



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGÍA

TESINA

Importancia y uso de Lectinas de *Pleurotus* spp.



QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

PRESENTA:

IVÁN LONGINOS LÓPEZ NOGUEIRA

DIRECTOR DE TESINA:

M. EN C. LUIS ANTONIO HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

LABORATORIO DE QUÍMICA BIOLÓGICA Y JARDÍN BOTÁNICO



Av. De los Barrios N° 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Edo. de México
CD 54090. 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Director de tesina:

M. en C. Luis Antonio Hernández González

Sinodales:

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras
Dra. Martha Martínez García
Dra. María Margarita Canales Martínez
Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

AGRADECIMIENTOS

A mis padres quienes me han apoyado incluso en los momentos más difíciles.

Al profesor Luis Antonio Hernández González, director de la tesina por brindarme la oportunidad de trabajar con él, por su apoyo y su atención.

A los profesores Jorge Eduardo Campos Contreras, Martha Martínez García, María Margarita Canales Martínez y Marco Aurelio Rodríguez Monroy por haberme guiado a la correcta finalización del presente trabajo.

A los amigos que me acompañaron durante toda la carrera y a mis compañeros y amigos del laboratorio de Química Biológica y Jardín Botánico quienes me hicieron sentir como en casa.

DEDICATORIA

A mis padres José y Adaía. Tal vez nunca me dieron lujos pero nunca me faltó nada, en especial amor. Sin ustedes no estaría en el lugar que estoy ahora, pasamos por penas y alegrías y aún falta un largo camino por recorrer pero quiero que sepan que les estoy eternamente agradecido, que los amo y que siempre voy a estar a su lado.

A mi hermano Joaquín, con quién pasé tantas noches de desvelo haciendo nuestras tareas.

A mis amigos y familiares Moi, Jorge, Manlio, Salvador, Juan Pablo y especialmente a Alejandro, quienes me ayudaban a veces y otras tantas me distraían de mis deberes.

Y finalmente de una manera sumamente especial quiero dedicar este trabajo así como mi vida a mi amor Angélica, la persona que me puso de pie siempre que decaía y también la persona que me inspira cada día. Este es sólo uno de nuestros logros juntos.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	1
2.1 El Género <i>Pleurotus</i>	1
2.2 Composición química y nutricional de las especies <i>P. ostreatus</i> , <i>P. pulmonarius</i> y <i>P. djamor</i>	4
2.3 Lectinas.....	4
3. Objetivos.....	7
3.1 General.....	7
3.2 Particulares.....	7
4. Método.....	8
5. Resultados.....	8
5.1 Tipos de lectinas.....	8
5.1.1 Composición de las lectinas.....	8
5.1.2 Clasificación de Peumans y Van Damme (1995).....	10
5.1.3 Clasificación de Weis y Drickamer (1996).....	11
5.1.4 Clasificación de Fluoprobes (2012).....	11
5.1.5 Clasificación de Hernández (2005).....	12
5.2 Usos de las lectinas.....	13
5.2.1 Activación linfocitaria.....	15
5.2.2 Diferenciación de células malignas.....	16
5.2.3 Receptores en parásitos.....	17
5.2.4 Purificación de glicoconjugados.....	17
5.3 Aplicaciones farmacológicas.....	18
5.3.1 Sistema nervioso.....	18
5.3.2 Anticoagulantes.....	18
5.3.3 Inmunoglobulina E.....	19
5.3.4 Obesidad y diabetes.....	19
5.3.5 Bloqueo de receptores.....	20
5.3.6 Tumores.....	20
5.3.7 Fertilidad.....	21
5.4 Lectinas en Basidiomicetos.....	22
5.5 Técnicas de purificación.....	24
5.5.1 Técnicas de Nanne y Aragón (1991) en <i>Erythrina costaricensis</i>	24
5.5.1.1 Aislamiento de lectinas	
5.5.1.2 Purificación de lectinas	
5.5.2 Técnicas de Palomina <i>et al.</i> (2012) en veneno de <i>Lachesis muta</i>	26

5.5.2.1 Purificación de la lectina	
5.5.2.2 Evaluación de la pureza y determinación del peso molecular	
5.5.3 Técnicas de Salgado y Valádez (2006) en semillas de amaranto.....	26
5.5.3.1 Purificación de lectinas	
5.5.4 Técnicas de Blasco (2004) en <i>Caesalpinia spinosa</i>	26
5.5.4.1 Marcaje de lectinas vegetales con Biotina	
5.5.4.2 Extracción salina	
5.5.4.3 Cromatografía de exclusión molecular	
5.5.5 Técnicas de Torres (2010) en <i>Phaseolus folius</i>	27
5.5.5.1 Purificación	
5.5.6 Técnicas de Ganem y Martín (2000) en <i>Canavalia ensiformis</i>	28
5.5.6.1 Obtención	
5.5.6.2 Purificación	
5.5.7 Técnicas de Zhao (2003) en <i>Agrocybe aegerita</i>	29
5.5.7.1 Cromatografía	
5.5.7.2 Estimación de la masa molecular e isoelectroenfoque	
5.5.7.3 Análisis de composición de aminoácidos y análisis de la secuencia de aminoácidos	
5.5.8 Técnicas de Khan y Khan (2011) en <i>Rhizopus stolonifer</i> y <i>Aspergillus fumigatus</i>	29
5.5.8.1 Purificación	
5.5.8.2 Masa molecular y la estructura de la subunidad	
5.5.9 Técnicas de Zhang <i>et al.</i> (2009) en <i>Pholiota adiposa</i>	30
5.5.9.1 Aislamiento y purificación de la lectina	
5.5.9.2 Determinación de la masa molecular y secuencia N-terminal	
5.5.10 Técnicas de Chattopadhyay <i>et al.</i> (1999) en <i>Pleurotus ostreatus</i>	31
5.5.10.1 Purificación	
5.5.11 Técnicas de Hexiang <i>et al.</i> (2000) en <i>Pleurotus ostreatus</i>	32
5.5.11.1 Purificación	
5.5.12 Técnicas de Zhang <i>et al.</i> (2009) en <i>Pleurotus ostreatus</i>	32
5.5.12.1 Purificación	
5.5.13 Técnicas de Kawagishi <i>et al.</i> (2000) en <i>Pleurotus ostreatus</i>	33
5.5.13.1 Purificación	
5.6 Ensayos utilizando lectinas.....	33
5.6.1 Ensayos de lectinas de veneno de <i>Lachesis muta</i> en la actividad hemoaglutinante propuestos por	

Palomina en 2012.....	33
5.6.1.1 Efecto de carbohidratos	
5.6.1.2 Efecto de agentes reductores y quelantes	
5.6.1.3 Efecto de agentes químicos	
5.6.1.4 Efecto de iones divalentes	
5.6.2 Ensayos de lectinas en la actividad hemoaglutinante y de afinidad por carbohidratos en <i>Caesalpinia spinosa</i> propuestos por Blasco en 2004.....	34
5.6.2.1 HPLC de fase inversa	
5.6.2.2 Electroforesis SDS-PAGE	
5.6.2.3 Prueba de Hemoaglutinación	
5.6.2.4 Actividad Hemoaglutinante	
5.6.2.5 Análisis de la secuencia aminoacídica	
5.6.3 Ensayos de lectinas en la actividad hemoaglutinante, secuenciación de péptidos, efecto de cationes metálicos y estabilidad al pH en <i>Phaseolus folius</i> propuestos por Torres en 2010.....	35
5.6.3.1 Cuantificación de proteína	
5.6.3.2 Determinación de actividad aglutinante	
5.6.3.3 Perfil electroforético monodimensional	
5.6.3.4 Perfil electroforético bidimensional y determinación del punto isoeléctrico	
5.6.3.5 Identificación de glicoproteínas	
5.6.3.6 Cromatografía de FPLC	
5.6.3.7 Cromatografía de afinidad	
5.6.3.8 Identificación de la(s) lectina(s) por espectrometría de masas	
5.6.3.9 Secuenciación de péptidos	
5.6.3.10 Identificación de los carbohidratos	
5.6.3.11 Efecto de cationes metálicos	
5.6.3.12 Estabilidad al pH y determinación del pH óptimo	
5.6.4 Ensayos de lectinas en la actividad antitumoral en <i>Agrocybe aegerita</i> propuestos por Zhao <i>et al.</i> en 2003.....	39
5.6.4.1 Ensayos de MTT	
5.6.4.2 Estudios in vivo	
5.6.4.3 Tinción Hoechst 33258	
5.6.4.4 Sensor de membrana mitocondrial ApoAlert	
5.6.4.5 Análisis del ciclo celular	
5.6.4.6 Prueba de TUNEL	
5.6.4.7 Prueba de actividad de DNasa	
5.6.5 Ensayos moleculares y bioquímicos de lectinas propuestos por Khan y Khan en 2011.....	40
5.6.5.1 Punto isoeléctrico	
5.6.5.2 El contenido de carbohidratos	
5.6.5.3 Requerimiento de iones metálicos	
5.6.5.4 Estabilidad y desnaturalización	
5.6.5.5 Propiedad fluorométrica	

5.6.5.6 Las modificaciones químicas	
5.6.6 Ensayos de actividad hemoaglutinante, actividad antiproliferativa en líneas de células tumorales e inhibición de la actividad transcriptasa inversa VIH-1 propuestos por Zhang <i>et al.</i> en 2009.....	42
5.6.6.1 Ensayo para la actividad de lectina (hemoaglutinante)	
5.6.6.2 Ensayo de la actividad antiproliferativa en líneas de células tumorales	
5.6.6.3 Ensayo para el inhibidor de la actividad transcriptasa inversa VIH-1	
5.6.7 Ensayos de hemoaglutinación, actividad antifúngica, actividad inhibitoria de la transcriptasa inversa y de actividad antitumoral propuestos por Zhang <i>et al.</i> en el 2009.....	43
5.6.7.1 Ensayo de hemoaglutinación	
5.6.7.2 Ensayo de actividad antifúngica	
5.6.7.3 Ensayo de actividad inhibidora de la transcriptasa inversa	
5.6.7.4 Los ensayos para la actividad antitumoral	
5.6.8 Ensayos de determinación de proteínas, de la actividad de la glucosidasa y de tinción de proteínas propuestos por Brechtel <i>et al.</i> en 2001.....	45
5.6.8.1 Determinación de proteínas	
5.6.8.2 Actividad de la glucosidasa	
5.6.8.3 Tinción de proteínas	
5.7 Secuencias de aminoácidos.....	47
6. Análisis de datos y discusión.....	54
7. Conclusiones.....	59
8. Recomendaciones.....	60
9. Literatura citada.....	61
10. Anexos.....	67
I Nombres científicos y comunes de los organismos mencionados en el trabajo.....	67
II Algunas secuencias de aminoácidos reportadas por el NCBI.....	70
III Simbología de aminoácidos.....	85
IV Técnicas.....	87

RESUMEN

Los hongos constituyen un grupo muy extenso de organismos que se encuentran virtualmente en todos los nichos ecológicos. Los basidiomicetos tienen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antitumorales e inmunomoduladoras, por lo que pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades y en beneficio de la salud de los seres humanos, varias de estas propiedades se les atribuyen a las lectinas. El término lectina se aplica a proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que reconocen de manera específica carbohidratos de la superficie celular o en suspensión, aglutinan células y precipitan glicoconjugados.

Se realizó una extensa búsqueda bibliográfica utilizando libros, revistas y tesis de la Unidad de Documentación Científica (UDC) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, así como revisiones en internet de artículos relacionados con el tema de lectinas. Se encontraron distintos tipos de clasificaciones de lectinas así como las técnicas más utilizadas para la purificación de lectinas que principalmente son cromatografías, además de 9 secuencias de aminoácidos de lectinas de *Pleurotus cornicopiae* y una de *Pleurotus ostreatus* en la base de datos "The National Center for Biotechnology Information".

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos constituyen un grupo muy extenso de organismos, se encuentran virtualmente en todos los nichos ecológicos, existen mundialmente 1.5 millones de especies de las cuales únicamente 69 000 han sido descritas. Son eucariontes inferiores, su nutrición es por absorción, secretan diversas enzimas que los ayudan a “pre-digerir” sus nutrimentos.

Los basidiomicetos tienen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antitumorales e inmunomoduladoras, por lo que pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades y en beneficio de la salud de los seres humanos (Ganeshpurkar *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista taxonómico, la mayoría de los basidiomicetos y algunos ascomicetos pertenecen a la categoría de setas, de las cuales existen 22 000 especies conocidas. Sólo el 10% de estas especies han sido exploradas y se sugiere que 7 000 especies que aún no se han descubierto podrían brindar beneficios a la humanidad. Las setas son una fuente importante de vitaminas, especialmente de tiamina, riboflavina, niacina, biotina y ácido ascórbico. Las vitaminas A y D raramente están presentes, pero algunas especies contienen una cantidad detectable de vitamina D cuando se las expone a luz ultravioleta. El contenido lipídico de estos hongos consiste en monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos, esteroides y fosfolípidos.

En la actualidad, las setas medicinales han despertado un interés cada vez mayor, ya que se intenta descubrir aquellos componentes que pueden modular la respuesta de las células inmunitarias. De esta manera, podrían ser útiles para estimular y reforzar la respuesta biológica del sistema inmunitario. Además, podrían utilizarse en el tratamiento de tumores y otros estados de inmunodeficiencia si se las combina con antibióticos o vacunas. En caso de que tuvieran actividad inmunosupresora, podrían utilizarse en enfermedades autoinmunes (Suay *et al.*, 2000).

2. ANTECEDENTES

2.1 El género *Pleurotus*

El género *Pleurotus* pertenece a la clase de los basidiomicetos, son hongos degradadores de materiales lignocelulósicos, por lo que utilizan para su crecimiento residuos tanto agrícolas como agroindustriales. En México los hongos comestibles del género *Pleurotus* son conocidos con el nombre comercial de setas. Este tipo de hongos ocupan el segundo lugar en producción en Latinoamérica con el 4.6% (seta blanca, gris y café: 2,190 ton/año), sólo después de *Agaricus bisporus*. Actualmente las setas son cultivadas en 21 estados de México y se observa que el interés por cultivarlos se incrementa no únicamente en este país, sino en la mayoría de los países latinoamericanos, como estrategia de desarrollo económico de producción de un alimento, y de utilización de subproductos agrícolas (Martínez–Carrera, 2006).

Varias especies de *Pleurotus* han demostrado poseer propiedades medicinales, las cuales se presentan en los extractos o compuestos aislados de *Pleurotus spp*, en el medio de cultivo obtenido por fermentación, en su micelio o en los cuerpos fructíferos.

Algunas de las propiedades antes mencionadas en basidiomicetos, en específico en el género *Pleurotus*, son atribuidas a las lectinas que son proteínas de distribución cosmopolita a las que se les atribuye características biológicas tales como: aglutinación de eritrocitos y otras células, inducción de mitosis en linfocitos, efectos citotóxicos sobre linfocitos, aglutinación de virus entre otras (Gregori *et al.*, 2007).

Por su valor nutricional, su amplia distribución, sencilla obtención y producción e importancia en la investigación de medicamentos, sobresalen tres especies del género *Pleurotus* que son *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* y *P. djamor* (Diwakar *et al.*, 1989), que se describirán a continuación.

***Pleurotus ostreatus* (Kumm 1871)**

P. ostreatus es un típico hongo agarical, a menudo se encuentra recubierto de una capa miceliar en la base y presenta carne delgada y blanca; al principio el píleo tiene forma de lengua y cuando madura adquiere forma de concha; las láminas son blancas o de color crema, en las cuales se disponen los basidios no tabicados con cuatro basidiosporas blanquecinas elípticas.

El píleo donde se encuentran las lamelas o laminillas es excéntrico cuando crece en superficies verticales y es central cuando crece en camas, superficie lisa y brillante, y un poco viscosa en tiempo húmedo; el estípite es corto y excéntrico; las lamelas son blancas, decurrentes y espaciadas ampliamente; las esporas en masa son blancuzcas o de color gris-blancuzco (Cardona y Bedoya, 1996).

