIM 2.73 mg proteína/ mL. La FP tiene un efecto similar al que presenta el antibiótico que se mantiene hasta las 4 h con una CIM de 0.67 mg proteína/ mL. Con el intervalo salino 20-40% mostro un efecto a las 2 h con una CIM de 0.29 mg

proteína/ mL. Los pigmentos acetónicos no mostraron efecto alguno y con los pigmentos etanólicos se observa que se mantiene el crecimiento bacteriano hasta las 4 h con una CIM de 100 mg pigmentos/ mL.



Gráfica 12. Crecimiento bacteriano de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 vs EC, FP, PP salino 20-40% y antibiótico (Levofloxacino 750mg).

Para saber tanto el efecto antibacteriano a lo largo del tiempo y confirmar el resultado obtenido y así como la obtención de la CIM, se realizaron curvas de crecimiento donde se evidencia el efecto contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, (Gráfica 12) el cual se cuantifica al hacer la resta de la absorbancia que presentaron los blancos (medio de cultivo, EC, FP, intervalo salino 20-40% y pigmentos etanólicos y acetónicos). Con respecto al EC se observó el efecto antibacteriano a las 4 h con la CIM obtenida de 2.7 mg proteína/mL. La FP mostro un efecto importante a partir de las 4 h con una CIM de 0.34 proteína/mL evidenciando que las proteínas son las responsables de un efecto antibacteriano y este se mostro similar al antibiótico (Gráfica 12). En relación con el intervalo salino 20-40% se observo una disminución del crecimiento a las 2 h con una CIM de 0.145 mg proteína/ mL, demostrando la afinidad

que tienen las proteínas (lectinas) por esta bacteria. Tomando en cuenta lo anterior y el dato de que la lectina de chaya (CchL) se obtuvo a partir de este intervalo salino, el efecto antibacteriano observado fue la reducción del crecimiento bacteriano a partir de las 4 h con una CIM de 0.043 mg proteína/ mL. Además, que este efecto es similar al que tiene el intervalo salino 20-40% y los pigmentos etanólicos con una CIM de 100 mg pigmentos/ mL. A este respecto, los pigmentos (como antocianinas, flavonoides, carotenos, etc.) de la chaya presentan efectos antibacterianos al igual que los reportados para algunas otras plantas, como lo menciona la literatura (Nijveldt, *et al.* 2001; Paula y Martins, 2000; Nascimento, *et al.* 2000).

Al haber evaluado EC, FP, intervalo salino 20-40%, Cch de chaya se evidenció que la chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) si tiene efecto antibacteriano en contra las bacterias que son patógenas para el hombre, las cuales se mencionaron anteriormente, y que además son las causantes de infecciones urinarias y gastrointestinales. Adicionalmente, se observó también que las proteínas (lectinas) y los pigmentos etanólicos (PA) son los responsables mayoritarios del efecto antibacteriano de la hoja de chaya, comprobando la hipótesis planteada al inicio de la tesis.

X DISCUSIÓN

El principal objetivo de este trabajo fue identificar, purificar y caracterizar las lectinas presentes en las hojas de chaya (*Cnidoscolus chayamansa*). En algunos de los estudios encontrados sobre la chaya se ha visto que presenta flavonoides, a los cuales se les ha atribuido propiedades medicinales, a si como, un alto poder antioxidante (Pérez, 2003). Se ha visto también que presenta una alto contenido proteico (Kuti y Torres, 1996) y que además es usada como antimicrobiano natural. Sin embargo, hasta donde sabemos no existe ningún reporte referente a la presencia de lectinas en esta planta, por lo que este trabajo es el primero en demostrar su presencia y el primero en purificarla y caracterizarla.

En general, se sabe que las lectinas participan en numerosos procesos tanto fisiológicos como fisiopatológicos (Gallego del Sol *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2005; Sharon y Lis, 2001). Para este trabajo se inicio con la elaboración del extracto crudo (EC) tal como se realiza para el proceso de purificación de proteínas y como lo hicieron Oliveira *et al.* (2008), Bulgakov *et al.* (2004) y Oliviera *et al.* (2002) durante la purificación de lectinas en diferentes plantas.

Se evaluó la presencia de lectinas mediante ensayos de hemaglutinación siguiendo la metodología descrita por Debray *et al.* (1981) mostrando los resultados en la Tabla 2. Se pueden ver las diferentes actividades para los diferentes grupos sanguíneos humanos. En caso de la AE se pudo observar que estas lectinas mostraron mayor afinidad para el grupo sanguíneo A₁ seguida de una baja actividad para los demás grupo sanguíneos (Gráfica 1) (A₂, B y O). La hemaglutinación por parte de las lectinas presentes se debe a que reconocen los carbohidratos que están en la superficie de los eritrocitos de cada grupo sanguíneo humano basando su importancia en la interacción no covalente (reversible) que presentan las lectinas con los carbohidratos de la superficie del eritrocito dando como resultado la unión de muchas células y su posterior precipitación (Ambrosi *et al.*, 2005). Los grupos sanguíneos (A₁, A₂, B y O) contienen carbohidratos superficiales a los cuales constituyen el 55% de azúcares neutros (D-Glucosa, D-Galactosa, D-Manosa y L-Fucosa), 27.8% corresponden a hexosaminas (N-acetil-D-Glucosamina y N-acetil-D-Galactosamina) y

el 16.7% a N-acetil-D-ácido neuramínico (Schenkel-Brunner, 1995; Bladier *et al.*, 1979). Las diferencias en los resultados de la hemaglutinación en el EC se debe a que existen diferentes tipos de lectinas con distintas afinidades para carbohidratos, lo que se puede observar en la tabla 2 (en C) donde la mayor afinidad se presenta con A₁ y la menor con A₂. Al obtener estos resultados se cumplió con el primer objetivo.

Con la finalidad de comprobar que en el género y especie estudiada en éste trabajo contiene lectinas, se recolectaron diferentes muestras de hojas de chaya provenientes de diferentes lugares de Michoacán, como se describe en la Tabla 3. En cada una se evaluó la concentración de proteínas (Tabla 5). Las altas concentraciones proteicas cuantificadas coinciden con lo previamente reportado en la literatura (Rafiu y Olufunmilola, 2010; Kuti y Torres, 1997). En reportes previos se menciona que existen diferencias en concentraciones de proteínas entre cultivos incluso dentro de cada especie y subespecies del género *Cnidocolus* donde existen variaciones fenológicas (variaciones visibles en un vegetal por el clima y variaciones internas) y morfológicas (Ross-Ibarra *et al.*, 2002). Sin embargo, en éste trabajo no encontramos diferencias significativas en las concentraciones proteicas a pesar de tener diferente procedencia. Esto es relevante por el alto contenido nutricional de la chaya que se traduce en la gran importancia alimentaria para el consumo humano y para animales (Poot y Gasca, 2005; Franco, 2003; Arnaud *et al.*, 2000).

Cabe mencionar que para este trabajo de investigación se decidió utilizar únicamente hojas provenientes de la localidad Morelia, Michoacán con el objeto de minimizar las variaciones provenientes de otras localidades. Se comprobó el género *Cnidocolus* y especie *chayamansa* del material utilizado, por el Herbario de la Facultad de Biología UMSNH (ANEXO 1).