Posee regularmente de 4-13 cm de diámetro, aunque ocasionalmente puede presentar tamaños mayores de acuerdo a las condiciones de fructificación; la superficie superior presenta color variable según la intensidad de la luz, con tonos entre blancuzcos, grises o azulados, según sea la iluminación; su margen es suave, delgada, ondulada y ocasionalmente enrollada. Presenta pie corto de dos a tres centímetros de longitud por uno a dos centímetros de grueso y fibras de color crema claro.

Su distribución es cosmopolita y se da prácticamente en cualquier época del año (Guzmán, 1993).



Figura 1. *Pleurotus ostreatus*

***Pleurotus pulmonarius* (Kumm, 1871)**

P. pulmonarius, comúnmente conocido como la ostra india, Seta Phoenix, o la ostra pulmón, es una seta muy similar a *P. ostreatus* pero con algunas diferencias notables. Los sombreros de *P. pulmonarius* son mucho más pálidos y más pequeñas que *P. ostreatus* y desarrolla más de un vástago. *P. pulmonarius* también prefiere un clima más cálido que *P. ostreatus* y aparecerán más adelante en el verano. *P. pulmonarius* presenta un sombrero convexo expandido ampliamente, ondulado en forma de ostra, eventualmente plano y muchas veces ondulado al envejecer, de 5-20 cm de diámetro, grisáceo, blanca a beige. El pie es típicamente, excéntricamente, pegado al sombrero, con velo ausente (Breene, 1990). Estos hongos forman grupos de más de 5 a 6

fructificaciones. Conocido comúnmente como hongo blanco, y en general con los mismos nombres comunes que *P. ostreatus*, se diferencia de este por ser blanquecino (Guzmán, 1993).

Ampliamente reportado en Norteamérica y Europa, se encuentran desde los 1200 hasta los 3000 m.s.n.m. Son comunes en primavera y verano (Anaya, 2008).



Figura 2. *Pleurotus pulmonarius*

***Pleurotus djamor* (Boedijn, 1959)**

P. djamor, conocido comúnmente como el hongo de la ostra de color rosa, al igual que los dos anteriores pertenece a la familia *Pleurotaceae*. Originalmente fue nombrado *P. djamor agaricus* por el botánico de origen alemán Georg Eberhard Rumphius, y descrita bajo ese nombre por Elias Magnus Fries en 1821. Era conocido por muchos nombres diferentes, antes de ser transferido al género *Pleurotus* por Karel Bernard Boedijn en 1959.

Tiene su nombre por el intenso color rosado de su sombrero, compartiendo la forma y el aspecto general de *P. ostreatus* excepto que los primordios son de color rojizo brillante ("salmón-huevo"). Las transiciones de color no sólo son dependientes de la edad, sino que varían entre las cepas y son influenciados por las condiciones de luz. Cuando se cultivan, a menudo aparecen variantes de la fructificación misma (Guzmán, 1993).

Crece en grupo denso y es capaz de florecer en una amplia variedad de materiales de base. Esta especie es tan agresiva como para colonizar sustratos pasteurizados a granel antes que los competidores puedan florecer por lo que su distribución es cosmopolita.

Debido a su alta tolerancia a la temperatura pero a la vez muy sensible al frío rara vez aparece en invierno a menos que sea en condiciones de invernadero.



Figura 3. *Pleurotus djamor*

2.2 Composición química y nutricional de las especies *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* y *P. djamor*

La especie *P. ostreatus* contiene proteína bruta entre 26 % y 34 %, proteína neta \approx 18 %, carbohidratos en un 48.9 %, lípidos en un 2,2 %. Su valor energético es de 350 cal/Kg, contiene 4.7 mg/100gr de Riboflavina , 108.7 mg/100gr de Niacina y 4.8 mg/100 gr de Tiamina.

El bajo contenido de grasa y sodio, unido al relativamente alto contenido de potasio, hacen que este hongo además de su buen sabor y valor nutritivo, tenga también importancia para padecimientos cardiovasculares y estados de hipertensión, así como para combatir la obesidad. En él están presentes virtualmente todos los aminoácidos esenciales, constituyendo una rica fuente de vitaminas, se han reportado contenidos de ácido ascórbico (vitamina C), en diferentes etapas de su desarrollo, es rico en ergosterol y vitamina D, así como en minerales como: fósforo, sodio, magnesio, calcio, hierro, manganeso, zinc y cobre (Trigos *et al.*, 1996).

La especie *P. pulmonarius* contiene entre un 20 a un 26% de proteína, entre 1-2.6% de lípidos, de 4 a 9% de fibra, de 0.007 a 0.015% de hierro, de 0.07 a 0.25% de magnesio, de 0.5 a 2.3% de potasio y de 0.003 a 0.06% de calcio (Anaya, 2008).

La especie *P. djamor* contiene entre 27.4 y 32.7 g/100 g de carbohidratos, entre 19.8 y 20.5 g/100g y entre 12.7 y 22.4 g/100g de fibra. Además se ha reportado presencia de lípidos, vitaminas, fósforo y potasio (Rampinelli *et al.*, 2010).

2.3 Lectinas

El término lectina se aplica a proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que reconocen de manera específica carbohidratos de la superficie celular o en suspensión, aglutinan células y precipitan glicoconjugados; las lectinas poseen por los menos dos sitios de reconocimiento a carbohidrato, de ahí su capacidad para aglutinar células, aunque en la actualidad el término de lectina se ha aplicado a proteínas con un solo sitio de reconocimiento a carbohidrato como es el caso de las selectinas. Las lectinas no poseen actividad enzimática.

Las lectinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido identificadas en diversos organismos como virus, bacterias, hongos, plantas, así como en invertebrados y vertebrados superiores (Hernández, 2005).

El primer estudio sobre lectinas lo reportó Stillmark en 1888 al observar el fenómeno de hemaglutinación con extractos de semilla de *Ricinus communis*, cuya proteína fue llamada Ricina que aglutina a eritrocitos.

Fue hasta el año de 1919 que se obtuvo la primera lectina en forma cristalina, descubierta por Summer a partir del frijol *Canavalia ensiformis* y se llamó concaivalina A1.

En la década de los años 40, Reguera y William reportaron que ciertas semillas contenían aglutininas específicas para antígenos de los grupos sanguíneos humanos.

El primero en plantear el término lectina fue Boyd en 1954, al observar que algunas aglutininas obtenidas de semillas de plantas podían reconocer a un grupo sanguíneo específico y aglutinarlo (Pérez, 1999).

En las plantas se han detectado, principalmente en los cotiledones y endospermos de las semillas y constituyen del 2 al 10 % del total de las proteínas de éstas. La mayoría de las lectinas se encuentran en órganos de reserva, lo cual es una evidencia indirecta de su papel como proteínas de defensa.

Aún después del descubrimiento de las lectinas, los científicos han estado intrigados por sus posibles papeles biológicos. Un avance se presentó cuando se comprendió que la mayoría de las lectinas vegetales no sólo cumplen un papel en la misma planta, por ejemplo, como una fuente de

nitrógeno o como un factor de reconocimiento específico, sino que también interactuarían con glucoconjugados de otros organismos (Werner, 2007).

Entre las lectinas de vegetales mejor conocidas se encuentran las siguientes:

La Concanavalina A, que es una proteína que se obtiene de la planta *Cannavalia ensiformis* que actúa específicamente uniéndose a restos de a -D-glucosa y a -D- manosa.

La Aglutinina de germen de trigo, también llamada fitohemaglutinina, cuyo sitio de unión es con el ácido b -N-acetilneuramínico y con el ácido a -N-acetilneuramínico.

Otra lectina vegetal importante es la que se encuentra en el frijol rojo, *Phaseolus vulgaris* se sabe que tiene acción mitogénica, es decir, que tiene la capacidad de aglutinar específicamente células malignas, lo cual ha desarrollado un gran interés en investigación para utilizarlas como tratamiento para el control de crecimiento de tumores (Bohinski, 1991).

Las lectinas están compuestas por una cadena polipeptídica en la cual pueden estar unidos o no uno o más residuos de carbohidratos, normalmente de 2 a 15 monosacáridos residuales, que pueden estar constituidos principalmente por dos o más azúcares como: D- Manosa, D-galactosa, D-Glucosa, L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido salicílico, glucosamina y galactosamina (Pérez, 1999).

Las lectinas tienen usos importantes en el campo de la Genética, la Biomedicina y la Inmunología. Su utilidad está basada en la propiedad que tienen de combinarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en las superficies celulares y fluidos corporales.

Sus propiedades mitogénicas permiten que se utilicen en estudios que tienen como base la proliferación de linfocitos en cultivos, como son:

- La evaluación de la producción de citoquinas (interferón e interleuquinas) y la expresión de sus receptores en sobrenadantes de cultivos de linfocitos provenientes de pacientes con enfermedades de alto impacto social como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la tuberculosis y la leishmaniasis, entre otras (Born *et al.*, 1995).
- La caracterización de algunos aspectos relacionados con la respuesta inmune y fenómenos asociados con ellas como la inmunosupresión (Baveja *et al.*, 1995).
- La interacción entre virus, como por ejemplo entre el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis B, así como la susceptibilidad y resistencia a éstos (Pernthaler *et al.*, 1995).
- Evaluación de la efectividad de terapias antirretrovirales de acuerdo con la respuesta de los linfocitos a la estimulación con las lectinas antes y después de la terapia, como por ejemplo en terapias contra el VIH (Casseb *et al.*, 1995).
- Análisis de funciones linfoproliferativas y citotóxicas en células mononucleares causadas por algunas drogas (Lebrec *et al.*, 1995).
- Estudios acerca de la influencia nutricional en la proliferación de linfocitos y su cinética de proliferación (Lahfa *et al.*, 1995).
- La inducción de genes en linfocitos (Schwarz *et al.*, 1995).
- La detección de anomalías cromosómicas (Tomasetti *et al.*, 1995).

Actualmente se han estudiado en detalle 9 lectinas con efecto mitogénico sobre los linfocitos, entre las que se destacan las provenientes de *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Canavalia ensiformis*, *Pisum sativum* (PSA) y *Fitolaca americana* (PWM).

Estos mitógenos pueden activar de forma diferente los linfocitos T y B, por ejemplo la PHA y Con A inducen mitogenicidad en células T, mientras que el mitógeno de carmín (PWM) estimula ambos tipos de células. No se conoce lectina alguna que estimule sólo a los linfocitos B humanos (Hernández *et al.*, 1999).

El empleo de lectinas vegetales para el estudio de las interacciones proteína-carbohidratos, ha puesto en evidencia muchos mecanismos de interacción molecular como es el caso del reconocimiento de receptores glicosilados en la superficie celular. Un ejemplo de la participación de los oligosacáridos es la regulación que ejercen sobre su crecimiento celular, donde, las modificaciones en las estructuras oligosacáridicas de proteínas de membrana se han asociado con la capacidad de las células para invadir y colonizar otros tejidos. El estudio de las bases moleculares que permiten la interacción proteína-carbohidrato han sido abordados utilizando distintas técnicas. Sin embargo, el empleo de lectinas ha permitido no solamente profundizar en los cambios conformacionales que sufren los carbohidratos en el sitio de reconocimiento, sino que también ha permitido la caracterización de nuevos receptores y el desarrollo de nuevas disciplinas como la Glicobiología, ciencia encargada de estudiar la estructura y función de los carbohidratos y los mecanismos que originan enfermedades por alteraciones en su expresión en proteínas, lo que ha abierto todo un nuevo campo en el ámbito científico (Hernández, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 General

-Determinar la importancia, usos y técnicas de estudio de las lectinas, con especial énfasis en las del género *Pleurotus*.

3.2 Particulares

-Identificar las distintas clasificaciones de lectinas.

-Reconocer los posibles usos de las lectinas.

-Determinar los tipos de lectinas que más se han estudiado.

- Describir las técnicas más utilizadas para la purificación de lectinas.

-Comparar las secuencias de aminoácidos de diferentes tipos de lectinas con las obtenidas de *Pleurotus* y otros Agaricales.

-Identificar qué lectinas se han estudiado de las setas del género *Pleurotus*, principalmente en las especies *P. djamor*, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*.

4. MÉTODO

Se realizó una extensa búsqueda bibliográfica utilizando libros, revistas y tesis de la Unidad de Documentación Científica (UDC) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, así como revisiones en internet con los buscadores de google académico y yahoo de artículos relacionados con el tema de lectinas tanto en una computadora personal como en la sala de cómputo de la FES Iztacala. La búsqueda se fue haciendo en el mismo orden que los objetivos y para la consulta de las secuencias de aminoácidos se consultó la base de datos de The National Center for Biotechnology Information, más específicamente el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

5. RESULTADOS

5.1 Tipos de lectinas

5.1.1 Composición de las lectinas

El término lectina define en la actualidad una amplia gama de proteínas de origen vegetal y animal capaces de unirse en forma más o menos específica a moléculas de azúcares, formando uniones muy similares a las de las enzimas con sus sustratos y los anticuerpos por sus respectivos antígenos (Sharon, 1977).

Los estudios de extractos purificados de lectinas de leguminosas revelaron la existencia de dos grupos de proteínas:

A) Compuestos de un solo tipo de cadena polipeptídica.

B) Compuestos de dos tipos de cadena, una liviana (A) y otra pesada (B) (Kolberg, 1981).

En el caso de la concavalanina-A (Con-A) se encontró que estaba compuesta de subunidades dispuestas asimétricamente, de peso molecular 25.5 KDa, unidas como dímeros, tetrámeros y formas de alto peso molecular dependientes del pH: a pH inferior a 5.6 Con-A existe como dímero en solución (PM = 55 KDa) a pH 5.6 forma un tetrámero (PM = 112 KDa), y a pH 7 está como agregados de alto peso molecular. Cada subunidad posee un sitio de unión y además un átomo de Mn^{+2} y uno de Ca^{+2} .

Cada cadena posee una secuencia de 238 aminoácidos, y la molécula de Con-A adquiere una estructura globular (Barondes, 1984).

La toxina de *Ricinus communis* tiene un peso molecular de 60 KDa y consiste en dos cadenas distintas unidas por puentes disulfuro. La subunidad A tiene peso molecular 28 KDa y la B 32 KDa. La composición de aminoácidos de ambas unidades ha sido determinada y muestran una gran similitud. Esta toxina se une a un carbohidrato de la membrana celular de las células eucarióticas por medio de la subunidad B mientras que la subunidad A inhibe la síntesis de proteínas. De esto surge su toxicidad: primero se une a la célula y luego (ingerida por ésta) produce efectos tóxicos. La subunidad B es una lectina con especificidad hacia la galactosa (Casellas, 1982).

La lectina de la lenteja (*Lens culinaris*) está compuesta por dos cadenas livianas (A) y dos pesadas (B) (Kolberg, 1981).

En *Viscum album* se han aislado tres lectinas. La lectina 1 es una glicoproteína de PM 115 KDa y consiste en dos subunidades unidas en forma no covalente. Cada subunidad está formada por dos

cadena de PM 29 KDa y 34 KDa unidas por puentes disulfuro. Esta lectina 1 ha sido estudiada por sus efectos citotóxicos sobre algunas células tumorales (Luther, 1977).

En cuanto a las lectinas solubles aisladas de vertebrados, capaces de unirse a beta-galactósidos, las mejores estudiadas son el grupo de proteínas diméricas encontradas en la anguila eléctrica, pollos, ratas y hombre. Estas lectinas son similares en el peso molecular de sus subunidades y en su estructura dimérica y también en que requieren un agente reductor para mantener su capacidad de unirse a un carbohidrato (Barondes, 1984).

Otro grupo de lectinas de vertebrados capaces de unirse a beta-galactósidos puede ser aislado como monómeros. La que fue examinada con más detalle fue purificada de un intestino de pollo y designada como Lactosa-lectina II. Esta difiere de la Lactosa-lectina I en que se trata de un monómero, en el punto isoeléctrico, en su composición aminoacídica y en que es inmunológicamente distinta.