Un resultado sorprendente es que la actividad específica y la afinidad encontrada fueron diferentes en las muestras de Chaya de diferentes localidades (Tabla 4). Al respecto, en la literatura se sabe que la distribución de las lectinas puede variar dentro de una misma planta como es el caso de *Psophocarpus tetragonolobus*, en donde se expresa en concentraciones distintas en diferentes partes de una planta, teniendo la mayor expresión en cotiledones en semillas inmaduras y en raíces,

posteriormente cuando la planta germina las lectinas se encuentran en toda la planta (Shet, 1987). En otro caso, las hojas de hiedra (*Glechoma hederacea*) contienen una lectina que se expresa de forma predominante en las hojas, pero exhibe un patrón de localización único en una sola capa de células del parénquima. Estudiaron la presencia de ésta lectina en hojas en seis locaciones diferentes y se encontraron con diferencias de 0 hasta 2550 µg/g (Wang W. *et al.*, 2003). En la planta *Dolichos biflorus* se estudiaron los genes de dos lectinas que se expresan en diferentes estados de madurez, una en la maduración en la embriogénesis y otra en los órganos maduros de ésta planta, encontraron una expresión diferente de genes de lectinas que se encuentra regulado por las regiones 5' y 3' de éstos (Harada *et al.*, 1990). Lo anterior podría explicar las diferencias encontradas, dado que el tamaño de las hojas varió considerablemente, podría estar relacionado con la expresión de diferentes lectinas dependiendo de la madurez de las hojas.

En el proceso de purificación se realizó la remoción de pigmentos mediante la inmersión en solventes poco polares como lo son el etanol al 70% y la acetona al 99% (Escribano-Bailón *et al.*, 2003). Ayudaron a remover los pigmentos de acuerdo con el siguiente orden: con la acetona los compuestos que son removidos son agliconas poco hidroxiladas y la clorofila a. En cambio con el etanol son removidos los glicósidos, las antocianinas y sulfatos, flavonoides, carotenos, agliconas altamente hidroxiladas y la clorofila b (Martínez, 2005). La naturaleza del solvente con el que son extraídos este tipo de compuestos ejercerá un fuerte efecto en la solubilidad de los flavonoides, así como la temperatura (Chebil *et al.*, 2007). Los flavonoides y carotenos son algunos de los compuestos de plantas a los que se les ha atribuido propiedades medicinales y con efectos farmacológicos demostrados (Middleton *et al.*, 2000).

Al remover los pigmentos y obtener la fracción proteica (FP) se evaluó la actividad específica (AE), como se muestra en la Tabla 6. La actividad específica (AE) se mantiene por lo que el proceso de extracción de pigmentos no daña a las proteínas, conservando así la afinidad y especificidad observada en el extracto crudo (EC), en donde las proteínas mantuvieron su estructura, estabilidad y actividad biológica. Los solventes utilizados para la extracción de pigmentos son poco miscibles en agua, lo

cual favoreció a que las proteínas mantuvieran su características, dado que son altamente solubles en ella (Houen, 1996).

Los radicales ácidos o básicos que tienen las proteínas son los responsables de darles solubilidad y esto depende de la concentración de sales disueltas, de la polaridad del disolvente, el pH y de la temperatura. En la medida en que aumenta la concentración de sal, en este caso de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en la disolución de proteínas existe una competencia entre los iones de la sal añadida y los demás solutos disueltos. Al aumentar la concentración de la sal, la solvatación de iones es tal que el disolvente es insuficiente, lo que propicia la precipitación de las proteínas (Voet, 2003). De la fracción proteica (FP) se separaron las proteínas en diferentes intervalos de concentración salina, hasta llegar a la saturación. Se dializaron y se les evaluó la actividad específica (AE). En cada uno se obtuvieron distintos resultados debido a ésta separación de proteínas. En los intervalos de concentración 0-20%, 20-40%, 40-60% y SB 80-100% se observó una actividad específica (AE) mayor para A₁ (Tablas 7, 8, 9, y 12) lo cual concuerda con lo encontrado para el extracto crudo (EC) y la fracción proteica (FP). Esto es de importante mención ya que las lectinas tienen mayor afinidad por los carbohidratos (GalNAc-Fuc-Gal) encontrados eritrocitos en la superficie de los eritrocitos de A₁ (Schenkel-Brunner, 1995).

Para analizar el comportamiento de las lectinas con carbohidratos con diferentes conformaciones en eritrocitos en solución, se evaluó la actividad específica (AE) de las lectinas presentes en el extracto crudo (EC), la fracción proteica (FP) y el intervalo de concentración 20-40% de la chaya utilizando distintos tipo de sangre de animales como se ve en la Tabla 13. En el extracto crudo (EC) se observa una mayor afinidad para las sangre de porcino, para el caso de la fracción proteica (FP) la mayor actividad es para el Bovino y para el intervalo de concentración 20-40% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es el Ovino. Esto se debe por un lado, al proceso de purificación en la que se expresan diferente tipo y concentración de lectinas, y por otro lado, a la afinidad hacia diferentes tipos de carbohidratos y diferentes arreglos estructurales de los eritrocitos de diferentes animales, así para el caso del porcino son: del A* al P; en el caso de Bovino están: A, B, C, F, J*, L, M, R', S, Z, Y T; para el ovino están A, B, C, D, M, y R*. En el caso del

tipo sanguíneo cunícula son reconocidos los carbohidratos Gal1 β -3GlcNAc (Thorpe *et al.*, 1984; En línea: http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/inmunologia/material/Clases_Inmunologia_II/ClaseIX.pdf).

En la evaluación de la actividad específica (AE) de las lectinas en contra de grupos sanguíneos humanos, la cantidad de proteína necesaria para llevarse a cabo la hemaglutinación (C), en el extracto crudo (EC) es requerida en menor cantidad comparada con la necesaria en para la actividad específica (AE) con grupos sanguíneos animales (Tablas 2, 6, 8 y 13). El caso anterior se repite también para la fracción proteica (FP) e intervalo salino 20-40%. Como se puede apreciar en éstos resultados se tuvo mayor afinidad para los carbohidratos de los grupos sanguíneos humanos (A₁, A₂, B y O) en comparación con sangre de otros animales.

Para determinar el grado de heterogeneidad de las de los intervalos salinos (PP) con sulfato de amonio en comparación con el extracto crudo (EC) y la fracción proteica (FP) se realizó una electroforesis SDS-PAGE (Figura 5) en la cual se puede apreciar que en el gel se ve la presencia de una gran cantidad de proteínas, en extracto crudo (EC), fracción proteica (FP) y la precipitaciones obtenidas con sulfato de amonio: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100% pp y sb, de acuerdo con lo descrito por Laemmli (1970).

En los intervalos salinos se observa que el número de bandas se va reduciendo con forme se llevo a cabo la precipitación salina, debido a que las proteínas fueron precipitadas y separadas en base a su tamaño y solubilidad (Voet *et al.*, 2003). El gel fue teñido con azul de Comassie ya que este colorante se fija a las proteínas (Lehninger, 2001) y nos permite observar las bandas que señalan las proteínas presentes.