La fibronectina consiste en dos unidades similares unidas por un par de uniones disulfuro. La acción de enzimas proteolíticas revela que cada unidad está subdividida en dominios, con lo cual la proteína está estrechamente plegada y se hace resistente a la degradación (Hynes, 1986).

Sharon en 1996 agrupó a las lectinas en distintas familias de proteínas homólogas que comparten propiedades estructurales comunes. La familia más grande y mejor caracterizada es la de las leguminosas, mientras que las lectinas de cereales forman una familia más pequeña. Los otros dos tipos de lectinas son los de origen animal.

Se encontraron 21 lectinas de origen vegetal, 9 lectinas fúngicas y solamente 4 lectinas de origen animal dentro de los organismos mayormente mencionados en las bases de datos y recopilados en la presente investigación como se puede apreciar tanto en la figura 4 como en la tabla 1, estas cifras no son representativas pero nos ayudan a forjarnos una idea de la distribución de las lectinas por su origen.

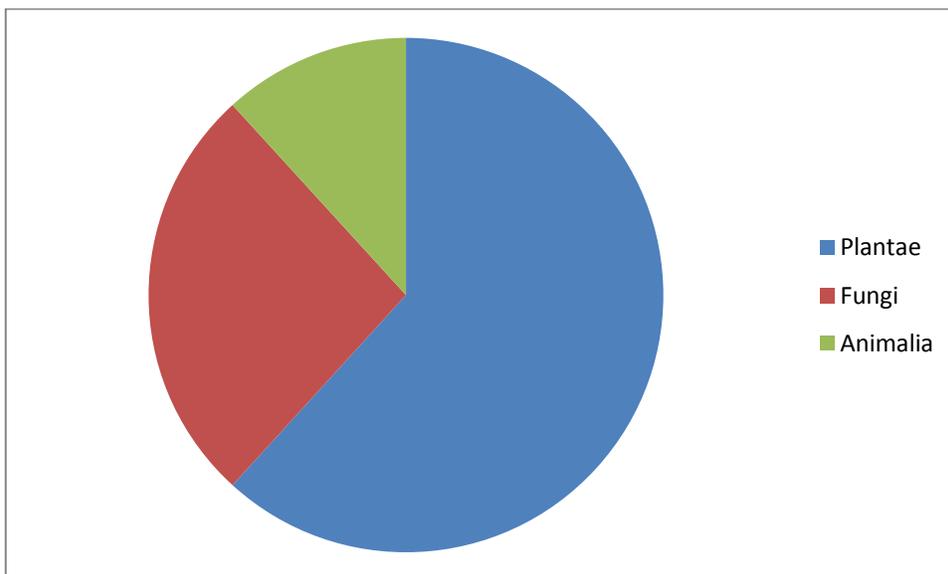


Figura 4. Distribución de las lectinas mencionadas en el trabajo según su origen. 61.7% de las lectinas fueron de origen vegetal (azul), 26.4% de las lectinas fueron fúngicas (rojo) y 11.7% de las lectinas fueron de origen animal (verde).

Tabla 1. Lectinas de origen vegetal, fúngicas y animales. Se encontraron 21 lectinas de origen vegetal, 9 lectinas fúngicas y solamente 4 lectinas de origen animal dentro de los organismos mayormente mencionados en las bases de datos y recopilados en la presente investigación

Plantae	Fungi	Animalia
PHA de <i>Phaseolus vulgaris</i>	lectina de <i>Macrophomina phaseolina</i>	lectina Galactosa
Con-A de <i>Cannavalia ensiformis</i>	lectina de <i>Rhizoctonia solani</i>	botroctina de <i>Bothrops jararaca</i>
PSA de <i>Pisum sativum</i>	AAL de <i>Agrocybe aegerita</i>	bitiscetina de <i>Bitis arietans</i>
PWM de <i>Fitolaca americana</i>	lectina de <i>Polyporus adusta</i>	lectina del veneno de <i>Lachesis muta</i>
Lectina de <i>Viscum album</i>	ABA de <i>Agaricus bisporus</i>	
LCH de <i>Lens culinaris</i>	lectina de <i>Paxillus involutus</i>	
RCA de <i>Ricinus communis</i>	lectina de <i>Pleurotus ostreatus</i>	
PNA de <i>Arachis hypogaea</i>	lectina de <i>Pleurotus cornucopiae</i>	
AIL Jacalina	lectina de <i>Xerocomus chrysenteron</i>	
VVL de guisante velludo		
WGA de <i>Triticum spp</i>		
SNA de sauco		
MAL de <i>Maackia amurensis</i>		
MAH de <i>Maackia amurensis</i>		
UEA de <i>Ulex europaeus</i>		
AAL de <i>Aleuria aurantia</i>		
lectina de <i>Saphora japonica</i>		
lectina de <i>Erythrina costaricensis</i>		
lectina de amaranto		
lectina de <i>Caesalpinia spinosa</i>		
lectina de <i>Phaseolus folius</i>		

5.1.2 Clasificación de Peumans y Van Damme (1995)

Estos autores clasificaron a las lectinas según su estructura en tres tipos principales:

A) Merolectinas: son proteínas pequeñas que poseen exclusivamente un dominio de unión a carbohidratos. Debido a su naturaleza monovalente no pueden precipitar glicoconjugados o aglutinar células.

B) Hololectinas: poseen dos o más dominios de unión a carbohidratos idénticos u homólogos. Este grupo incluye todas las lectinas con múltiples sitios de unión, las cuales tienen la capacidad de aglutinar células o precipitar glicoconjugados.

La mayoría de las lectinas de plantas conocidas son hololectinas, debido a que ellas se comportan como hemaglutininas.

C) Quimerolectinas: son proteínas de fusión que poseen un dominio de unión a carbohidratos y un dominio con actividad catalítica u otra actividad biológica que actúa independientemente del dominio de unión a carbohidratos. Dependiendo del número de sitios de unión al azúcar las quimerolectinas se comportan como merolectinas u hololectinas.

5.1.3 Clasificación de Weis y Drickamer (1996)

Posteriormente, estos autores clasificaron a las lectinas en cinco grupos principales:

- A) Dependientes de Ca^{2+} o tipo C.
- B) Galectinas, unidas a galactosa.
- C) Tipo P, receptores de manosa 6-fosfato.
- D) Tipo I, que incluyen las sialoadhesinas y otras proteínas de unión a carbohidratos relacionadas con las inmunoglobulinas.
- E) Tipo L, relacionadas en secuencia a las lectinas de las leguminosas.

5.1.4 Clasificación de Fluoprobos (2012)

Una división bastante utilizada es tomando en cuenta qué tipo de molécula es a la que enlaza.

Lectina enlazadora de manosa:

- ConA Concaivalina A
- LCH Lectina de lenteja
- GNA Lectina copo de nieve

Lectina enlazadora de Galactosa/N-acetilgalactosamina

- RCA Ricina
- PNA Aglutinina cacahuate
- AIL Jacalina
- VVL Lectina de guisante velludo

Lectina enlazadora de N-acetilglucosamina

- WGA Aglutinina de germen de trigo

Lectina enlazadora de ácido N-acetilneuramínico

- SNA Lectina de sauco
- MAL Leucoaglutinina de *Maackia amurensis*
- MAH Hemoaglutinina de *Maackia amurensis*

Lectina enlazadora de Furosa

- UEA Aglutinina de *Ulex europaeus*
- AAL Lectina de *Aleuria aurantia*

5.1.5 Clasificación de Hernández (2005)

Actualmente debido a la gran cantidad de datos cristalográficos de lectinas vegetales, éste autor ha propuesto una nueva clasificación con base en su estructura molecular, la cual tiende a reemplazar a la clasificación basada en la especificidad y en la cual podemos distinguir seis familias de lectinas:

A) Lectinas aisladas de leguminosas.

Es la familia de lectinas vegetales más estudiada, generalmente se encuentran constituidas por dos o cuatro subunidades idénticas de 25 a 30 kDa, cada una de las sub-unidades contiene un sitio de unión para iones metálicos Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} .

Una subunidad contiene aproximadamente 250 aminoácidos y presenta una gran homología con las otras subunidades. Está constituida por doce hojas β antiparalelas conectadas entre sí mediante bucles, lo que genera una estructura aplanada en forma de domo, cuatro bucles localizados en la parte superior del monómero forman el sitio de reconocimiento a carbohidratos.

B) Lectinas con dominios tipo heveína o específicas de quitina.

Los miembros de esta familia generalmente presentan dos subunidades idénticas, ricas en cisteínas contrariamente a las lectinas de leguminosas. Una subunidad está constituida por cuatro dominios tipo heveína, conteniendo cuatro puentes disulfuros, lo cual origina que no existan estructuras secundarias regulares a excepción de una pequeña α hélice de cinco residuos, cada dominio presenta un sitio de reconocimiento a carbohidrato, que no necesita la presencia de iones metálicos.

C) Lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa.

A este grupo de lectinas pertenecen las de orquídeas, ajo y amarilis, con secuencias de aminoácidos altamente conservadas. Estas lectinas son tetraméricas, cada monómero tiene un peso molecular de 12 kDa, así como una secuencia de 36 aminoácidos repetidas tres veces. El sitio de reconocimiento a carbohidrato está constituido por cuatro hojas β antiparalelas unidas entre sí por giros. El conjunto se asocia de manera que forma una corona aplanada, dejando aparecer un gran túnel central.

D) Lectinas en forma de prisma β o del tipo jacalina.

En este grupo, se encuentran lectinas vegetales, que presentan estructuras tridimensionales muy similares a la de *Artocarpus integrifolia* (jacalina).

Lectinas tetraméricas glicosiladas, donde cada sub-unidad contiene una cadena pesada (α) y una cadena ligera (β), y está constituida por tres hojas β antiparalelas arregladas a manera de un prisma triangular.

E) Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas.

Estas proteínas forman parte de los venenos más tóxicos. Su estructura molecular es compleja. Están constituidas por dos cadenas, la A y B, las cuales son diferentes y se encuentran unidas por dos puentes disulfuro. La cadena A es la responsable de la toxicidad (actividad de N-glicosidasa sobre el ribosoma que inactiva la traducción), mientras que la cadena B, posee la actividad de lectina. La cadena B está constituida por dos dominios que presentan cuatro sub-unidades, las cuales contienen α hélices y hojas β .

F) Lectinas tipo amaranto.

Dentro de este grupo encontramos lectinas provenientes de distintas especies de amaranto, entre las que destacan *Amaranthus caudatus* y *A. leucocarpus*. Cada proteína se encuentra formada por dos monómeros en los que existen dos dominios N y C, cada dominio muestra una conformación de trébol β semejante a la conformación observada en la cadena B de la lectina de *Ricinus communis*.

5.2 Usos de las lectinas

Las lectinas son proteínas capaces de reconocer estructuras glucídicas, pueden ser utilizadas para la caracterización de glicoconjugados solubles, celulares y tisulares, en individuos normales y con patologías diversas. Esto exige el desarrollo de métodos de estudio de las interacciones entre lectinas y estructuras glucídicas suficientemente rápidos y sensibles. Diferentes técnicas generalmente adaptadas a la inmunología y la inmunoquímica podrían ser utilizadas, usando lectinas en su estado nativo o modificadas.

Un "screening" regular in vitro de membranas solubilizadas enfrentadas a una batería de lectinas por difusión en gel de agar o por otras técnicas más refinadas podría ayudar a identificar y aislar receptores de membrana que son elementos que confieren individualidad a las células, determinando su comportamiento en el entorno (Caron, 1985).

En la tabla 2 se pueden observar diversas lectinas citadas en el presente trabajo así como los usos reportados en el mismo.

Tabla 2. Lectinas mencionadas en el trabajo, su clasificación por familias según sus enlaces y sus posibles funciones

LECTINAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
FUNCIONES																			
Hemaglutinación	x	x																	
Reconocimiento de grupos sanguíneos	x					x													
Acción mitógena	x														x	x			
Anormalidades cromosómicas															x				
Reconocimiento de estructuras glucídicas	x																		
Efecto inhibitorio en el crecimiento de tumores		x		x				x											
Efecto inhibitorio en la inducción de cáncer	x																		
Activación linfocitaria	x														x				
Bloquear receptores en células	x														x				
Reducción de absorción intestinal de glucosa															x				
Inhibición de liberación de histamina				x															
Degranulación del mastocito	x	x														x			
Inhibición de la granulación del mastocito												x							
Receptores en superficies de parásitos	x		x		x														
Toxina		x		x				x											
Estimulación de células B																	x		
Anticoagulante																		x	
Mapear vías neurales							x												
Insecticida								x											
Evaluación acrosomal	x																		x

SIMBOLOGIA

	Lectina enlazadora de manosa
	Lectina enlazadora de galactosa/ N-acetilgalactosamina
	Lectina enlazadora de N-acetilglucosamina
	Lectina enlazadora de ácido N-acetilneuraminico
	Lectina enlazadora de Furosa
	Familia no citada en los articulos revisados
1	Concavalina-A
2	RCA Ricina
3	LCH lectina de lenteja
4	Lectina de <i>Viscum album</i>
5	GNA lectina copo de nieve
6	AIL Jacalina
7	VVL Lectina de guisante
8	WGA Aglutinina de germen de trigo
9	SNA Lectina de sauco
10	MAL Leucoaglutina de <i>Maackia amurensis</i>
11	MAH Hemoaglutina de <i>Maackia amurensis</i>
12	UEA Aglutinina de <i>Ulex europaeus</i>
13	AAL Lectina de <i>Aleuria aurantia</i>
14	Lectina de amaranto
15	PHA fitohemoaglutinina
16	Lectina de <i>Phytolacca americana</i>
17	Echiscetina
18	PSA de <i>Pisum sativum</i>
x	Función mencionada en los articulos revisados en el presente trabajo
vacío	Función no mencionada en los artículos revisados

5.2.1 Activación linfocitaria

Algunas lectinas como la Concanavalina-A, la PHA fitohemoaglutinina o la lectina de *Phytolacca americana* tienen un amplio uso como activadoras o estimuladoras de los linfocitos cumpliendo lo que se ha dado en llamar una función mitogénica. La activación linfocitaria es un término que se refiere a un fenómeno que ocurre *in vitro*, pero que seguramente se corresponde con funciones que *in vivo* tienen que ver con procesos que ocurren cuando un antígeno interactúa con linfocitos específicos (Stiles, 1986). La activación linfocitaria es una técnica *in vitro* comúnmente usada para evaluar la inmunidad celular en enfermos con inmunodeficiencias, autoinmunidad, cáncer, etc.

Una multitud de fenómenos bioquímicos ocurren después de la incubación con mitógenos (sustancias que estimulan un gran número de linfocitos y no requieren huésped sensibilizado alguno): aumento de la síntesis de fosfolípidos, aumento de la permeabilidad a los cationes divalentes, elevación del AMP-cíclico intracelular, síntesis de ARN, proteínas y finalmente ADN y por último la división celular.

Todo esto tal vez tenga que ver con estudios sobre cómo los receptores de membrana transmiten mensajes (a través de otras sustancias llamadas "segundo mensajero") al interior de las células provocando muy distintos efectos. Existen dos rutas de transmisión: una utiliza como segundo mensajero al AMP-cíclico, en tanto que la otra utiliza un grupo de sustancias: iones Ca^{+2} , trifosfato de inositol y diacetilglicerol (Berridge, 1985).

Aunque pueden existir otras formas de activación, en el caso de la división celular se ha postulado que la señal externa (en nuestro caso la lectina) activaría de alguna manera la segunda vía de "segundos mensajeros": el trifosfato de inositol inmovilizaría el calcio intracelular, el diacetilglicerol activaría la quinasa C, la cual por su parte activa el mecanismo de intercambio de iones unidos a la membrana. Por esta vía se extraen protones de la célula y aumenta el pH. La activación de calcio y el aumento de pH contribuyen a la síntesis de ARN, proteínas y ADN.

La fitohemoaglutinina (PHA), lectina de la semilla de *Phaseolus vulgaris* y la concanavalina-A (Con-A, lectina de *Canavalia ensiformis*) son predominantemente mitógenos para los linfocitos T mientras que la lectina de *Phytolacca americana* estimula principalmente a las células B (Berridge, 1985).