Tomando el criterio de la mayor cantidad de proteína y la mayor actividad hemaglutinante (AE) se eligió la fracción salina 20-40% para continuar con el proceso de purificación. La fracción concentrada se paso por una columna de cromatografía separando las proteínas como lo explica Mathews *et al.*, (2002) y Voet *et al.*, (Cap. 6, 2003). De esta separación se obtuvieron diferentes fracciones con diferentes

cantidades de proteína (Figura 6) a las cuales se les evaluó la actividad hemaglutinante (AE) (Tabla 14). Se puede apreciar que en las fracciones 3, 4 y 5 existe una mayor actividad con A₁. La cantidad de proteína se ve representada por los picos que sobresalen en el cromatograma (Figura 8). La afinidad de estas proteínas fue mayor por el grupo sanguíneo A₁ y esto concuerda con lo que se ha visto para extracto crudo (EC), fracción proteica (FP) y los intervalos salinos 0-20%, 20-40%, 40-60% y SB 80-100%. Las lectinas separadas en el intervalo de concentración 20-40% son las responsables de una alta actividad específica (AE) con A₁ y esto concuerda con lo visto para extracto crudo (EC) y fracción proteica (FP). Sin embargo se ve de nuevo la misma afinidad hacia A₁, pero en las fracciones 10, 23, 28 y 29. En las fracciones 8, 9, 10, 14, 18 se observa una afinidad para A₂. En las fracciones restantes 22, 23, 26, 28, 29 se ve afinidad para B y para O, en donde se observan afinidades a estos mismo grupos sanguíneos en los intervalos de concentración 60-80% y 80-100%, respectivamente.

En las fracciones de proteínas obtenidas en la primera cromatografía se vio que existían diferentes tipos de lectinas puesto que al evaluar la actividad específica (AE) mostraban diferentes actividades. En el cromatograma (Figura 6) se observan las fracciones (3, 4, 5, 6 y 7) y estas corresponden a los picos sobresalientes ya que son las fracciones que tienen mayor cantidad de proteína y mayor actividad hemaglutinante (AE). Tomando en cuenta lo anterior, se realizó de nuevo una electroforesis SDS-PAGE (Figura 7) para las cuales se seleccionaron las fracciones que presentaron mayor actividad y correspondieron a las fracciones (3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 14 y 18).

La separación de proteínas se llevo a cabo de manera homogénea en fracciones mostrando diferente patrón de elusión y mostrando la presencia de siete proteínas mayoritarias, esta fracciones (3, 4, 5, 6 y 7) se mezclaron (Me1) y separaron (cromatografía de exclusión molecular en gel de agarosa) obteniendo las siete proteínas en diferentes fracciones. Se evaluó la actividad específica (AE) (Tabla 15) para verificar la presencia de lectinas y los datos obtenidos los se ven graficados en el cromatograma (Figura 8; A y B). Las que corresponden a lectinas se ven marcadas con flechas, y dichas fracciones reconocen específicamente a los carbohidratos N-Acetil-

Galactosamina-D-Galactosa-L-Fucosa que se encuentran en la superficie de los eritrocitos de este grupo sanguíneo A₁. Cabe enfatizar que la mayor actividad se muestra en la fracción 4, a la que le siguen las fracciones 5, 6 y 8 con AE= 350, 085; 78,16; 60,952 y 15,610 (UHA/mg proteína) respectivamente. Además se puede observar que se separaron las 7 proteínas mayoritarias que se mostraron en el gel de electroforesis (Figura 9) realizado para la primera cromatografía.

Al evaluar la AE de las fracciones y al ver su separación en el gel de electroforesis teñido con plata (Ag) para poder apreciar mejor las bandas que se mostraban debido a que la cantidad de proteína a separar fue más pequeña que en el gel anterior, esta la tinción favorece la aparición de bandas con una concentración proteica baja (Rabilloud *et al.*, 2009) (Figura 9). Se puede observar que en la fracción 4 (de la cromatografía con agarosa) se ven dos bandas bien diferenciadas y corresponden a dos diferentes proteínas (lectinas) las cuales tienen un PMA de 30.303 y 27.192 kDa respectivamente. En el caso de las fracciones 5 y 6 (de la cromatografía con agarosa, Figura 9) se observa solo una banda bien diferenciada, la cual corresponde a una proteína pura con PMA de 30.303 kDa. Esta proteína es una lectina ya que se evaluó con el ensayo de hemaglutinación, obteniendo una actividad específica con A1 de 40, 960 (UHA/mg de proteína). Se denominó lectina de *Cnidoscolus chayamansa* (CchL) la cual tiene un PMA de 31.303 kDa. Con una afinidad mayoritaria para N-Acetil-Galactosamina-Galactosa-Fucosa.

En la Tabla 16 se muestra el cálculo realizado del rendimiento de proteína pura (lectina de chaya CchL), obteniendo el 3.2% que equivale a 4.3 mg de lectina/ mL; observando que este método de purificación era adecuado en comparación con lo reportado por Bashir *et al.* (2010) y Adenike *et al.* 2004 para la purificación de lectinas de diferentes plantas utilizando diferentes métodos de purificación.

Tomando en cuenta que la lectina se obtuvo de una mezcla de proteínas a la cual se denominó Me1, en la Tabla 18 se observa una mayor afinidad para galactosa, seguida de galactosa acetilada y glucosa y el resto de los carbohidratos analizados. Se puede inferir que la CchL tiene entonces una afinidad para galactosa,

este ensayo no se realizó debido a que se obtuvo un volumen muy reducido de la lectina y queda por ser confirmado posteriormente.

Hasta este punto se cumplió así con el segundo objetivo propuesto al inicio de este trabajo, en el cual se mencionó la purificación de una lectina.

Al haber cumplido dos de los objetivos particulares, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas de las lectinas presentes en la hoja de chaya. En la afinidad a carbohidratos, en donde se evaluó la mínima concentración de carbohidratos necesarios para inhibir dicha hemaglutinación se observó una afinidad importante para los siguiente carbohidratos GalNAc>GlcNAc>Sac>Rib>NANA>Glyco (Tabla 17) que persisten en el extracto crudo (EC), fracción proteica (FP) y el intervalo salino 20-40 % así como en la mezcla de lectinas (Me1) (Tabla 17 y 18). Este es un criterio básico que se toma en cuenta a la hora de clasificar a las lectinas de plantas, sin embargo, esta clasificación se ha tenido que subdividir de acuerdo a las que son específicas para Man/Glc, Gal/GalNAc, GlcNAc, Fuc y Ácido siálico, sin ser arbitraria (Van Damme *et al.*, 1998). En base a lo antes descrito, se puede afirmar que las lectinas de la hoja de chaya se clasifican dentro de las que reconocen a Gal/GalNAc y GlcNAc.

La chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) es una legumbre que se ha utilizado de forma culinaria y medicinal (Berkalaar, 2006; Kuti y Cuti, 1999; Kuti y Torres, 1997) y las lectinas que se han identificado en esta planta pudiesen estar dentro de las lectinas de legumbres. Este tipo de lectinas difieren fuertemente de otras respecto a su especificidad a carbohidratos, aunque muchas otras se distinguen por su preferencia única a unos solos monosacáridos, tal como la lectina de *Canavalia ensiformis* que reconoce específicamente a Mannosa (Man)/ Glucosa (Glc) (Van Damme *et al.*, 1998), para poder dilucidar lo anterior se deberá realizar un análisis de la secuencia de aminoácidos.