El uso de las lectinas como activadores linfocitarios permitió dar un gran salto en el estudio de la respuesta inmune y los estudios cromosómicos, ya que los antígenos sólo podían estimular la proliferación en cultivos de un pequeñísimo número de linfocitos (1 de cada 1,000) (Stiles, 1986).

Las interacciones entre proteínas y glicanos juegan un papel fundamental en numerosos eventos de la regulación de la fisiología del sistema inmune, como maduración tímica, activación, migración y apoptosis de células T. Los carbohidratos son capaces de modular la fisiología linfocitaria a través de la interacción específica con lectinas endógenas como selectinas y galectinas. Estas lectinas endógenas son capaces de reconocer estructuras sacarídicas localizadas en glicoproteínas de la superficie celular y regular procesos tan diversos como proliferación, diferenciación y ciclo celular. Existen diversos niveles de control de la interacción entre lectinas y azúcares; en primer lugar podemos mencionar la expresión regulada de estas lectinas durante el desarrollo de una respuesta inmune, y en segundo lugar la regulación espacio-temporal de la actividad de glicosiltransferasas y glicosidasas cuya función es crear y modificar los azúcares específicos para estas lectinas. Existen evidencias de que la expresión y actividad de estas enzimas se regulan en forma positiva o negativa durante diferentes eventos del desarrollo, ejecución y finalización de la respuesta inmune (Toscano *et al.*, 2006).

5.2.2 Diferenciación de células malignas

El descubrimiento de que por lo menos algunas lectinas pueden diferenciar células malignas de células normales, las convierte en una potencial herramienta de diagnóstico en casos de cáncer. Este descubrimiento fue realizado trabajando con la lectina del germen de trigo y desde entonces se inició una nueva era en la investigación de las lectinas (Aub, 1963). Posteriormente Sachs e Inbar utilizaron con el mismo fin concavanalina-A (Inbar y Sachs, 1969).

Por lo general las células malignas se aglutinan con bajas concentraciones de lectina (10 a 15 pg/ml) mientras que las células normales necesitan una concentración 10 a 20 veces mayor. Y es interesante destacar que las lectinas se unen en igual proporción a ambas clases de células, pero sólo las malignas aglutinan.

En las células normales las lectinas fijadas se distribuyen uniformemente en la superficie, mientras que en las malignas se agrupan en manchas o parches, lo que facilita su aglutinación. Es más, se pudo demostrar que aún en el caso de células normales un pequeño número aglutina y estas son las que están en proceso de división.

Es como si las membranas de las células en proceso de división activa fueran más fluidas o móviles, lo que permitiría el agregado en parches de las lectinas fijas.

Esto recuerda el fenómeno de "capping" o cofia que producen los antígenos (y la antigammaglobulina humana) cuando interactúan con las inmunoglobulinas de superficie de los linfocitos B como paso previo a su endocitosis, hecho clave para el desarrollo de la respuesta inmune mediada por anticuerpos.

Estudios más profundos de estos aspectos permitirían no sólo utilizar lectinas para diagnóstico sino conocer más sobre la relación entre las transformaciones de la membrana plasmática y las alteraciones malignas, así como sobre el papel de la membrana plasmática sobre el comportamiento de la célula tumoral invasiva a diferencia de la normal (Cheema, 1972).

Castillo-Villanueva y Abdullaev en 2005 citan que en el campo de la quimioterapia contra el cáncer, el estudio de las lectinas ha jugado un rol importante.

Diferentes estudios in vivo e in vitro con numerosas lectinas de plantas han demostrado que poseen actividad antitumoral (efecto inhibitorio en el crecimiento del tumor) y actividad anticarcinogénica (efecto inhibitorio en la inducción del cáncer por carcinógenos). Los trabajos reportados utilizando diferentes lectinas de plantas en casos de cáncer, nos permiten entender que los mecanismos de acción de estas proteínas son muy variados dependiendo de diferentes factores como pueden ser el origen celular, clase de tumor y concentración de lectina (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).

Aunque se han descrito a las lectinas en su actividad antitumoral, es importante mencionar que también se describen como moléculas altamente tóxicas y que la utilización de éstas en algunos casos puede presentar efectos adversos.

La toxicidad de las lectinas se caracteriza por la capacidad de inactivar los ribosomas y se clasifican como proteínas RIP II. Dentro de las lesiones patológicas que se describen con la ingesta o administración de lectinas en animales o humanos, se observa la presencia de parenquimatosis, degeneración grasa y edema en varios tejidos. También se describe que las lectinas se unen a los grupos glicosilados de las membranas de las células epiteliales del tracto digestivo, impidiendo la absorción de nutrientes, además la presencia de coágulos en los capilares de todos los órganos, y hemorragias locales en el sitio de aplicación (Baluna *et al.*, 1996).

En la búsqueda de agentes derivados de plantas como opciones contra el cáncer, se confirma la actividad antitumoral de las lectinas de plantas, siendo éstas una herramienta útil en las investigaciones del cáncer, así como para el diagnóstico y terapia en la medicina moderna. La acción de las lectinas varía desde la especificidad de unión a azúcares hasta el mecanismo de acción a nivel molecular. La especificidad en las diferentes líneas celulares tumorales podría reflejar distintas vías de progresión de estas últimas. A nivel molecular se han descrito algunos mecanismos apoptóticos que desencadenan diferentes lectinas. Sin embargo, es importante hacer hincapié en que la respuesta del uso de las lectinas a nivel clínico continúa planteando un problema, ya que se reportan resultados contradictorios, es necesaria la continuidad de las investigaciones relacionadas con las lectinas de plantas como alternativa para el tratamiento del cáncer (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).

5.2.3 Receptores en parásitos

Un uso diagnóstico potencial surge también de estudios realizados en Brasil sobre receptores para lectinas en la superficie de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. En ellos se afirma que el empleo de las lectinas puede ser un método valioso para estudiar cambios en la superficie del parásito que pueden estar relacionados con la adhesión y penetración celular, así como para diferenciar distintas especies y estadios del mismo (Katzin, 1979).

La lectina de unión a la manosa (MBL), constituye una vía de activación del sistema de complemento. La lectina es una glicoproteína que pertenece a la familia de las lectinas tipo C y está presente en la superficie de las células de algunos microorganismos patógenos, mediando la opsonización directamente o por medio de la activación del complemento por la vía de las lectinas. Los avances en el conocimiento de la estructura y propiedades de la MBL han estado encaminados fundamentalmente al mecanismo a través del cual la MBL se une a la superficie de los parásitos, tanto helmintos como protozoarios y cómo participa el sistema de complemento en dichas enfermedades a través de su activación por esta vía del sistema de complemento (Padilla-Docal *et al.*, 2009).

Se han encontrado en la superficie del verme adulto de *Schistosoma mansoni* carbohidratos unidos a ligandos de la MBL en suero protéico. Ensayos “*in vitro*” con C1q deficientes sugieren que la MBL con las proteasas séricas MASP 1 y MASP 2 es capaz de fijar los componentes del complemento al tegumento de *Schistosoma mansoni* y activar el complemento.

Estudios “*in vitro*” con *Trichinella spiralis* revela que la MBL unida a las glicoproteínas del estadio larval 1 activa los componentes del complemento a través de la deposición del C3. El significado “*in vivo*” de la activación del complemento por la vía de la MBL se desconoce. Se ha especulado que la vía de las lectinas puede tener una consecuencia fisiológica en la interacción helminto-hospedero ya que la deposición del complemento en la superficie, puede activar este sistema por la vía de las lectinas y puede conducir a la activación de células efectoras a través de los receptores de colestina, o mediar en la inflamación de los tejidos (Klabunde *et al.*, 2000).

5.2.4 Purificación de glicoconjugados

Las lectinas en general pueden ser usadas para purificar gran variedad de glicoconjugados (enzimas, hormonas, interferón y varios antígenos).

Existen en el comercio productos para realizar cromatografía de afinidad que podrían ser fabricados con cierta facilidad, lo cual requiere la profundización de la investigación de nuevas

fuentes de lectinas, la purificación de las mismas y el desarrollo de métodos adecuados de control de calidad de los productos obtenidos (Katzin, 1979).

5.3 Aplicaciones farmacológicas

Aun cuando las aplicaciones terapéuticas están todavía en su fase experimental, se nombrarán algunas de ellas con el objeto de poner de manifiesto su amplia capacidad de utilización:

5.3.1 Sistema nervioso

La esclerosis en placa o esclerosis múltiple es una afección inflamatoria del sistema nervioso central frecuente en zonas templadas. En el sistema nervioso central se desarrolla un proceso inmunopatológico, con aumento de inmunoglobulinas en líquido cefaloraquídeo en el parénquima cerebral. Existen anticuerpos en sangre circulante que posiblemente posean actividad tóxica con respecto al sistema nervioso central ya sea destruyéndolo, desmielinizándolo o bloqueando procesos fisiológicos vinculados a la transmisión del flujo nervioso. Los linfocitos de la sangre parecen tener efectos citotóxicos frente a las células nerviosas.

Con el objeto de conocer más sobre las causas de esta enfermedad se ha desarrollado una afección autoinmune experimental: la Encefalitis Alérgica Experimental (EAE), producida en animales susceptibles, por inyección del tejido del sistema nervioso central o mielina en coadyuvante completo de Freund.

Aparentemente la enfermedad la producen linfocitos T citotóxicos sensibilizados frente a la mielina. Investigaciones realizadas en EAE sobre el efecto de concanavalina-A (un mitógeno policlonal de linfocitos T como ya se dijo) previos a la inyección de cordón espinal de bovino, demostraron una disminución de los síntomas posiblemente por la activación de linfocitos T supresores que deprimirían la actividad de los linfocitos T citotóxicos.

Tal vez en el futuro el uso de lectinas podría incidir positivamente sobre los mecanismos regulatorios del sistema inmune en este tipo de enfermedades de autoagresión (Nagasawa, 1977).

5.3.2 Anticoagulantes

Al igual que las proteínas fijadoras de manosa, las lectinas del tipo C son proteínas que se unen a carbohidratos en presencia de calcio y poseen un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD, del inglés Carbohydrate Recognition Domain). Estructuralmente, se ha clasificado a estas proteínas en verdaderas lectinas del tipo C (porque contienen el CRD), y en proteínas similares a las lectinas del tipo C (CTLLP, del inglés C-type lectin-like proteins); estas últimas no poseen el dominio (loop) de unión al calcio y al carbohidrato. Las CTLLP son moléculas con actividades coagulantes y anticoagulantes, que se unen a factores de la coagulación y a receptores de la membrana celular de las plaquetas de las que también son moduladoras; esta última actividad se lleva a cabo al interactuar con el factor de Von Willebrand (VWF) o con receptores específicos tales como la glicoproteína Ib (GPIb), $\alpha 2\beta 1$ o la glicoproteína VI (GPVI); por ejemplo la botrocetina y la bitiscetina, aisladas respectivamente de *Bothrops jararaca* y *Bitis arietans* forman complejos trimoleculares con VWF y GPIb para activar las plaquetas; resultados recientes indican que ellas deben interactuar con ambas proteínas para inducir la activación de tales células, contrariamente a lo que antes se pensaba, que la acción era mediada simplemente por la inducción de cambios de conformación en VWF. Por otro lado, la echiscetina aislada de *Echis carinatus* se une específicamente a la GPIb plaquetaria bloqueando la unión de la plaqueta al VWF y a la trombina, mientras que la convulxina, aislada de *Crotalus durissus terrificus*, activa las plaquetas por su

interacción con GPVI. Igualmente, la proteína EMS16 aislada de *Echis multisquamatus* es un inhibidor selectivo potente del receptor del colágeno, la integrina $\alpha 2\beta 1$, mientras que la agretina de *Callosellasma rhodostoma* activa las plaquetas al unirse a $\alpha 2\beta 1$ y a GPIb.

Por todo lo anterior, las CTLLP podrían servir para dilucidar los mecanismos involucrados en la coagulación y la activación plaquetaria, así como en la producción de nuevas moléculas útiles en el diagnóstico y tratamiento de algunos trastornos de la hemostasia, por su capacidad de interactuar con las plaquetas (Pereáñez y Vargas, 2009).

5.3.3 Inmunoglobulina E

La rinitis alérgica, así como muchas clases de asma y eczema, son enfermedades mediadas por anticuerpos IgE.

La fijación de IgE a los mastocitos (por su Fc) y a los alérgenos causa la degranulación de dichas células y la liberación de agentes vasoactivos como la histamina, provocándose así la inflamación local.

Se ha observado que tanto la PHA (*Phaseolus vulgaris*) como la concaavalina-A y la lectina de *Ricinus communis* pueden estimular también la degranulación del mastocito. Por el contrario la degranulación es inhibida por las lectinas del *Ulex europaeus* y de *Sophora japonica* (Hook, 1974).

Se ha observado también que, cambiando las circunstancias, lectinas que producen degranulación, la inhiben. Un caso interesante es que la lectina de *Viscum album* inhibe la liberación de histamina en los basófilos de pacientes con asma bronquial alérgico son pretratados con dicha lectina.

Se sabe que la IgE contiene 10.7-12.1% de carbohidratos en la porción Fc de la molécula. La lectina galactosa-específica de *Viscum album* se uniría a dichos carbohidratos de la IgE provocando una alteración estérica en la molécula que impide la formación de puentes alérgeno-IgE sobre la superficie del mastocito, paso previo a la formación de "parches" y de la endocitosis posterior por la célula, que luego se degranulará. Los mismos autores sostienen que otra explicación posible es que la lectina se una a la membrana del basófilo, causando estabilización y evitando, por esta vía, la formación de "parches" Ig-E-alérgeno (Luther, 1978).

De todos modos la demostración de propiedades anti-alérgicas de la lectina de *Viscum album* podría explicar el efecto positivo de preparaciones de dicha planta en la medicina tradicional, en casos de asma.

Más aún, hasta aquellas lectinas que como concaavalina-A desatan la liberación de histamina podrían usarse medicinalmente en enfermedades como la fibrosis quística o mucoviscidosis. Esta es una enfermedad hereditaria de los niños causada por una alteración enzimática que produce una secreción particularmente viscosa y adherente.

La causa primaria no es conocida pero tiene efectos altamente perjudiciales. El mucus no puede ser eliminado de las membranas del tracto respiratorio (fenómenos análogos se producen en el intestino en el síndrome ileo meconial y en el páncreas en la fibrosis quística del páncreas), se producen bloqueos en los tubos y sobrevienen infecciones. La infección incentiva la producción de mucus y el fenómeno se recicla. La mayoría de los pacientes mueren antes de llegar a la edad adulta.

La inhalación o ingestión de concaavalina-A podría ayudar a la expulsión de mucus, ya que el plasma exudado por sus efectos alérgicos disminuiría la viscosidad del mismo (Freed, 1982).

5.3.4 Obesidad y Diabetes

La adición de PHA a la dieta de animales jóvenes retarda su tasa de crecimiento reduciendo la absorción intestinal de glucosa en un 50% y causando un balance nitrogenado negativo (Jaffe, 1960). La ingestión de "lectinas" podría ser utilizada en casos de obesidad.

Se ha reportado también el uso de lectinas en casos de diabetes (Jenkins, 1980). En efecto, en casos de diabetes insulina dependientes moderadas (menos de 30 unidades de insulina por día) una dieta adecuada de leguminosas permitió eliminar el uso de la hormona. La adición de la lectina obtenida de *Phaseolus vulgaris* o de concanavalina-A a la dieta podría ser capaz de producir efectos semejantes.

5.3.5 Bloqueo de receptores

Las bacterias, virus y toxinas como la botulínica se unen por medio de lectinas a receptores de la superficie de las células.

Se ha explorado la posibilidad de que lectinas de la superficie bacteriana convenientemente purificadas sean usadas para bloquear los receptores de las células que pueden ser atacadas. Se ha experimentado con ratones a los que se les administró oralmente lectina del cólera purificada, y de esta manera quedaron protegidos frente a ataques posteriores del agente patógeno. En otros casos se ha usado receptor purificado que compite por la lectina bacteriana con el receptor celular.

Estas experiencias se hicieron en ratones con *Escherichia coli* en el tracto urinario (Wadstrom, 1981).

Estas investigaciones sobre lectinas y sus receptores específicos para encontrar nuevos mecanismos terapéuticos se corresponden con el concepto farmacológico de que si una droga actúa sobre receptores especializados propios de tipos específicos de células, sus efectos son más específicos. La droga ideal hipotética ejercería su efecto terapéutico en virtud de estos tipos de acción, con efectos secundarios mínimos (Goodman, 1986).

5.3.6 Tumores

Las lectinas acopladas a drogas o enzimas podrían proveer una nueva terapéutica destinada a producir un efecto localizado, concentrado y más durable sobre la célula maligna blanco (Barker, 1974).

Con este criterio se han hecho ya experiencias en otras afecciones. En efecto, en cultivos de fibroblastos provenientes de pacientes con la enfermedad de Fabry se ha usado concanavalina-A como vehículo para introducir en las células las galactosidasas cuya deficiencia provoca el trastorno (la angioqueratosis difusa de Fabry es una enfermedad ligada al cromosoma X que se caracteriza por la acumulación de trihexosilceramidas y digalactosilceramidas en distintos órganos y tejidos).

Reisner en 1983 recomienda el uso de lectinas para remover células malignas antes del trasplante de médula ósea en pacientes que sufren de neuroblastoma o leucemia. Este mismo autor ha empleado lectinas para eliminar timocitos inmaduros presentes en la médula ósea del dador y que intervienen activamente en los casos de reacción injerto contra el huésped, en dichos trasplantes.

Se ha afirmado también que la extraordinaria resistencia de las lectinas a la acción de enzimas proteolíticas las convertirían en un elemento terapéutico de elección para el tratamiento de tumores del tracto gastrointestinal.

La lectina de *Ricinus communis* y del germen de trigo han demostrado su capacidad de inhibir el desarrollo de las células tumorales in vivo o in vitro (Lis, 1973).

Sachs (1986) ha estudiado el crecimiento, diferenciación y remisión de células tumorales, investigando la acción de factores de crecimiento y de diferenciación en procesos normales y patológicos, utilizando como modelo a células sanguíneas normales y leucémicas.

El autor ha llegado a la conclusión que las células cancerosas pueden conservar las bases genéticas que permitan su diferenciación y que adecuadamente estimuladas lleguen a completar la sucesión normal de crecimiento.

En su trabajo ha establecido que en un grupo de células malignas estudiadas podría inducirse la diferenciación por otros medios distintos del factor de diferenciación normal. Entre estos medios incluye a las lectinas (Sachs, 1986).

Se encuentra también en fase experimental el uso de lectinas (PHA) para estimular el desarrollo in vitro de linfocitos T citotóxicos frente a tumores, que luego son reinyectados en pacientes en los cuales ha fracasado toda otra terapia (Mazumder, 1984).

Previamente a estas experiencias en humanos, se hicieron otras con éxito en ratones y en humanos con melanoma cutáneo metastásico, inyectando los linfocitos activados directamente en los nódulos tumorales (Cheema, 1972).

Por último, la disminución de la fibronectina, lectina a la que ya mencionamos, en la membrana de las células tumorales metastásicas y la elevación de la misma en el plasma de portadores tumorales serían pautas útiles para agregar en el seguimiento del enfermo bajo tratamiento, por lo que su estudio podría aportar nuevos agentes en la terapia del cáncer (Hynes, 1986).

5.3.7 Fertilidad

El proceso de fecundación puede definirse como una secuencia de acontecimientos moleculares coordinados que consiste en la penetración y fusión de un espermatozoide con un ovocito, y finaliza con la primera división normal del cigoto. Aunque hace ya mucho tiempo que se describió al espermatozoide como el agente fecundante, los conocimientos acerca de los receptores que intervienen en el reconocimiento especie-específico entre ambos gametos aún no se conocen con claridad. Las lectinas son unas moléculas que gracias a su exquisita selectividad para unirse a determinadas secuencias oligosacáridicas pueden ser de gran utilidad para darnos una mayor información acerca de los receptores espermáticos que intervienen en la fecundación. Los estudios que se han hecho hasta ahora con lectinas, tanto en animales como en humanos, han permitido observar que hay una reestructuración de glucoproteínas desde la espermatogénesis hasta el momento de la fecundación, así como también, han permitido identificar determinadas secuencias oligosacáridicas que juegan un papel importante en dicho proceso. Del mismo modo se han utilizado para evaluar el estado del acrosoma y estudiar el estado funcional de la población espermática.

El uso de las lectinas en futuros estudios puede facilitar una mayor comprensión acerca de la fisiología de la interacción entre espermatozoide y ovocito, y a su vez, permitir elaborar nuevos ensayos diagnósticos y aportar nuevas soluciones en el tratamiento de la infertilidad masculina (Montoya *et al.*, 2008).

Mortimer *et al.* (1990) utilizaron la lectina PNA (conjugada con un fluorocromo) combinada con un test de vitalidad (Hoechst 33258) para estudiar el estado acrosomal conjuntamente con la viabilidad de espermatozoides humanos. Los distintos patrones de marcaje de la lectina PNA mostraban el estado de la membrana acrosomal y el test de vitalidad indicaba si se trataba de una RA prematura (espermatozoide vivo) o si bien se podía deber a un deterioro en la estructura de las membranas (espermatozoide muerto).

5.4 Lectinas en Basidiomicetos

Los basidiomicetos tienen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antitumorales e inmunomoduladoras, por lo que pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades y en beneficio de la salud de los seres humanos (Ganeshpurkar, 2010).

Varias de estas propiedades, principalmente las antitumorales, se deben gracias a la presencia de lectinas en los organismos.

Las investigaciones realizadas a lo largo de muchos años con un número considerable de especies de hongos fitopatógenos han demostrado que estas son efectivas sólo contra patógenos específicos. El conocimiento de esta especificidad condujo a la idea de que el reconocimiento molecular entre el hongo y el hospedante es el evento esencial que precede al proceso antagonista (Chet y Benhamou, 1998).

El reconocimiento se realiza a través de interacciones lectinas-carbohidratos. Las lectinas al ser proteínas enlazadas de azúcares o glicoproteínas, aglutinan células y están involucradas en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular. En todos los casos estudiados de cepas de hongos parasitarios se encontraron evidencias directas, de que las lectinas están involucradas en el micoparasitismo (Pérez, 2004).

Las lectinas fúngicas se han aislado de micelio, conidios, basidiomas y cuerpos fructíferos mientras que las lectinas del hongo patógeno *Macrophomina phaseolina* es extracelular en la naturaleza. En caso de pocas cepas de *Rhizoctonia solani*, la cantidad de lectina en los esclerocios fue mayor que en el micelio (Khan y Khan, 2011).

Las lectinas se han encontrado y purificado a partir de cuerpos fructíferos, pero muy pocas han sido identificadas en el micelio vegetativo. Suguru *et al.* en 1996 encontraron que *Pleurotus cornucopiae* KC-1 ha sintetizado dos lectinas, PCL-F y PCL-M, en etapas específicas de desarrollo: PCL-F se sintetizó en el cuerpo fructífero, mientras que la PCL-M fue sintetizada sólo en los micelios en etapa adulta. Las dos lectinas fueron diferentes desde el punto de vista bioquímico e inmunológico.

Se ha informado de que algunas especies de basidiomicetos, incluyendo *Agaricus sp.*, *Polyporus sp.*, *Agrocybe sp.* producen lectinas que son útiles para estudiar polisacáridos y glicoproteínas, así como modificaciones enzimáticas y membranas celulares.

La aglutinina de *Agaricus bisporus* (ABA) reacciona con monosacáridos y posee un potente efecto contra el cáncer de colon en células malignas epiteliales (Wu *et al.*, 2003).

Una lectina, AAL, aislado del hongo comestible *Agrocybe aegerita*, mostró un fuerte crecimiento en la inhibición de líneas celulares tumorales humanas (Zhao *et al.*, 2003).

Otra lectina aislada del hongo *Polyporus adusta* mostró actividad antiproliferativa contra líneas de células tumorales y la actividad mitogénica de los esplenocitos. Una amplia gama de otros carbohidratos inhibieron la actividad de esta lectina hemoaglutinante. NaOH o HCl y alta temperatura también afectó su actividad. Sin embargo, cloruros metálicos divalentes probados a 1.25 a 10 μ M, tales como CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, AlCl₃ MnCl₂ favoreció su actividad y FeCl₃ en 10 μ M aumentó la actividad de esta lectina por 100% (Wang *et al.*, 2003).

Muchas lectinas abundantes en la dieta resisten el calor y la digestión, se mantienen en forma activa en el colon y heces y tienen efectos sobre la función de las células gastrointestinales.

La aglutinina de *Agaricus bisporus* (ABA) aislada del hongo comestible tiene un potente efecto anti proliferativo sobre células malignas de colon con un potencial terapéutico considerable como un agente anti-neoplásico. Dado que los estudios anteriores sobre el requisito estructural para unión se limitan a niveles moleculares o de submolecular de Galb1-3GalNAc (donde Gal representa a D-galactopiranososa y GalNAc representa 2-acetamido-2-desoxi-D-galactopiranososa) y sus derivados, las propiedades de unión de ABA se investigaron más con glicanos por enzyme-linked lectinosorbent Assay (ELLSA), una modificación del ELISA convencional, donde el equivalente al anticuerpo primario resulta ser la Lectina en estudio, y con el ensayo de inhibición lectina-glicano (Albert *et al.*, 2003).

Zhao *et al.* en 2003 investigaron una lectina antitumoral (llamada AAL), que consiste de dos subunidades idénticas de 15.8 kDa, se aisló de los cuerpos fructíferos de el hongo comestible *Agrocybe aegerita* usando un procedimiento que involucra precipitar el extracto mediante la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharose Fast Flow, cromatografía de gel de filtración en Sephacryl S-200 HR y finalmente purificación en una columna de HPLC GF-250. El análisis de aminoácidos del extremo N-terminal y un fragmento interno indicaron que las secuencias de aminoácidos de los dos fragmentos fueron QGVNIYNI y Q (K) - PDGPWLVEK (Q) R respectivamente.

AAL mostró efectos de inhibición fuertes en 7 tipos de líneas de células tumorales. En todas las líneas celulares excepto SGC-7901, la relación de la inhibición de la AAL mostró la dependencia de la concentración. AAL no mostró citotoxicidad significativa con células HeLa, MGC80-3 o células BCG-823. A una concentración de 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, las relaciones de inhibición de AAL para células SGC-7901, SW480, MGC80-3, BCG-823 y HeLa S-180 fueron casi las mismas que, o un poco mayor que, las de adriamicina (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$), pero la relación de inhibición de AAL en células HL-60 fue menor que la de adriamicina (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$).

Para probar la apoptosis de las células del tumor inducida por la AAL, se realizó un ensayo de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) que es un procedimiento de inmunotinción altamente sensible diseñado para detectar de 3'-OH ADN de una sola hebra ruptura de ADN producida por la fragmentación del ADN, típicamente localizado en las células que experimentan muerte celular programada. La prueba de TUNEL se utilizó en los cortes de los tejidos tumorales extirpados de ratones BALB / c. En el grupo control, la estructura de las células estaba intacto y el núcleo fue completamente teñido de azul. Sin embargo, en el grupo tratado con AAL, una subpoblación de células apoptóticas, dispersas a lo largo de la sección de tejido, estaban intensamente teñidas (marrón) por el tratamiento de TUNEL y por su posterior inmunotinción con peroxidasa. Hoechst 33258 es un colorante de membrana permeable al que se une específicamente a la cromatina y aparece de color verde cuando es inspeccionado bajo luz UV. Esto permite la detección de condensación de la cromatina, que es típico de la apoptosis celular, pero no para la necrosis de las células. La cromatina de las células control se teñió a lo largo de todo el núcleo en un color verde pálido, mientras que la cromatina condensada de las células HeLa apoptóticas apareció como intensas manchas verdes en el núcleo.

5.5 Técnicas de purificación

Actualmente las lectinas pueden purificarse con una pureza verificable por métodos fisicoquímicos e inmunoquímicos. En 1936 Summer y Howell cristalizaron la lectina concanavalina A, pero no pudieron eliminar completamente los carbohidratos contaminantes.

El aislamiento de una lectina comienza con una extracción con solución salina (o buffer) del material de la cual se obtiene.

A veces se emplea una extracción previa con un solvente orgánico (metanol o éter etílico) para remover los lípidos.

El fraccionamiento con sulfato de amonio, posterior centrifugación y redisolución del precipitado brinda un líquido que contiene lectinas.

En la actualidad los esquemas de purificación de lectinas emplean la cromatografía de afinidad que aprovecha la capacidad de unirse a azúcares (más o menos específicamente) de la lectina.

Básicamente un carbohidrato (con el cual la lectina actúa) es insolubilizado uniéndolo a Sephadex, Sepharosa, etc.

Luego se pone en contacto con el extracto a purificar. La lectina se fijará y podrá ser posteriormente eluida. Esta elución se puede hacer con un azúcar que compite por la lectina con el carbohidrato insolubilizado o alterando las condiciones en las cuales la lectina se halla fijada (disminuyendo el pH, incrementando la fuerza iónica o mediante desnaturizantes) (Micucci y Camps, 1987).

Los métodos más comunes para purificar lectinas son:

- Cromatografía de afinidad
- Cromatografía de filtración
- Cromatografía de intercambio iónico DEAE
- Cromatografía de líquidos
- Electroforesis

5.5.1 Técnicas de Nanne y Aragón (1991) en *Erythrina costaricensis*.

5.5.1.1 Aislamiento de lectinas

Se utilizaron Sephadex G-100, DEAE-Sephadex G-50, marcadores de punto isoeléctrico y marcadores de peso molecular así como cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de manganeso, EDTA disódico, duodecil sulfato de sodio, glicina, azul de bromofenol, ácido barbitúrico, orcinol, ciclohexanona, galactosa, manosa, azul de dextran y anfolitos (Ampholine). Todos los reactivos utilizados fueron calidad USP (Convención de la Farmacopea de Estados Unidos).

Se recolectaron semillas maduras de *E. costaricensis* y se preparó con ellas un extracto crudo. 80 g de semillas secas se dejaron en agua destilada por 24 horas a 5 °C y se licuaron en 500 mL de solución salina de cloruro de sodio al 0.9 por ciento. El homogenizado se filtró y se centrifugó a 10,000 rpm durante 4 horas hasta tomar un aspecto transparente. Para precipitar las proteínas del filtrado se mezcló éste con cuatro volúmenes de acetona. El precipitado se recogió después de centrifugar 10 minutos a 10,000 rpm y luego se dejó a temperatura ambiente 12 horas con el fin de eliminar la acetona.

Se disolvió el precipitado libre de acetona en tres volúmenes de solución salina de NaCl al 0.9 por ciento y se centrifugó 30 minutos a 10,000 rpm. Se liofilizó el sobrenadante y se colocó éste a -20 °C para su uso posterior.

5.5.1.2 Purificación de lectinas

La lectina se purificó de acuerdo al siguiente procedimiento: se disolvieron 100 mg del extracto crudo liofilizado en 7 mL de solución buffer (0.10 M TRIS + 0.1 M NaCl, pH 7.40) se centrifugó a 10,000 rpm y el sobrenadante se aplicó a una columna (2.50 x 100 cm) empacada con Sephadex 0-100, equilibrada con la misma solución. Se aplicó un flujo de 25 mL por hora y se recogieron fracciones de 2.50 mL. A cada fracción se le determinó la densidad óptica a 280 nm y se le midió la actividad hemoaglutinante.

Aquellas fracciones que mostraron actividad hemoaglutinante se concentraron y se equilibraron con una solución de 0.01 M TRIS + 0.05 M CaCl₂, pH 7.30 por ultrafiltración, utilizando una membrana AMI CON U2. La solución proteica concentrada se aplicó a una columna (2.70 x 36 cm), empacada con DEAE Sephadex A-50, previamente equilibrada con la solución inicial. El material con actividad hemoaglutinante, no adherido a la matriz, fue eluido con la solución buffer inicial. Cuando la densidad óptica a 280 nm fue menor de 0.06 unidades, se aplicó un gradiente lineal hacia una solución de 0.50 M NaCl en 0.01 M TRIS + 0.05 M CaCl₂, pH 7.30 eluyendo la proteína contaminante en un solo pico.