La dependencia de pH en la actividad biológica de una lectina debe tomarse en importante consideración, ya que la variación abrupta del pH altera la conformación terciaria de la proteína y por consecuencia su actividad biológica que puede ir en decremento o desaparecer (Walsh, 2002). Al evaluarse (AE) en el extracto crudo (EC)

se observo que la actividad se mantiene a pH de 5.2-5.8 (Tabla 19). En el intervalo salino 20-40% su actividad es mayor a un pH 5.0, aumentando en pH 6.8. En la purificación de lectinas el pH influye en la actividad biológica, como lo demuestra Laija *et al.* (2010), en donde la lectina aislada de *Canavalia gladiata* es tratada con amortiguadores de diferente pH (2 a 12) y al evaluar su actividad biológica se observó que esta lectina se mantienen estable en un intervalo de pH 6 a 8.2 (Laija, *et al.*, 2010).

La dependencia de la temperatura por parte de las proteínas es importante, debido a que las proteínas (lectinas) al ser expuestas a altas temperaturas pierden su actividad biológica ya que los enlaces moleculares se debilitan, y como consecuencia, la proteína pierde su conformación terciaria y actividad, desnaturizándose. Este es un proceso irreversible (Mangino, 2007, Voet *et al.*, 2003). Al evaluar la actividad específica (AE) se observó que las lectinas de la hoja de chaya se mantenían estables a una temperatura de 4, 22, 36 y 40°C, la cual descendía y volvía a aumentar a 80°C (Tabla 20), por lo que la actividad específica (AE) de las lectinas con forme se da el aumento de la temperatura se mantiene estable. El hecho que con poca saturación de sal lo que se encontró es que las lectinas son resistentes a temperaturas de 100°C, mientras que las que se encontraron en la saturación son lábiles con temperaturas altas. Con esto podemos decir que la actividad específica de las lectinas presentes en las diferentes fracciones se mantiene a bajas y altas temperaturas y que su actividad varía debido a que existen diferentes tipos de lectinas que se adaptan a estas condiciones de temperatura, como se observa en la purificación hecha por Occeña *et al.* (2007), en donde la lectina aislada de semillas de *Artocarpus camansi* Blanco es evaluada su actividad hemaglutinante con sangre de tipo A, y la cual mantiene su actividad a una temperatura de 20 a 40°C, además se observó que conforme aumenta la temperatura a 100°C su desnaturización era evidente al no mostrar actividad hemaglutinante (Cocceña *et al.*, 2007).

En la dependencia de cationes a pesar de que las lectinas fueron tratadas con EDTA y que fueron expuestas a la acción de iones metálicos (CaCl₂, MgCl₂, KH₂PO₄ y Na₂HPO₄) en la Tabla 21 se observa que la actividad específica (AE) se mantiene a pesar de ser tratada con agente quelante (EDTA) como se observo en el extracto crudo

(EC) y la fracción proteica (FP); al contrario de lo observado para el intervalo salino 20-40%. Esta variación puede indicar que algunas de las lectinas presente dependen de iones para mostrar actividad biológica. Aunque se evalúa el último pozo en el que se ve la hemaglutinación, en el extracto crudo (EC) los resultados mostraron una mayor hemaglutinación con CaCl_2 , (hasta el pozo 6), lo que indica una dependencia hacia Ca^{++} (Tabla 21).

Por otro lado, se sabe que las lectinas contienen restos de compuestos aromáticos en las cadenas laterales de los aminoácidos en especial los residuos de fenilalanina (Phe), triptófano (Try), histidina (Hys) y tirosina (Tyr) y estos se pueden unir a especies catiónicas presentes en cadenas laterales de otras proteínas u otras macromoléculas que en su estructura tienen iones metálicos (e. g.: Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , K^+) (Lund-Katz *et al.*, 1995). Las lectinas usualmente son metaloproteínas que contienen predominantemente cationes divalentes (Lönnerdal *et al.*, 1987) como en el caso de la lectina de *Polyandrocarya* que es dependiente de calcio (Ca^{++}) (Suzuki, *et al.*, 1990).

Con respecto a la evaluación biológica se eligió comprobar la actividad antibacteriana de las lectinas presentes en la hoja de chaya. En la literatura esta reportado que la chaya es usada popularmente en contra de infecciones urinarias y gastrointestinales (Canales *et al.*, 2005; Salahudin *et al.*, 2011). Por medio de la técnica de difusión en disco o Kirby-Bauer (Henry, 2007) se comprobó que el mayor efecto antibacteriano se presenta en contra las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 (Tabla 22) y *Salmonella tiphymurium* ATCC 14028 (Tabla 26) donde se calculó la concentración inhibitoria mínima (CIM) en ambos casos. Se corroboraron los resultados obtenidos utilizando una técnica más sensible que fue la de curvas de crecimiento bacteriano en donde se evidencio el tiempo de actividad y la CIM para cada uno. Los datos obtenidos fueron resultado de un ensayo, en el que no se calcularon medias, ni DE, y donde el único fin fue demostrar el efecto antibacteriano de las lectinas de las hojas de chaya. La cantidad de bacterias se ajusto a 0.3 en escala de Mc Farland y corresponde a 1.5×10^4 UFC/mL, esto fue con el fin de evitar la sobre población y evidenciar mejor el efecto antimicrobiano de EC, FP, intervalo salino 20-40%,

pigmentos etanólicos y acetónicos y lectina de chaya CchL en contra de las cepas bacterianas antes mencionadas.

Como se muestra de las Gráficas 9 a 12, la chaya posee actividad antibacteriana contra las bacterias patógenas analizadas, presentando un mayor efecto contra *Escherichia coli*, contra *Staphylococcus aureus*, contra *Salmonella typhimorium* y en menor efecto contra *Pseudomonas aureginosa*. Se ha demostrado que la fracción proteica (FP) contiene una mezcla de lectinas que son capaces de reconocer los carbohidratos superficiales de las diferentes bacterias, y que su especificidad varía de acuerdo a la CIM que se presentó para cada bacteria. El intervalo salino 20-40% presentó mayor afinidad en contra de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimorium*, este es un aspecto interesante ya que la lectina CchL tiene afinidad importante por *Salmonella typhimorium* la cual se ve evidenciada en la Gráfica 12, y dado que fue purificada del intervalo salino antes mencionado, se ve que disminuye el crecimiento antibacteriano de manera importante, a partir de las 4 h con una CIM de 0.043 mg de proteína/ mL.

Es importante mencionar que los carbohidratos que están presentes en capas de glicanos en las bacterias, están construidas con 10 o 12 subunidades alternantes de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina (en bacterias Gram positivas), y en moléculas glicosiladas encontradas en fimbrias (pilis), endotoxinas, capsulas, flagelos (bacterias Gram negativas) (Murray *et al.*, 2007) ya son reconocidos por lectinas, siendo este un factor determinante para que se dé el efecto antibacteriano. Se han reportado efectos bactericidas de lectinas presentes en los granulocitos humanos que reconocen a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, en donde se evalúa el crecimiento bacteriano, observando que este disminuía con el tiempo (Odeberg *et al.*, 1975).