La electroforesis en gel de acrilamida se efectuó en una solución buffer de 0.025 M TRIS + 0.192 M glicina, pH 7.30 por 90 minutos en un aparato CANALCO (Laemmli, 1970). La electroforesis en gel de acrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio se efectuó en una solución buffer de 0.025 M TRIS, 0.192 M glicina y 0.10 por ciento de SDS, pH 8.30 por 258 minutos (Laemmli 1970). La determinación del punto isoeléctrico por electroenfoque preparativo se efectuó a 5°C en una columna LKB de 440 mL con una concentración final de 1 % de los anfolitos acarreadores con un ámbito de pH de 4 a 6. El electroenfoque analítico se realizó en un gel de agarosa IEF con un gradiente de pH con anfolitos en dos ámbitos de pH (3.5- 10) y (4-6) durante 95 minutos (El contenido de hexosas unidas a la proteína se determinó de acuerdo al método de Winzler (1961) y el de ácido siálico por el de Warren (1959). La determinación del peso molecular por filtración por gel se realizó según Whitaker (1963).

Se utilizaron eritrocitos de conejo, caballo, cabra, rata y pollo así como eritrocitos humanos. La titulación de la aglutinación utilizando eritrocitos humanos y de origen animal se efectuó según el método de Cumsky y Zusman (1979), en un equipo de microtitulación de Cooke Laboratory Products. Se estudió el efecto de los iones divalentes sobre la aglutinación (CaCl₂, MnCl₂, MgCl₂, a la concentración de 0.1 M), así como el efecto del EDTA (0.1 M). La titulación de la inhibición de la aglutinación se realizó con 50 µL de solución de lectina (5 µg/VL), haciendo diluciones seriadas al doble con 50 µL (0.1 M) de carbohidrato. Después de una hora se agregó con agitación 25 µL de eritrocitos humanos al 6 por ciento. Al cabo de una hora se realizaron las correspondientes lecturas de aglutinación.

El efecto del pH y la temperatura sobre la actividad hemaglutinante de la lectina se determinó por el método de Broekaert *et al.* (1984). Se midió la presión arterial carótida de ratas Sprague-Dowley, inoculadas con 3.30 mg/kg de lectina, en un polígrafo fisiológico HewlettPackard, modelo 7754 A, equipado con un amplificador de presión modelo 8805 C.

5.5.2 Técnicas de Palomina *et al.* (2012) en veneno de *Lachesis muta*.

5.5.2.1 Purificación de la lectina

50 mg de veneno de *L. muta* fueron disueltos en buffer acetato de amonio 0.1 M pH 5.0 y luego de separar los restos insolubles por centrifugación, la muestra fue aplicada a una columna de intercambio aniónico DEAE-Sephadex A-50 (38 x 1.1 cm) previamente equilibrada con el mismo buffer. Se colectó fracciones de 1 mL con un flujo de 10 mL/hora. La elución de la proteína retenida en la columna se realizó adicionando NaCl 0.3 M. Se determinó el contenido proteico y la actividad hemoaglutinante de todas las fracciones colectadas.

5.5.2.2 Evaluación de la pureza y determinación del peso molecular

La lectina purificada fue evaluada por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (PAGE-SDS) en ausencia y presencia de 2-mercaptoetanol (ME), de acuerdo al método de Laemmli (1970). El peso molecular se determinó usando como marcadores: albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y lisozima (14,3 kDa).

5.5.3 Técnicas de Salgado y Valadez (2006) en semillas de amaranto.

5.5.3.1 Purificación de lectinas

La purificación de la lectina se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad utilizando una matriz de estroma de eritrocitos humanos. La lectina purificada se caracterizó mediante su actividad hemaglutinante utilizando eritrocitos humanos y de animales, estudios de inhibición de la aglutinación, determinación de peso molecular mediante electroforesis nativa y desnaturizante, contenido de carbohidratos totales, determinación de metales, efecto de iones metálicos sobre la hemoaglutinación, estabilidad al pH y termoestabilidad.

5.5.4 Técnicas de Blasco (2004) en *Caesalpinia spinosa*.

5.5.4.1 Marcaje de lectinas vegetales con Biotina

Se disolvió la lectina a una concentración de 1 mg/mL en 0.1 M NaHCO₃ o dializar el extracto crudo o la solución de lectinas en 0.1 M NaHCO₃ toda la noche.

Se sacó la NHS-biotina del congelador y se descongeló por aprox. 30 minutos

Se disolvió NHS-biotina en dimetilformamida o dimetilsulfoxido a la concentración de 1 mg/mL

Tan rápidamente como fue posible después de disolver la NHS-biotina se agregó la solución a la solución de lectina en una proporsión aproximada de 120 ul de solución de biotina: 1 mL de solución de lectina, se mezcló bien e inmediatamente. Reaccionó a temperatura ambiente, preferentemente con una agitación constante por ejemplo con un agitador por dos horas o toda la noche.

Se dializó toda la noche en buffer de lectina, y se almacenó a 4 °C.

NHS-biotina (sigma): alícuotas de 5 mg. Por cada ensayo de biotinización, una alícuota se descongeló una alícuota de 5 mg y se disolvieron en 5 mL de dimetilformamida. Toda la biotina que no se utilice es descarta al final del procedimiento.

5.5.4.2 Extracción salina

De acuerdo al método de Villarrubia *et al.* (1995), 100 g de material fue triturado en un molino de maíz hasta la obtención de un material pulverizado, de los cuales 70 g de harina fueron disueltos

en 210 ml (proporción 1:3 v/v) de una solución de NaCl 10% dentro de un vaso de 500 ml. La mezcla resultante fue mantenida en agitación por 1 hora a temperatura ambiente, para obtener la solubilización de las proteínas. Posteriormente la suspensión obtenida fue filtrada en gasa, a fin de retirar las partículas grandes y materiales insolubles, y centrifugada a 3.000 x g por 20 minutos a 4 °C. El precipitado se descartó y el sobrenadante obtenido (120 mL) fue dializado en 1 litro de tampón bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) 0,1 M, pH 8,0, por 6 horas (realizándose cambios cada 2 horas) con la ayuda de un agitador magnético. La eliminación de sal fue comprobada añadiendo gotas de nitrato de plata (AgNO_3) 0.01 N (de haber presencia de NaCl, la solución adquiriría una coloración lechosa). Dos alícuotas de 0.1 mL fueron tomadas para la determinación de proteínas por el método de Biuret y la prueba de hemaglutinación con eritrocitos humanos. El dializado fue conservado a 4 °C.

5.5.4.3 Cromatografía de exclusión molecular

Para la purificación de la muestra anterior se colocaron 25 mL en una columna de exclusión molecular empacada con Sephadex G-100 (1.6 x 100 cm). Luego, 126 ml de la muestra anterior fueron pasados por una columna de Sephadex G-75 (1,9 x 102 cm) según Toyama *et al.* en 2001.

5.5.5 Técnicas de Torres (2010) en *Phaseolus folius*.

5.5.5.1 Purificación

La harina se obtuvo mediante la trituration de las semillas de frijol Tépari en un molino Tekmar modelo A-10 Analytical mill. La harina obtenida de esta molienda se desgrasó con una mezcla de cloroformo-metanol 2:1 en una proporción 4:1 p/v con agitación por 15 min y después se filtro con vacío, este proceso se repitió 2 veces más. Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente en una campana de extracción. Con la finalidad de optimizar la obtención de la FCL se pesaron 100 g de harina y se probaron los siguientes sistemas de solventes: 500 mL de H₂O, 500 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8 (Tris-HCl), 500 mL de NaCl 0.15 M (NaCl) o 500 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS). La mezcla se dejó en agitación durante 12 h a 4° C o a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó en una centrifuga Bekman JU2 con rotor JA-20 a 39,200 g, durante 60 min para obtener el extracto crudo y se determinó la actividad aglutinate de cada uno.

Después de haber determinado el mejor solvente para la extracción, se recuperó el sobrenadante y se realizó una precipitación secuencial con sulfato de amonio, iniciando con 40% de saturación y terminando con 80% de saturación y se determinó el intervalo de saturación adecuado. En el procedimiento definitivo se realizó una precipitación al 40% de saturación con sulfato de amonio, con agitación lenta por 30 min y se dejó equilibrar por 30 min a 4° C, posteriormente se centrifugó a 39,200 g durante 45 min. El sobrenadante se llevó a 60% de saturación con sulfato de amonio con agitación lenta por 30 min y se dejó equilibrar por 30 min a 4° C. Posteriormente se centrifugó a 39,200 g durante 45 min, se recuperó el precipitado (P60) y se desecho el sobrenadante. La fracción P60 se resuspendió en un volumen mínimo de agua desionizada, para ser dializada en membranas de 3 kDa de tamaño de poro hasta la eliminación total de sales. Para eliminar partículas suspendidas se centrifugó y se prepararon alícuotas de 4 mL que se cargaron en una columna de 167 x 1.7 cm para filtración en gel con Sephadex G-75 (Pharmacia Biotech; Uppsala, Suiza), dicha columna se equilibró con buffer de bicarbonato de amonio 0.01 M (pH 7.8). El experimento se realizó a 4° C y las fracciones fueron recolectadas a una velocidad de 0.3 mL/min,

con la misma solución amortiguadora. El volumen colectado en cada fracción fue de 4 mL y a cada fracción se le midió absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-65. Las fracciones que indicaron presencia de proteínas se sometieron a un análisis de actividad aglutinante para colectar sólo las fracciones con actividad de lectina.

5.5.6 Técnicas de Ganem y Martín (2000) en *Canavalia ensiformis*.

5.5.6.1 Obtención

La Con A se obtiene con el empleo de una modificación del método de Agrawal y Goldstein, según el procedimiento siguiente: 50 g de frijol de *Canavalia ensiformis* se depositan en un beaker que contiene solución salina 0,15 mol de cloruro de sodio a 4° C, durante 4 h, transcurrido este, los granos y el líquido se homogenizan en frío. Se adiciona solución salina hasta completar la relación 1/5 peso/ volumen.

Se agita suavemente durante 24 h a 4° C. Se ajusta el pH a 4,7 y se centrifuga la masa a 3 000 rpm por 30 min a 4° C, el sobrenadante se conserva en frío, se repite el proceso de extracción. Los extractos se unen (se les determina su actividad aglutinadora) y se le añade sulfato de amonio hasta alcanzar 18 % de saturación, el pH se ajusta a 7,0. Se mantiene en reposo la solución a 4 °C por 24 h y el precipitado formado se elimina por centrifugación, al sobrenadante se le añade más sulfato de amonio hasta 60 % de saturación, se ajusta el pH a 7,0, se deja reposar en frío por 24 h, el precipitado se separa por centrifugación y se disuelve en 100-150 mL de agua, se dializa exhaustivamente contra agua y solución salina 1 mol de Na Cl sucesivamente. El precipitado formado se elimina y el sobrenadante se clarifica por filtración (0.45 µ). Se determina la concentración proteica y actividad aglutinadora del extracto.

5.5.6.2 Purificación

La purificación se realiza mediante una cromatografía de afinidad en una matriz de Sephadex G—50 fino empacada en una columna XK-50/15. La muestra se pasa por la columna con un flujo de 0.5 mL/min. La columna se lava con solución salina 1 mol de cloruro de sodio durante 48 h. La Con A retenida en la columna se desplaza mediante el paso de una solución 0,1 mol de D + glucosa en medio salino a bajo flujo. Todo el proceso se realiza en un sistema automático FPLC con monitoreo de los eluatos a 280 nm. Los eluatos con glucosa se unen y se dializan exhaustivamente con solución salina 1,0 mol de Na Cl . La solución se concentra hasta niveles cercanos a 5 mg/mL.

Se añaden concentraciones adecuadas de iones calcio y manganeso.

Se preparan soluciones proteicas entre 0,3 y 0,6 mg / mL para las corridas electroforéticas. En todos los casos se aplican 0,3 µL de patrones y de muestras sobre los Phastgeles gradientes 8-25 %.

Se utiliza un equipo Phast-System. Como reveladores se emplean los reactivos de Coomassie y solución de nitrato de plata.

5.5.7 Técnicas de Zhao (2003) en *Agrocybe aegerita*.

5.5.7.1 Cromatografía

Los cuerpos fructíferos secos fueron triturados en un polvo y 15 g de este polvo se extrajeron dos muestras con 150 ml de agua destilada a 4 °C durante 10 h. El extracto se combinó y se centrifugó a 10 000 g durante 20 min. Sulfato de amonio sólido se añadió al sobrenadante a una saturación del 40% y se centrifugó de nuevo. Se añadió Sulfato de amonio sólido al sobrenadante a 80% de saturación, y el 40-80% del precipitado se recogió por centrifugación, se disolvió en un pequeño volumen de agua destilada y se dializó extensamente contra 10 mM de buffer de fosfato (pH 6.0). El dializado se cargó en una columna de flujo rápido de DEAE-Sepharose (1.6 cm x 10 cm), y la columna se eluyó con una concentración de crecimiento lineal de NaCl de 0–0.3 mol/L en el buffer de partida.

El líquido eluido principal se purificó adicionalmente mediante gel de filtración en una columna HR Sephacryl S-200 (1.6 cm x 80 cm) seguido de elución con buffer de fosfato 0,025 M (pH 7,1).

El componente resultante se purificó finalmente por HPLC en una columna GF-250, que se eluyó con 150 mmol / L de NaCl en 20 mmol / L Tris / HCl (pH 8.0).

5.5.7.2 Estimación de la masa molecular e isoelectroenfoco

La masa molecular del aislado se determinó tanto por SDS /PAGE y filtración en gel en una columna Superdex 75 HR. El punto isoelectrico se determinó en un gel de poliacrilamida al 5% (w / v) que contiene 2% de (w / v) anfolina, seleccionado para establecer un gradiente de pH 3.5 a 9.5.

5.5.7.3 Análisis de composición de aminoácidos y análisis de la secuencia de aminoácidos

El análisis de aminoácidos se realizó con un analizador Hitachi modelo 835. Las muestras (50 µg) se hidrolizaron en HCl 6 M en tubos evacuados sellados durante 24 horas a 110 °C. Los residuos de aminoácidos N-terminales se analizaron utilizando un secuenciador de proteínas Applied Biosystems 470A automático. Con el fin de obtener más información acerca de la secuencia de aminoácidos, el aislado se digirió con tripsina y se separó por HPLC; un fragmento grande (1324 Da) se secuenció mediante espectrografía de masas.

5.5.8 Técnicas de Khan y Khan (2011) en *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus fumigatus*.

5.5.8.1 Purificación

Puesto que, la mayoría de las lectinas fúngicas son intracelulares, la mayoría de los procedimientos de purificación, implica la lisis de las células por un método físico, seguido de técnicas de purificación de proteínas convencionales, tales como cromatografía utilizando diversas resinas.

Intercambiadores de iones como DEAE-CM-celulosa y QAE-Toyopearl, resinas fácilmente disponibles, se han utilizado para la purificación de algunas lectinas fúngicas. La filtración en gel se ha utilizado como uno de los pasos de purificación para lectinas de *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus fumigatus*.

Además, una matriz hidrófoba como Fenil-Sefarosa se ha empleado para la purificación de las lectinas de *Aspergillus fumigatus*, *Beauveria bassiana* y *Fusarium solani*.

La cromatografía de afinidad, como técnica más específica para la purificación de lectinas, se ha utilizado ampliamente para la purificación de las lectinas fúngicas. Varias resinas de afinidad se han generado y usado de acuerdo con la especificidad de la lectina tal como fetuina-Sefarosa, BSM-Toyopearl, PSM-Sefarosa, lactosil-Sefarosa y gal-Sefarosa.