Con lo anterior comprobamos que en la chaya existen efectos antibacterianos y que los responsables de este efecto son tanto los pigmentos obtenidos con etanol así como las lectinas presentes. Cabe mencionar que ya se ha reportado el efecto antibacteriano de algunas lectinas y de pigmentos de plantas (e. g., alcaloides, flavonoides, catequinas, antocianinas, entre otros). Estos, que al ser extraídos con

solventes, son encontrados en mezclas y además su separación se verá influenciada por su polaridad, ya que dependiendo de los compuestos que se desean extraer será el solvente utilizado (e. g., solventes de alta polaridad como metanol, etanol, acetona y diclorometano; solventes de baja polaridad como hexano y cloroformo) (Paiva *et al.*, 2010). Por otro lado, en los trabajos realizados por Paiva *et al.* 2010 y Murphy 1999, se mencionan que las lectinas de diferentes plantas presentan afinidades especiales por los carbohidratos de cierto tipo de microorganismos (e. g., virus, bacterias, hongo y levaduras) en donde el mecanismo de acción supuesto es por medio de la formación de canales iónicos sobre la membrana o su supuesta participando en una inhibición competitiva de la adhesión del microorganismo al receptor polisacárido (lectinas) de las células blanco (Paiva *et al.*, 2010; Murphy, 1999). También se evidencia este efecto antibacteriano de lectinas en otros trabajos como los realizados por Odeberg *et al.*, 1975; Sánchez *et al.*, 2003. Hasta el momento no se ha sabe de reportes o investigaciones que den referencia de este tema específicamente para la chaya (*Cnidocolus chayamansa*) por lo que este trabajo representa el primero en reportar que las lectinas presentes en la hoja de chaya (*Cnidocolus chayamansa*) tienen efecto antibacteriano en contra de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Adicionalmente, se demostró que algunos de los pigmentos etanólicos y acetónicos (flavonoides, antocianinas, glicósidos, carotenos, entre otros) (Martínez, 2005) tienen efectos antimicrobianos y este trabajo es el primero en reportar que los pigmentos extraídos con etanol y acetona de la hoja de chaya presentan efectos antibacterianos, comprobando así el uso popular que se le da a la chaya como antimicrobiano natural (Awoyinka, *et al.* 2007). El efecto antibacteriano encontrado se puede comprar con el efecto encontrado en los trabajos de Nascimento, *et al.* (2001) y Nijvelt, *et al.* (2001) y de Oliveira, *et al.* (2008). En este último se menciona que los extractos de hojas de *Eugenia uniflora* muestran una actividad importante y un efecto antibacteriano contra *Pseudomonas aureginosa*, *Bacillus subtibilis*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus* y *Eschericia coli*, lo cual demuestra que en la chaya también

están presentes compuestos antibacterianos que probablemente se encuentren en otras plantas.

Con todo lo anterior se ha cumplido el tercer objetivo planteado en este trabajo, concluyendo así que la chaya tienen un importante uso dentro de la medicina popular y que este trabajo representa el primero en reportar la acción antibacteriana de las lectinas presentes en las hojas de chaya en contra de una cepa bacteriana patógena para el hombre.

XI CONCLUSIONES

- Se comprobó la presencia de lectinas en la hoja de chaya (*Cnidoscolus chayamansa*).
- La chaya contiene lectinas que están presentes desde el extracto crudo (EC) y que se mantienen durante la remoción de pigmentos en la fracción proteica (FP) y las precipitaciones salinas (de 0 a la saturación 100%). Además de que son específicas para los cuatro grupos sanguíneos humanos (A₁, A₂, B y O) y reconocen a los grupos sanguíneos animales de porcino>ovino>bovino>cunícula.
- El intervalo de concentración 20-40% presentó la mayor actividad hemaglutinante y la mayor cantidad de proteínas, teniendo cuatro proteínas mayoritarias y del cual se obtuvo una lectina a la que se le denominó CchL (Lectina de *Cnidoscolus chayamansa*) que tiene un PMA =30.303 kDa, y una afinidad para A₁=40, 960 (UHA/mg de proteína) con un rendimiento de recuperación del 3.2% que corresponde a una concentración de 43 µg de lectina/ mL.
- En los diferentes pasos de purificación se observa que las lectinas presentes en la hoja de chaya tienen una afinidad para los carbohidratos GalNAc >GlcNAc > Sac > Rib >NANA >Glyco, una termoestabilidad que va de los 4 a 80°C manteniéndose estables a pH en un intervalo de 5.2 a 6.8.
- Las lectinas de la hoja de chaya no dependen de cationes para mostrar actividad biológica.
- El efecto antibacteriano lo presentan las lectinas y los pigmentos etanólicos en contra de cepas bacterianas patógenas para el hombre como lo son *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

XII PERSPECTIVAS

- Continuar con la caracterización de la lectina Cch (Lectina de *Cnidocolus chayamansa*), afinidad para carbohidratos, dicroísmo circular, dependencia de cationes, pH y temperatura.

- Determinar la estructura secundaria o terciaria de la lectina de chaya (CchL).

- Determinar la secuencia de aminoácidos de la lectina de chaya (CchL).

- Determinar el mecanismo de acción por el cual la lectina de chaya ejerce el efecto antibacteriano.

- Continuar con la caracterización del resto de las lectinas identificadas en la chaya.

- Realizar más ensayos de evaluación biológica, donde se evalúe la actividad antibacteriana por medio de la elaboración de curvas de crecimiento bacteriano, con el fin de reforzar y evidenciar de manera más clara este efecto.

XIII ANEXOS

○ ANEXO 1

Morelia, Michoacán., a 04 de noviembre de 2010.

A QUIEN CORRESPONDA

Por medio de la presente se establece la identificación y clasificación Taxonómica del ejemplar constituido por hojas y flores entregado al Herbario de la Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, el cual fue recolectado de un arbusto ubicado en la calle 8 de septiembre Col. Chapultepec Sur, entre las calles H. Colegio militar y Bernal Díaz del Castillo de la ciudad de Morelia, Michoacán, México.

La clasificación taxonómica se realizó en base a Paul C. Standley y Julian A. Steyermark, 1949. Flora de Guatemala. Fieldiana: Botany, Chicago Natural History Museum. Vol 24, Parte VI, pag. 25-64.

Clasificación Taxonómica:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Malpighiales
Familia: Euphorbiaceae
Género: *Cnidocolus*
Especie: ***C. chayamansa* McVaugh**

Sin otro particular se extiende la presente para los fines legales que a usted convenga.

Atentamente


M. en C. María Alma Chávez Carbajal
Curadora de la Colección de Angiospermas y
Encargada del Herbario de la Facultad de Biología



Herbario de la Facultad de Biología
Edificio "L" planta baja
Ciudad Universitaria
Francisco J. Mújica s/n
Tel: 3 16 74 12

XIV REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adenike, K., Babalola, A. E. (2004). Purification and partial characterization of a lectin from fresh of *Kalanchoe crenata* (Andr.) Haw. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. Vol.37, No. 2, pp: 229-233.
- Ambrosi, M., Cameron N. R., Davis B. G. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. Org. Biomol. Chem. Vol. 3, pp: 1593-1608.
- Al-Bayati, F. A., Sulaiman, K. D. (2007) In vitro activity of *Salvadora persica* L. Extracts against some isolated oral pathogens in Iraq. Turk Journal Bio. Vol. 32, pp: 57-62.
- Arnaud-Vinas, M. R., Lorenz K. (1999). Pasta products containing taro (*Colocasia esculentata* L. Schott) and chaya (*Cnidoscolus chayamansa* L. McVaugh). Journal Foods Processing Preservation. Vol.25, pp: 1-20.
- Awoyinka, O. A., Balogun, I. O., Ogunnowo, A. A. (2007). Phytochemical screening and *in vitro* bioactivity of *Cnidoscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). Journal of Medicinal Plants Research. Vol. 1 No. 3, pp: O63-O65.
- Barondes, S. H. (1981). Lectins: their multiple endogenous cellular functions. Annu. Rev. Biochem. Vol.50, pp: 207-231.
- Bals, R. (2000). Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. Rev. R. Res. Vol. 1, pp: 141-150.
- Bhashir, H., Khan, T., Masood, A., Hamid, R. (2010). Isolation, purification and characterization of a lectin from a local Kashmiri variety of soybean (*Glycine max*).
- Bladier, D., Perret, G., Maudelot, J., Cornillot, P. (1979). Carbohydrate content of human erythrocyte membrane. Variations with ABO-Blod group. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. April. Vol. 360. No. 4, pp: 501-506.
- Bonay, P. M., Fresno M. (2000). Lectins from Tropical Sponges. J. Biol. Chem. Vol. 275, pp: 29283-29289.

-
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. Vol.72, pp: 248-254.
 - Bulgakov, A. A., Park K., Choi K-S., Lim, H-K., Cho, M. (2004). Purification of a lectin isolated from the manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Fhis & Shellfish Immunology*. Vol. 16, pp: 487-499.
 - Bustos, M. M. F. (2011). Manual de prácticas. Dispersión de la luz. Consulta. UCE. Fac. Csc. Quim.
 - Carpenter, P. L. (1979). *Microbiología*, 3a Edición. Cap. 5, pp: 35-40.
 - Castillo, A. F., Abdullaev. (2005). Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de investigación Clínica .México*. Vol. 51. No. 1, pp: 55-64.
 - Chaya, aportación de los mayas. En línea: http://chinessa.blogspot.com/2009_10_01_archive.html. Publicado el [09/10/2009](http://chinessa.blogspot.com/2009_10_01_archive.html).
 - Chebil, L., Humeau, C., Anthoni, J., Dehez, F., Engasser, J-M., Ghoul M. (2007). Solubility of flavonoids in organic solvents. *J. Chem. Eng. Data*. Vol. 52, pp: 1552-1556.
 - Conlon M, Ahmed E., Pal T, Sonnevend A. 2010. Potent and rapid bactericidal action of alyteserin-1c and its [E4K] analog against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides 31 (10)*: 1806–1810.
 - Debray, H., Daecourt, D., Strecker, G., Spik, G., Montruil, J. (1981). Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur. J. Biochem*. Vol. 117, pp: 41-55.
 - De Paula, S. J., Martins, de S. A. (2000) Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*. *Rev. Cubana Plant. Med*. Vol. 5, No. 1, pp: 26-29.
 - Doltchinkova, V., Lambreva, M. (2002). Effect of pH on the electrokinetic and light scattering properties of pea thylacoids in the presence of phytohemagglutinin. *Bulg. J. Plant Physiol*. Vol. 28. No.1-2, pp: 45-58.

-
- Drickamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 263. No. 20, pp.4557-9560.
 - Elola, M. T., Finck, N. E. (1995). Lectinas I. Plantas vasculares. *Acta Farm. Bonarense*. Vol.14. No. 1, pp: 49-61.
 - Familia Europhobiaceae, en línea: <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/euphorbi.htm>
 - Facinelli, B., Giovanetti, E., Casolari, C., Varaldo, P. E. (1994). Interaction with lectins and agglutination profiles of clinical food, and environmental isolates of *Listeria*. *Journal of Clinical Microbiology*. Dec. Vol. 32. No. 12, pp: 2929-2935.
 - Fenton, N. B., Arreguín, L. B., García, H. E., Heimer, E., Aguilar, M. B., Rodríguez, C. A., Arreguín, E. R. (2003). Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillensis*. *Toxicon*. Vol. 42, pp: 525-532.
 - Figueroa, V. L., Díaz, C. F., Camacho, L. A., López, R. M. (2006). Efectos inducidos por *Ruta graveolens* L., *Cnidocolus chayamansa* McVaugh y *Citrus aurantium* L sobre los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en un modelo de rata diabética. *Rev. Brasileira de Farmacognosia*. Vol. 19. No. 4, pp: 898-907.
 - Franco, L. S. (2003). Insumos no convencionales para la alimentación de aves rústicas. *Experiencias en el trópico mexicano*. Fac. de Med. Vet. Y Zoo. Universidad Autónoma de Yucatán.
 - Gabius, H. J. (2006). Probing the cons and pros lectin- induced immunomodulation; cases studies for mitogen lectin and galectine-1. *Bochemie*. Vol. 83. No. 7, pp: 659-666.
 - Gallego del Sol, F., Nagano, C., Cavada, B., Sampaio, A., Calvete, J. (2006). Lectinas. *Rev. Investigación y Ciencia*, pp: 58-67.
 - García, P. H. M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ. DIAG 2000*. Vol. 1. No. 2, pp: 31-41.
 - García, S. V., Mendiola, O. E., Blanco, L. A., García, G. T. (2009). Afinidad de fracciones concentradas de lectinas de frijoles tepari (*Phaseolus acutifolius*) por eritrocitos humanos, pp: 1-4.
-

-
- Gentamicin. Datacheet. PDF. En línea: <http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/g/Gentamicinij.pdf>
 - Gibbons, R. J. (1989). Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. J. Dent Res. Vol. 68, pp: 750.
 - Goldstein, I. J., Winter H. C. (1997). Plant Lectins: tools for the study of complex carbohydrates. Elsevier Science B.V. Chap. 12.
 - González-Laredo, R. F., Flores de la Hoya, M. E., Quintero-Ramos, M. J., Karphegy, J. J. (2003). Flavonoid and cyanogenic contents of chaya (Spinach tree). Plants food for human nutrition. Vol. 58, pp:1-8.
 - Harada J. J., Spadoro T. J., Maxwell J. C., Scnell D. J., Etzler M. E. (1990). Two lectin genes differentially expressed in *Dolichos biflorus* differ primarily by a 116-base pair sequence in their 5' flanking regions. J. Biol. Chem. Vol. 256. No. 9, pp: 4997-5001.
 - Hart, A. (1980). Lectins in biological systems: applications to microbiology. The American Journal of Clinical Nutrition U.S.A. Vol. 33, pp: 2416-2425.
 - Hart, G. W., Housley, M. P, Lawson, C. (2007). Cycling of on liked β -N-acetilglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. Nature. Vol. 446, pp: 1017-1022.
 - Henry, J. B. (2007). El laboratorio en el diagnostico clínico. Editorial Marbán Libros S, L. Cap. 51, p. 1119-1129.
 - Hernández, C. P., Pérez, C. E., Martínez, M. L., Ortiz, B., Martínez, G. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. REB. Vol. 24. No. 1, pp: 21-27.
 - Hoepffner N, Sathyendranath S. 1991. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton. Mar. Ecol Prog Ser. 73:11-23
 - Hoogester, C. (1994). Uso de plantas medicinales. Ed. Árbol S.A. de C. V. Colombia, pp: 9-11.
 - Houen, G. (1996). The solubility of proteins in organic solvents. Acta Chemica Sacandinavica. Vol. 50, pp: 68-70.
-