En algunos casos, Sefadex y Sefarosa o ácidos de Sefarosa tratados se han utilizado para purificar lectinas enlazadoras de glucopiranosil / manopiranosilo y galactopiranosido respectivamente, donde sirven como matriz de afinidad y no como tamices moleculares. Sefarosa fue utilizada para el aislamiento de una lectina de *Ischnoderma resinoseum*, específica para el metil- β -galactósido.

La lectina intracelular, calnexina, a partir de *Aspergillus oryzae* se purificó a partir de la conjugación sintética glicano N-ligado a Sefarosa globulos.

En algunos casos, la capacidad de las lectinas de aglutinar eritrocitos se ha utilizado para su purificación, mediante la incorporación de eritrocitos o estromas de eritrocitos en poliacrilamida.

Técnicas de purificación modernas como HPLC y FPLC también se han empleado para la purificación de las lectinas de *Hygrophorus hypothejus*, *Ganoderma capense*, *Peziza sylvestris* y *Pholiota adiposa*.

La lectina recombinante de *Agrocybe aegerita* se expresa en el sistema de expresión basado en *Escherichia coli* con la adición de la etiqueta de histidina y se purificó usando cromatografía en columna de Ni.

5.5.8.2 Masa molecular y la estructura de la subunidad

Las masas moleculares de las lectinas fúngicas van 19 a 90 kDa, pero la mayoría de ellos son entre 23-36 kDa. En general, la mayoría de ellos son proteínas dimericas y subunidades unidas por interacciones no covalentes, con pocas excepciones, como *Phallus impudicus* y *Lactarius lignyotus*, donde las subunidades están unidas entre sí por enlaces disulfuro. La lectina L1 de *Lentinus edodes* es monomérica teniendo masa molecular de 45 kDa. Una lectina, CML de *Cordyceps militaris* también es monomérica con una masa molecular de 31 kDa.

Las lectinas de *Pleurocybella porrigens* y *Agaricus blazei* son homotetraméricas, mientras que, las lectinas de *Lactarius rufus* y *Rhizopus stolonifer* son hexaméricas.

La lectina de *Hericum erinaceum* es un heterotetrámero con masa molecular de 54 kDa y tiene dos subunidades diferentes con una masa molecular de 15 y 16 kDa y de manera interesante, una lectina a partir de *Kluyveromyces bulgaricus* forma un octámero en una concentración elevada.

5.5.9 Técnicas de Zhang *et al.* (2009) en *Pholiota adiposa*.

5.5.9.1 Aislamiento y purificación de la lectina

Se homogeneizaron cuerpos fructíferos secos del hongo *P. adiposa* (100 g) en 0.15 M NaCl (10 ml / g) a 4 ° C y se extrajo durante la noche a 4 ° C. A continuación, el homogenizado se centrifugó a 8000xg durante 15 min. Se añadió al sobrenadante (NH₄)₂SO₄ a 80% de saturación.

La mezcla se dejó a 4 ° C durante 4 h antes de centrifugar a 8 000xg durante 15 min. El precipitado se volvió a disolver y se dializó para eliminar (NH₄)₂SO₄ antes de aplicar a una columna de DEAE-celulosa (Sigma) (2.5 x 20 cm) en un buffer de 10 mM de NH₄HCO₃ (pH 9,4). Después de la eliminación del pico no adsorbido (D1), tres picos adsorbidos, D2, D3 y D4, se eluyeron por etapas con 50 mM de NaCl, 150 mM de NaCl y 1 M de NaCl en el buffer, respectivamente. La fracción de D3 se pasó después a través de una columna de CM-celulosa (Sigma) (1.5 x 10 cm) que se había equilibrado y después se eluyó con 10 mM NH₄OAc (pH 4.6). El material no unido (fracciones C1) se eluyó con el buffer de partida, mientras que las proteínas unidas (fracciones C2, C3) se

desorben secuencialmente con 50 mM de NaCl y 1 M de NaCl en el buffer de partida. El pico activo (C2) se purificó posteriormente por la cromatografía líquida de vía rápida de proteínas (FPLC) en una filtración en una columna de gel Superdex 75 HR 10/30 (GE Healthcare) en 0.15 M de buffer de NH_4HCO_3 (pH 8.5). El segundo pico (SU2) obtenido constituía una lectina purificada.

5.5.9.2 Determinación de la masa molecular y secuencia N-terminal

La lectina purificada se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida/ sulfato dodecil de sodio (SDS / PAGE) para la determinación de la masa molecular.

Se llevó a cabo una filtración en gel en columna FPLC Superdex 75, calibrada con los marcadores de masa molecular (GE Healthcare), para determinar la masa molecular nativa de la lectina. La secuencia N-terminal de la lectina se determinó mediante el uso de una unidad de degradación Hewlett-Packard HP G1000A Edman y un sistema HPLC HP 1000.

5.5.10 Técnicas de Chattopadhyay *et al.* (1999) en *Pleurotus ostreatus*.

5.5.10.1 Purificación

Se purificaron lectinas de *P. ostreatus* a partir de cuerpos fructíferos como se describe en detalle en el método de Conrad y Rue en 1994. En seguida los cuerpos fructíferos se cortaron y homogenizaron con una cantidad triple de ± 0.05 M de Tris HCl pH 8 que contiene 1 mM de CaCl_2 , 1 mM de MgCl_2 y 0.02% (w / w) de NaN_3 . El material insoluble se eliminó por centrifugación (14000 g, 25 min). La lectina se aisló a partir del sobrenadante en un solo paso por adsorción a una columna de mucina gástrica de cerdo desialilada en Sefarosa 4B y desorción con lactosa.

Se recogieron las fracciones de lectina y se dializaron exhaustivamente frente a agua desmineralizada.

A partir de 100 g de cuerpos fructíferos, se produjo 20 mg de lectina. En SDS \pm PAGE bajo condiciones de desnaturalización, la lectina se divide en dos bandas de $M_r = 44$ y 41 kDa. En calefacción, sólo una banda de M_r aproximado de 80 kDa está presente. En HPLC de gel de filtración de la lectina nativa, se obtiene un M_r de 87 kDa. En isoelectroenfoque, una banda ancha aparece a un pH de 9.5. Por lo tanto, parece razonable suponer que la lectina es un pseudo-dímero compuesto por dos subunidades estructuralmente similares con puntos isoeléctricos idénticos, que se mantienen unidos por fuerzas covalentes.

La lectina se cristalizó en una serie de ensayos utilizando el procedimiento de detección Terasaki. Se crearon un total de 98 muestras de cristalización diferentes con el fin de establecer las condiciones óptimas para el crecimiento de cristales.

Los cristales se obtuvieron a partir de una gota colgante 5 μl que contiene 10 mg ml^{-1} de proteína y 500 μl de una muestra que contenía 2.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitante, 0.1 M de buffer de sodio citrato de pH 5.6 en presencia de 0.2 M de tartrato de potasio / sodio. Los cristales aparecieron dentro de las dos o tres semanas y crecieron hasta dimensiones de hasta 0.5 mm, teniendo un desarrollo típico hexagonal con la morfología bipiramidal hexagonal y un fuerte desarrollo polar axial de seis endoblamientos, típico de cristales de proteínas. Los datos de difracción de rayos X de los cristales montados en un capilar de cuarzo se recogieron a 293 K usando una fuente de ánodo giratorio que funciona a 40 kV, 100 mA con radiación $\text{Cu K}\alpha$ y un detector de placa de imagen.

Los datos fueron recolectados a una resolución de 4.0 Å utilizando el método de rotación con 3 $^\circ$ oscilaciones sobre un rango de 90 $^\circ$. Se realizó la determinación de los parámetros de las unidades

de celda y grupo espacial e integración de intensidades de reflexión con DENZO (rayos X) y los datos fueron anivelados con SCALEPACK (Otwinowski, 1993).

5.5.11 Técnicas de Hexiang *et al.* (2000) en *Pleurotus ostreatus*.

5.5.11.1 Purificación

Se homogeneizaron cuerpos fructíferos frescos de *Pleurotus ostreatus* (750 g) en 2 L de 0.15 mol /L de NaCl y después se extrajo durante la noche a 4 ° C en la misma solución. Después, la mezcla se centrifugó a 10.000 g durante 20 min. Se añadió sulfato amónico al sobrenadante a una saturación 30-80%. Después de reposar durante la noche a 4 ° C, el precipitado recuperado en la centrifugación a 16.900 g durante 10 min. El precipitado se disolvió y se dializó extensamente contra 10 mmol / L de buffer de fosfato (pH 7.5) antes de la cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAEcelulosa equilibrada y eluida con el mismo buffer. Después de la elución de los materiales no adsorbidos, la columna se eluyó secuencialmente con 50 mmol /L de NaCl, 150 mmol /L de NaCl y 1 mol /L de NaCl en el mismo buffer para recoger las fracciones adsorbidas. La fracción no adsorbida (D1) que contenía la actividad hemaglutinante se aplicó en una columna de CM-celulosa previamente equilibrada y se eluyó con 10 mmol / l de tampón de acetato sódico (pH 5,4). Después de la elución del material no adsorbido desprovisto de actividad hemaglutinante, un pico (C2) con la actividad hemaglutinante se eluyó con un gradiente lineal de 0-1 moles / L de NaCl en 10 mmol / l de tampón de acetato sódico (pH 5,4). El pico se somete a continuación a cromatografía líquida rápida de proteínas en un Superose 12 HR 10/30 que había sido calibrado con patrones de peso molecular. El hombro de la derecha del primer pico fue eliminado. El primer pico se constituyó la lectina purificada (POL).

Una electroforesis en gel de poliacrilamida-sulfato dodecil de sodio (SDS-PAGE) de POL se llevó a cabo. Las secuencias N-terminales de las dos subunidades de la lectina se determinaron mediante el uso de una unidad de HP G1000A degradación de Edman de Hewlett-Packard y un sistema HP1000 HPLC.

5.5.12 Técnicas de Zhang *et al.* (2009) en *Pleurotus ostreatus*.

5.5.12.1 Purificación

Se homogeneizaron cuerpos fructíferos frescos de *Pleurotus ostreatus* (750 g) en 2 L de 0.15 mol /L de NaCl y después se extrajo durante la noche a 4 °C en la misma solución. Después, la mezcla se centrifugó a 10,000 g durante 20 min. Se añadió sulfato amónico al sobrenadante a una saturación 30-80%. Después de reposar durante la noche a 4 °C, el precipitado recuperado en la centrifugación a 16,900 g durante 10 min. El precipitado se disolvió y se dializó extensamente contra 10 mmol / L de buffer de fosfato (pH 7.5) antes de la cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAEcelulosa equilibrada y eluida con el mismo buffer. Después de la elución de los materiales no adsorbidos, la columna se eluyó secuencialmente con 50 mmol /L de NaCl, 150 mmol /L de NaCl y 1 mol /L de NaCl en el mismo buffer para recoger las fracciones adsorbidas. La fracción no adsorbida (D1) que contenía la actividad hemaglutinante se aplicó en una columna de CM-celulosa previamente equilibrada y se eluyó con 10 mmol / L de buffer de acetato sódico (pH 5.4). Después de la elución del material no adsorbido desprovisto de actividad hemaglutinante, un pico (C2) con la actividad hemaglutinante se eluyó con un gradiente lineal de

0-1 moles / L de NaCl en 10 mmol / L de buffer de acetato sódico (pH 5,4). El pico se somete a continuación a cromatografía líquida rápida de proteínas en un Superose 12 HR 10/30 que había sido calibrado con patrones de peso molecular. El hombro de la derecha del primer pico fue eliminado. El primer pico se constituyó la lectina purificada (POL).

Una electroforesis en gel de poliacrilamida-sulfato dodecil de sodio (SDS-PAGE) de POL se llevó a cabo. Las secuencias N-terminales de las dos subunidades de la lectina se determinaron mediante el uso de una unidad de HP G1000A degradación de Edman de Hewlett-Packard y un sistema HP1000 HPLC.

Para el ensayo de la actividad hemoaglutinante de la lectina, una dilución de dos veces en serie de la solución de lectina en placas de microtitulación en U (50 μ L) se mezcló con 50 μ L de una suspensión de 2% de glóbulos rojos de conejo en buffer fosfato (pH de solución salina 7.2) a 20 ° C. Los resultados se leyeron después de 1 h, cuando el blanco se había sedimentado totalmente.

5.5.13 Técnicas de Kawagishi *et al.* (2000) en *Pleurotus ostreatus*.

5.5.13.1 Purificación

Los cuerpos fructíferos liofilizadas de *P. ostreatus* se homogeneizaron con PBS que contenía 100 mg de CaCl₂ y 100 mg MgCl₂.6H₂O en 1 L (PBS (+)) en una licuadora y se extrajeron con agitación durante 24 h. La suspensión resultante se centrifugó (10 000xg, 30 min) y los residuos se extrajeron de nuevo en PBS (+) con agitación durante 24 h. La suspensión resultante se centrifugó (10 000xg, 15 min). Se añadió sulfato de amonio sólido al sobrenadante combinado para dar 80% de saturación. El precipitado se recogió por centrifugación (10 000xg, 20 min), se resuspendieron en agua destilada, se dializó frente a agua destilada y se liofilizó.

El extracto liofilizado se disolvió de nuevo en PBS (+) y se aplicó a una columna de Sefarosa 4B tratadas con ácido equilibrada con el buffer. Después de que los materiales no unidos se lavaron con el buffer, la fracción unida se desorbió con 5 mM de EDTA, se dializó frente a agua destilada, se desaló por un Acilyzer G1 Micro y se liofilizó, proporcionando la lectina purificada.

5.6 Ensayos utilizando lectinas

5.6.1 Ensayos de lectinas de veneno de *Lachesis muta* en la actividad hemoaglutinante propuestos por Palomina en 2012.

5.6.1.1 Efecto de carbohidratos

Se evaluó D-galactosa, D- manosa, D- maltosa, L- arabinosa, D-fructosa, D-lactosa y Dsacarosa sobre la actividad hemoaglutinante. Se realizaron diluciones seriadas de los carbohidratos con concentraciones finales en el recipiente desde 200 hasta 0.05 mM. Luego se adicionó 1 μ g de lectina purificada, cantidad que produce una hemoaglutinación completa.

Ambos componentes, azúcar más lectina, fueron incubados a 37 °C por 20 minutos e inmediatamente se añadieron glóbulos rojos al 3%. Se halló la cantidad mínima necesaria de cada azúcar para inhibir una hemoaglutinación completa. Los ensayos se realizaron por triplicado.

5.6.1.2 Efecto de agentes reductores y quelantes

Se evaluaron los efectos del 2-Mercaptoetanol (ME), ditioneitol (DTT) y EDTA sobre la actividad hemoaglutinante de la lectina de *L. muta*. Se realizaron diluciones seriadas de los agentes en

placas de microtitulación: EDTA (0,75 - 2 mM), (ME) y DTT (0,75 - 10 mM). Se reemplazó la solución TCS (Tris 0.01M, CaCl 2 mM, NaCl 0.5M) por solución TS (Tris 0.01 2 M, NaCl 0.5 M pH 7.3) en los ensayos que contenían EDTA. La lectina más el agente respectivo fueron incubados por 20 minutos a 37 °C e inmediatamente se añadieron glóbulos rojos al 3%.

5.6.1.3 Efecto de agentes químicos

De manera similar a la descrita para los agentes reductores, se realizaron diluciones de iodoacetato y glutatión (0.75 - 10 mM). Enfrentándolas contra 1 µg de lectina por 20 minutos a 37°C.

5.6.1.4 Efecto de iones divalentes

Se prepararon mezclas que contenían EDTA (0.125, 0.250 y 0.5 mM), iones divalentes bajo la forma de cloruros (0.05 - 1.5 mM) y lectina (1 µg). Se halló la concentración mínima (CMR) de cada ion capaz de reconstituir la AH anulada por EDTA.

5.6.2 Ensayos de lectinas en la actividad hemoaglutinante y de afinidad por carbohidratos en *Caesalpinia spinosa* propuestos por Blasco en 2004.