-
- Kawsar, M. A., Mamun, M. A., Rahman, S., Yasumitsu, H., Ozeki, Y. (2010). Biological effects of a carbohydrate-binding protein an annelid, *Perinereis nutia* against human and phytopathogenic microorganism. International Journal of Biological and Life Sciences. Vol. 6. No. 1.
 - Katzung, Bertram G. (2007). Basic and Clinical Pharmacology, 10th edition. New York, NY. McGraw Hill Medical, pp. 733.
 - Kobata A. (1998). A retrospective and prospective view in Glicopathology. Glycoconjugates. Journal Inmunology. Vol. 15, pp: 323-331.
 - Kuti J. O., Torres E. S. (1996). Potential nutritional and health benefits of tree spinach. In: J.Janick (ED), Progress in new crops. ASHS Press, Arlington, VA, pp: 516-520.
 - Kuti J. O, Kuti H. O. (1999). Proximate composition and mineral content of two edible species of *Cnidoscolus* (tree spinach). Plants Food for Human Nutrition. Vol. 53, pp: 275-283.
 - Kuti J. O, Konoru H. B. (2006). Cyanogenic glycosides content in two edible leaves of tree spinach (*Cnidoscolus spp*). Journal Food Composition and Analysis. Vol. 9, issues: 6-7, pp: 556-561. On line in www.sciencedirect.com
 - Laemmli U K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. Vol. 227, pp: 680–685.
 - Laija, S. N., Mahesh, S., Smitha, L. S., Remani, P. (2010). Isolation and partial characterization of two plant lectins. Current Research Journal of Biological Sciences. Vol. 2. No. 4, pp: 232-237.
 - Lizcano R. A. J., Vergara G. J. L. (2008). Tesis: Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Pontificia Universidad Javeriana, Fac. Csc. Microbiología Industrial, Bogotá D. C., Colombia. Julio 18.

-
- Loarca-Piña, G., Mendoza, S., Ramos-Gómez, M., Reynoso, R. (2010). Antioxidant, antimutagenic, and antidiabetic activities of edible leaves from *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh. Journal of food Science. Vol. 75, No.2.
 - Lönnerdal, B., Borrebaeck, C. A. K., Etzler, M., E., Ersson, B. (1983). Dependence on cations for binding activity of lectins as determined by affinity electrophoresis. Biochemical and Biophysical research communications. Vol. 115. No. 3, pp. 1069-1074.
 - Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Mishra, V. K., Segrest, J. P., Anantharamaiah, G. M. (1995). Microenvironments of basic amino acids in amphipathic alpha-helices bound to phospholipid: ¹³C NMR studies using selectively labeled peptides. Biochemistry. Vol. 34. No. 28, pp: 9219-9226.
 - Mancilla, C. G. E., Castrejón, C. R., Rosas T. M., Blanco, E. Z., Pérez, S. L. J. (1990). Extracción y separación de pigmentos vegetales. Man. Prac. Fac. Q.F.B. Universidad del Valle de México, Campus Chapultepec. En línea: <http://www.scribd.com/doc/16675209/6-EXTRACCION-Y-SEPARACION-DE-PIGMENTOS-VEGETALES>
 - Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Ahern, K. G. (2002). Bioquímica 3era Edición. Editorial Pearson Addison Wesley., pp:59, 166,233.
 - Mendoza D., M., O. (2004). Caracterización bioquímica de los agentes hipoglucemiantes de la hoja de chaya. En línea: www.diabetesherbopro.blogspot.com
 - Middlenton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. (2000). The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacological Reviews. Vol. 52, pp: 673-751.
 - Miranda, V. L., Oranday, C. A., Lozana, G. H., Rivas, M. C., Chamorro, C. G., Cruz, V. D. E. (2010). Hipocolesterolemia activity from the leaf extracts of *Cnidoscolus chayamansa*. Plant food for human nutrition. Vol. 65, pp: 392-395.
 - Milosvcovq, D., Gemeiner, P., Kozarova, A., Kozar, T. (2009). Lectinomics I. relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnosis. Versita. Biology. Vol. 64. No. 1, pp: 1-49. Section, Cellular and Molecular Biology.
-

-
- Muñoz DK, Londoño L JA, Arango A GJ, Sierra R JA, Bravo M KE. 2007. Efecto de la técnica de extracción de *Ruta graveolens* sobre la actividad antitirosinasa y correlacion entre la inhibición enzimática, el contenido de compuestos fenólicos y la citotoxicidad. VITAE Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Vol 14 (2). 78-83
 - Murphy, M. C. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, pp: 564-582.
 - Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaüer, M. A. Microbiología médica. 5a Edición. Ed. ElSevier. Cap. 22 y 32, pp: 213, 323.
 - Nascimento, G. F. G., Locatelli, J., Freitas, C. P., Silva, L. G. (2000). Bacterial activity of plant extract and phytochemical on antibiotic resistant bacteria. Brazilian Journal of Micribiology. Vol. 31, pp: 247-256.
 - Nijvelt, J. R., van Nood, E., van Hoorn, D. EC., Boelens, G. P., van Norren, K., van Leeuwen, P. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J. Clin. Nutr. Vol. 74, pp: 418-425.
 - Ocampo, R., Balick, J. M. (2010). Plants of Semillas Sagradas. PDF. On line: www.herbalgram.org
 - Odeberg, H., Olsson, I. (1975). Antibacterial Activity of cationic proteins from human granulocytes. The Journal of Clinical Investigation, Vol. 56, pp: 1118-1124.
 - Oliveira, M. D. L., Andrade C. A. S., Santos-Magalhães, N. S., Coelho L. C. B. B., Texeira J. A., Carneiro-da-Cunha, M. G., Correia, M. T. S. (2008). Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. Journal compilation. The Society for Microbiology. Letters in Applied Microbiology. Vol. 46, pp: 371-376.
 - Oliveira, S. R. M., Nascimento A. E., Lima M. E. P., Leite. Y. F. M., Benevides, N. M. B. (2002). Purification and characterization of lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmel) Santel. & Hommers. Revista Brasil, Bot. Vol.25. No.4, pp: 397-403.

-
- Othman, M., San, L. H., Wiart, C., Jin, K. T., Hon, L. K., Nee, T. K. (2011). Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 84, pp: 161-166.
 - Oyagbemi, A. A., Odetola, A. A. (2010). Hepatoprotective effects of ethanolic extract of *Cnidocolus aconitifolius* on paracetamol induced a hepatic damage in rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. Vol. 13. No. 4, pp: 164-169.
 - Paiva, P. M. G., Domes, F. S., Napoleão, T. H., Sá, R. A., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B. (2010). Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Technology*. FORMATEX.
 - Palos-Suarez, M, Ramos-Gómez M, Reynoso-Camacho, R, González-Jasso, E. (sin año). Estudio de la administración subcrónica del te de chaya (*Cnidocolus chayamansa*) en la diabetes inducida químicamente en ratas. Artículo publicado del Segundo Congreso Nacional de Química Médica.
 - Parra, J., De Saint, G., Carruyo, R., Cardoso, R., González, N., Montiel, E., Alcántara, A. (2005). Manual de plantas medicinales. Universidad Nacional Experimental, Sur del Lago “Jesús María Seprum”. Dirección de Coordinación, Extensión agrícola, pp: 3-4.
 - Pelczar, T. M. J., Reid R. D., Chan E. C. S. (1982). *Microbiología* 4a Edition, Ed. McGraw-Hill. Cap. 2, pp. 107-119.
 - Phillips, T. (2010). Manual de Bioquímica humana (2010). Métodos de determinación de proteínas totales. Proteínas plasmáticas, proteinograma, electroforesis y Western Blot. En línea: <http://biotech.about.com/od/protocols/a/ProteinPurify.htm>
 - Phillips, T. (2010). Protein purification strategies and preparation of cell-free extracts. En línea: http://biotech.about.com/od/protocols/a/ProteinPurify_2.htm
 - Poot, L. D. R., Gasca, L. E. (s/año). Boieconomic evaluation of substitution of balanced feed whit chaya (*Cnidocolus chayamansa*) leaves in tilapia production. CINEVSTAV, Mérida, Yucatán, México.
 - Peumans, W. J., Van Damme, E. J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plan Physiology*. Vol. 109, pp. 347-352.
-

-
- Quesada, A. (2008). Las plantas medicinales. Rev. Biocehasis. Vol. 21. No.1-2.
 - Quezada, T., Acero, G., Fuantos, J., Martínez, R., López, M., Corca, G. (2000). Evaluación nutricional de la hoja de chaya (*Cnidoscolus spp*) en tres estaciones del año y tres etapas fenológicas. Centro de ciencias agropecuarias de VAA.
 - Ramawat, K. G. (2009). Herbal drugs: Ethnomedicine to modern medicine. Ed. Springer, pp: 7-20.
 - Ross-Ibarra, J., Molina-Cruz, A. (2002). The ethnobotany of chaya (*Cnidoscolus aconitifolius ssp. Aconitifolius Breckon*): a nutritious maya vegetable. Economic Botany. Vol. 56. No. 4, pp: 350-365.
 - Rádis, B. G., Kerkis, A., prieto, S. A. R., Furuie, H. M. A., Kerkis, I., Yomane, T. (2008). Membrane translocating peptides and toxins: from nature to bedside. J. Braz Chem. Vol.19. No.2, pp: 211-225.
 - Schenkel-Brunner, H. (1995). Human blood groups. Chemical and biochemical basis of antigen specificity. 2th edition, Springer Wien New York. Chap. 4, pp. 43-50.
 - Sharon, N., Lis, H. (1993). Carbohydrates in Cell Recognition. Sci. Am., Vol. 268, pp: 82-89.
 - Sharon, N., Lis, H. (2001). Lectins are carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition and serve as tools in the study of glycoconjugates. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group www.els.net
 - Sharon N., Lis H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to recognition molecules. Glycobiology. Vol. 4. No. 11, pp. 53R-62R.
 - Shet, M. S., Madaiah, M. (1987). Distribution of lectin activity at different stages in the tissues of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.)). Plant Science. Vol. 53. No. 2, pp: 161-165.
 - Species plants, Catalogue of life, 2nd October 2010. Kew: plants people possibilities. McVaugh (1944). Bull. Torrey. Club 72:466. En línea: <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/7459413>

-
- Stephens, M. (S/año) *Chaya-Cnidocolus chayamansa* Mc Vaugh. Horticultural Sciences Department, Cooperatuve Extension Service, Institute Food and Agriculture Sciences, University of Florida, Gainesville FL 32611.
 - Strayer, L., Berg, J., Tymoczco, M, (2003). Bioquímica. 5ª Edición. Editorial Reberté S. A. Cap.4, pp: 77-94.
 - Suzuki, T., Takagi, T., Furukohri, T., Kawamura, K., Nakauchi, M. (1990). A calcium-dependent galactose-binding lectin from the Tunicate (*Polyandrocarpa misakiensis*). The Journal Biological Chemistry, Vol. 265, No. 3, Issue of January 25, pp: 1274-1281.
 - Randoms Primer (2007). Factors affecting protein stability *in vitro*. No. 4, June 9. En línea: <http://www.opsdiagnostics.com/notes/ranpri/rpproteinstability2.htm>
 - Rodríguez, V., Riquelme, B., Valverde, J., Gattuso, S. (2004). Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las Fabaceas sobre eritrocitos humanos mediante el análisis de imágenes. Bahía blanca. Vol 16, pp: 247-248.
 - Ross, M. S. (2007). Introducción a la estadística. Editorial Reverté. España. pp: 493.
 - Thorpe, S. J., Feizi, T. (1984). Species differences in the expression of carbohydrate differentiations antigens on mammalian blod cells revelated by immunofloreence with monoclonal antibodies. Bioscience Reports. Vol. 4, pp: 673-685.
 - Téllez, A. G., Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. Rev. Infectio. Vol. 14. No. 1, pp: 55-67.
 - Torrico, F. M., Gabay, J., Suarez, A.I, Compagnene, R. S. (2003). Estudio toxicológico de *Cnidocolus chayamansa* McVaugh. Revista de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Vol. 66. No.2.
 - Van Damme, Els, J. M., Peumans, W. J., Pusztai, A., Bardocz, S. (1998). Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications. Wiley Editorial, Part I, pp: 7-10.
 - Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H, Stanley, P., Bertozzi, C., Hart, G, Etzler M. (2009). Essentials of Glycobiology, 2ª Ed. CSH. PRESS. E.U.S.
-

-
- Voet J. D. (2003). Bioquímica. 3a. Ed. Wiley and Sons. USA. Cap.5, pp: 83-86.
 - Voet, D., Voet, G. J., Pratt, C. (2006). Fundamentos de Bioquímica: la vida a nivel molecular. 2ª edición, Buenos Aires, Editorial Panamericana.
 - Wang, W., Hause, B., Peumans, W. J., Smagghe, G., Mackie, A., Fraser, R., Van Damme, E. J. M. (2003). The Tn Antigen-Specific Lectin from Ground Ivy Is an Insecticidal Protein with an Unusual Physiology. *Plant Physiology*. Vol. 132, pp. 1322–1334.
 - Wuhner, M. (2007). Glycosilation profiling in clinical proteomics: heading for glycan biomarkers. *Expert. Rev. Proteomics*. Vol. 4, pp: 135-136.
 - Zenteno E, Debray H and Montreuil. 1988. *J. FEBS Lett.* 238 95-100