5.6.2.1 HPLC de fase inversa

20 mg de fracción con actividad hemoaglutinante y de afinidad por carbohidratos de la etapa anterior fue purificada en una columna preparativa Bondapack C18 (0.78 x 30 cm), previamente equilibrada con ácido trifluoroacético 0.1%, pH 3.5 (Buffer A), acoplada a un sistema de HPLC de fase reversa según Freire et al. en 2001. El sistema cromatográfico empleado fue el HPLC-PDA 991 (Waters) equipado con dos bombas modelo 510/B (Waters) y un inyector automático de muestras U6K con un asa de 2.0 ml de capacidad. Inicialmente la elusión de la muestra fue realizada a través de un gradiente lineal (0-100%) con acetonitrilo 66% (v/v) (Buffer B). Las fracciones fueron monitoreadas a 280 nm.

5.6.2.2 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida fue realizada de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli (1970). Para la determinación de la masa molecular de la fracción con actividad hemaglutinante (CsLEC) se usó el programa Origin 6.0.

5.6.2.3 Prueba de Hemoaglutinación

La actividad hemoaglutinante de la lectina fue ensayada en eritrocitos intactos y sobre eritrocitos tripsinizados de humano de los grupos sanguíneos del sistema ABO, todos factor Rhesus positivo (Rh+). La sangre fue recolectada y mantenida en una solución de Alsever (2.05% glucosa, 0.80% citrato de sodio y 0.42% NaCl, pH 6.1 ajustado con ácido cítrico) a 4 °C hasta su uso.

5.6.2.4 Actividad Hemoaglutinante

Para la determinación de la actividad hemoaglutinante de la lectina de tara fueron empleadas placas de microtitulación de 96 pozos. En cada pozo de las primeras filas se adicionaron 50 µl de CTBS (enzima Di-N-acetilchitobiasa) e inmediatamente después 50 µl de la lectina. La muestra fue diluida seriadamente, con agitación y transferencia de 50 µl para el pozo siguiente hasta la

penúltima fila. Los primeros pozos sin muestra pero con eritrocitos sirvieron como controles. Terminadas las diluciones, se agregaron 50 µl de la suspensión de eritrocitos al 3% (v/v) y las lecturas se realizaron después de 2 horas de incubación de la placa a temperatura ambiente. La inhibición de la actividad hemaglutinante por diversos carbohidratos fue realizada con D-glucosa, D-maltosa, D-manosa, D-glucosamina, N-acetil glucosamina, D-galactosa, sacarosa, D-sorbitol y trealosa. En las placas de microtitulación se adicionaron a los primeros pozos de las filas 25 µl de carbohidrato a concentraciones que varían desde 50 a 0.05 mM en CTBS. Estos fueron diluidos serialmente con 25 µl de CTBS ya presentes en los pozos hasta alcanzar una concentración final de 3.86 µg/mL. Las placas se mantuvieron en reposo por 5 minutos, para enseguida adicionárseles 50 µl de una suspensión al 3% (v/v) de eritrocitos tripsinizados del grupo O. Después de 2 horas en reposo a temperatura ambiente, se determinó la menor concentración de carbohidrato capaz de inhibir la aglutinación inducida por 3.86 µg/ml de lectina sobre eritrocitos tripsinizados del grupo O Rh+.

Asimismo, se usaron los agentes quelantes EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) y EGTA (ácido etilenglicol bis tetraacético) para ensayos de inhibición. En cada pocillo de prueba se agregaron 25 µl de TBS más 25 µL del respectivo agente quelante, y se hizo una dilución seriada en la misma fila hasta obtener concentraciones que variaron desde 50 hasta 0.10 mM. Se determinó la menor concentración de agente quelante capaz de inhibir la aglutinación inducida por 3.86 µg/ml de lectina sobre eritrocitos tripsinizados del grupo O.

5.6.2.5 Análisis de la secuencia aminoacídica

El análisis de aminoácidos fue realizado en un analizador automático de aminoácidos PICO TAG (Sistema Waters), donde la identificación de los aminoácidos fue realizada a través de una cromatografía en HPLC (high-pressure liquid chromatography) del producto feniltiocarbamil del aminoácido proveniente de la derivatización con fenilisotiocianato de los aminoácidos que se obtengan por hidrólisis ácida. Esta forma de cromóforos pudo ser detectada en concentraciones de 1 pmol. Para la determinación de la secuencia N-terminal, 40 nmoles de la muestra reducida con 1 M de DTT obtenida en la cromatografía de fase reversa en HPLC fueron colocados en el secuenciador automático modelo 477 (Applied Biosystems). La secuencia N-terminal de la fracción fue comparada con la secuencia de otras lectinas usando el servidor electrónico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> que también brinda acceso directo a bases de datos de proteínas como SWISS-PROT.

5.6.3 Ensayos de lectinas en la actividad hemoaglutinante, secuenciación de péptidos, efecto de cationes metálicos y estabilidad al pH en *Phaseolus folius* propuestos por Torres en 2010.

5.6.3.1 Cuantificación de proteína

La proteína se cuantificó por el micro método de Bradford (1976). Esta es una técnica que determina la concentración de proteína soluble y se basa en el cambio de coloración al unirse a diferentes concentraciones de proteína. El colorante utilizado es el azul brillante de Coomassie G-250, colorante ácido que se une principalmente a aminoácidos básicos (Lys, Arg, His) y aromáticos (Trp, Tyr, Phe) y la sensibilidad de este método cae en el rango de 1-25 µg/mL.

Para la determinación de la concentración de proteína se utilizó una solución estándar de albúmina sérica de bovino (ASB) a diferentes concentraciones y reactivo comercial de Bradford así como placas de 96 pozos. Brevemente, se colocaron 10 µL de los estándares de proteína o 10 µL de la muestra problema y se adicionaron 200 µL del reactivo de Bradford, se incubaron a

temperatura ambiente por 15 min y el cambio de color generado se leyó a 595 nm en un lector de microplacas.

5.6.3.2 Determinación de actividad aglutinante

Para determinar la actividad aglutinante se utilizó el método de las diluciones dobles seriadas en placas de 96 pozos (Jaffé, 1960), en donde se colocaran 100 μ L de PBS como control negativo, después en los pozos de cada línea (2A, 3A,..., 8A) se agregaron, por triplicado, 100 μ L de la fracción a probar con concentración de proteína conocida. Posteriormente se agregaron 50 μ L de PBS a toda la placa y se realizaron diluciones dobles seriadas comenzando en los primeros pozos y pasando a los siguientes (1A, 1B, 1C,...,1L). Finalmente, a cada pozo se le agregaron 50 μ L de eritrocitos de conejo al 2%, los cuales habían sido previamente fijados con glutaraldehído (Turner y Liener, 1975) y se incubó a 37^o C durante 3 h. La placa se leyó en un microscopio invertido y la actividad aglutinante se determinó utilizando una escala arbitraria y apreciativa.

La actividad específica se cuantificó mediante la ecuación:

$$AE = 2^n / \text{mg}$$

Donde: AE=Actividad específica aglutinante (U/mg) expresada en unidades por mg de proteína inicial, n=Última dilución con aglutinación apreciable al microscopio, mg es la cantidad de proteína en mg.

5.6.3.3 Perfil electroforético monodimensional

El perfil electroforético de la fracción se obtuvo mediante electroforesis nativa y desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), al 10% en el gel separador y en el concentrador al 4%, utilizando una cámara de electroforesis de acuerdo al método de Schägger y Von Jagow (1987). Para correr el sistema se utilizó una cámara de electroforesis Mini-Protean III de Biorad, utilizándose marcadores de amplio rango, posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomassie.

5.6.3.4 Perfil electroforético bidimensional y determinación del punto isoeléctrico

El perfil electroforético se obtuvo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones, la primera dimensión o isoelectroenfoque consiste en la separación de proteínas por punto isoeléctrico (pI). Para esta dimensión se utilizaron tiras de acrilamida con un intervalo de pH de 3-7 en un sistema lineal el isoelectroenfoque en un equipo IPG-phor Isoelectric Focusing System de Amersham Biosciences, con las siguientes condiciones: 15 h de rehidratación, 1 h a 250 volts (V), 30 min a 500 volts, 30 min a 1000 volts y 2 h a 8000 volts. Para la segunda dimensión, que consiste en la separación de proteínas por peso molecular (PM), se equilibró la tira de pH con una solución de equilibrio durante 15 min con dos cambios. Una vez equilibrada se colocó la tira sobre el gel de poliacrilamida al 10% en una cámara Hoffer y se selló con agarosa. Las condiciones de corrida fueron 30 min a 80 V y posteriormente se incrementó el voltaje a 120 V. La determinación del pI se realizó mediante una escala arbitraria en el gel en donde el gel se mide transversalmente y cada centímetro del gel corresponde a una unidad de pH.

5.6.3.5 Identificación de glicoproteínas

Se corrió una electroforesis bajo las condiciones del sistema Schagger y Von Jagow (1987) en gel de poliacilamiada al 10%. La determinación de glicoproteínas se realizó con la técnica de tinción de

Schiff (Sigma-Aldrich)/ácido peryódico (PASS). Brevemente, los geles se fijaron con etanol al 50% por 30 min, posteriormente se lavaron con agua destilada por 10 min y se incubaron 30 min en una solución de ácido peryódico 1% (v/v) ácido acético 3% (v/v) (preparada en fresco). Después de esto, los geles se lavaron con agua destilada 6 veces por 5 min para después lavarse 2 veces por 10 min con una solución de metabisulfito de sodio 0.1% en 10 mM HCl (preparada en fresco) y se incubaron con el reactivo de Schiff por una hora en ausencia de luz. Pasado este tiempo se lavaron con la solución de metabisulfito de sodio al 0.1% en HCl durante 1 h en ausencia de luz, enseguida los geles se lavaron varias veces por 2 h en ausencia de luz con una solución de metabisulfito de sodio 0.5% (v/v) en 10 mM HCl (preparada en fresco). Por último, se dejaron los geles en una solución de ácido acético 7.5% (v/v) metanol 5% (v/v) en agua destilada. Las bandas color violeta indican presencia de glicoproteínas.

5.6.3.6 Cromatografía de FPLC (Fast performance Liquid Chromatography)

Con la finalidad de avanzar en la purificación la muestra se hizo pasar a través de una columna de FPLC acoplada a HPLC con una columna de Superosa 12HR10/30 de filtración en gel, la cual fue equilibrada con un buffer de fosfato de sodio 0.01M pH 7.5, la elusión se mantuvo a flujo constante de 0.4 mL/min.

5.6.3.7 Cromatografía de afinidad

Las muestras utilizadas en la columna de afinidad fueron extracto crudo y la obtenida de la cromatografía de exclusión de peso molecular (G-75). Se utilizó una matriz de fetuína-agarosa empacada en una columna de Bio-Rad de 1.5 cm de diámetro y 3 cm de largo equilibrada con Glicina-HCl 50 mM pH 8. La muestra se hizo pasar por dicha columna, para posteriormente eluir con Glicina- HCl 50 mM pH 2.8 y NaCl 2 M (Solución B).

Las fracciones se recuperaron y se les midió actividad aglutinante.

5.6.3.8 Identificación de la(s) lectina(s) por espectrometría de masas

A partir de lo los geles obtenidos mediante electroforesis en 2D se cortaron los spots o las manchas de manera que quedaron de un tamaño aproximado de 2-3 mm. Posteriormente lavaron dos veces con 50 µL de agua ultrapura durante 30 min, 2 lavados con 50 µL de acetonitrilo al 50% durante 10 min y finalmente otro lavado con acetonitrilo al 100% durante 10 min. Posteriormente los spots se rehidrataron con 25 µL de NH_4HCO_3 100 mM y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se le adicionaron 25 µL de acetonitrilo al 100% y se dejó incubar 15 min a temperatura ambiente con agitación, se retiró el sobrenadante y se secó en Speed Vac. Para la reducción se rehidrataron con 50 µL de DTT 10mM y 500 µL de Tris 100 mM pH 9 y se incubaron por 45 min a 56° C con agitación, transcurrido este tiempo se dejó enfriar y se retiró el sobrenadante. Para la alquilación se agregaron 50 µL de ácido yodo acético (IAA) 55 mM en NH_4HCO_3 100 mM y se incubó por 15 min en la oscuridad. Posteriormente se lavaron los pedazos del gel con igual volumen de NH_4HCO_3 100 mM/acetonitrilo 100% y se incubaron por 15 min, eliminó el sobrenadante y se adicionó de 50 a 100 µL de acetonitrilo al 100%, se incubó por 15 min y se secó. Para la digestión se rehidrataron los geles con 15 µL de una solución que contenía 25 µL Tripsina 0.1 µg/µL y 225 µL de NH_4HCO_3 50 mM y se incubaron por 45 min a 4° C. Se eliminó el líquido remanente, se le adicionaron 20 µL de NH_4HCO_3 50 mM y se incubó toda la noche a 37° C. Para la extracción y purificación de péptidos se retiró el sobrenadante de la digestión y se colocó en tubos de 0.6 µL previamente enjuagados con ácido fórmico al 5%, se le adicionaron 25 µL de agua y se incubó por 10 min con agitación. Posteriormente se sonicó 5 min, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. Este paso se repitió dos veces más, pero se utilizó acetonitrilo

60%/fórmico 5%, se juntaron los sobrenadantes, se secó la muestra a la intemperie y se le adicionaron 5 μ L de ácido fórmico al 5%.

Para la limpieza de la muestra se equilibró la punta Zip Tip 2 veces con acetonitrilo al 100% y 3 veces con ácido fórmico al 5%, se tomaron 3 μ L de la muestra digerida y se aspiró para retirar el volumen, esto se hizo por al menos 6 veces. Después se lavaron los péptidos contenidos en la Zip Tip con ácido fórmico al 5% 2 veces y se colocó 1.3 μ L de solución de elusión (acetonitrilo al 60%/ácido fórmico 1%). Se aspiró y retiró el volumen de la solución en la Zip Tip para eluir los péptidos retenidos en la resina y después cargar la muestra en el capilar y posteriormente en Q/Tof.

5.6.3.9 Secuenciación de péptidos

Las muestras de HPLC liofilizadas se resuspendieron en una solución 50 mM de bicarbonato de amonio y acetonitrilo (ACN) al 10%, posteriormente se le adicionaron 10 mM de Tris 2-carboxietilfosfina (TCEP), se calentó a 35° C por 10 min y se dejó enfriar. Se adicionó IAA a una concentración final de 15 mM y se incubó por 1 h a temperatura ambiente en ausencia de luz, posteriormente se incubó con 5 mM de ditiotreitól (DTT) por 10 min, al finalizar la incubación se le adicionaron 30 ng de tripsina y posteriormente se preincubó de 4 a 12 h a 37° C.

Se agregó ácido fórmico al 5% por 10 min y finalmente la muestra se concentró en un Speed Vac para su análisis en el equipo LTQ-FT-ICR (método modificado de nano spray utilizando una fuente acoplada de Waters UPCL). Los resultados se analizaron con el programa Scaffold 2.

5.6.3.10 Identificación de los carbohidratos

De la muestra proveniente de HPLC se utilizaron 20 μ g de proteína previamente cuantificada por Bradford. Posteriormente se incubó con la enzima PNGase F a 37 °C por 12 h para liberar los N-Glicanos. Los oligosacáridos liberados fueron purificados por SPE (solid-phase extraction) y PGC (porous graphitic carbon).

Previamente la columna PGC fue lavada con agua ultra pura y posteriormente con 0.05% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) en 80% de acetonitrilo (ACN)/H₂O (v/v), para posteriormente aplicarle los oligosacáridos. La columna fue lavada con agua desionizada con un flujo de 1mL/min con la finalidad de remover sales y residuos de buffer. Los oligosacáridos fueron eludidos con 10% de ACN en H₂O, 20% de ACN en H₂O, 40% de ACN en 0.05% de TFA en H₂O. Cada fracción fue colectada y concentrada para su análisis por MALDI.

5.6.3.11 Efecto de cationes metálicos

Para evaluar el efecto de los cationes metálicos la muestra, en una concentración de 1 mg en 0.5 mL de tris-HCl pH 8, se incubaron por 24 h con 0.5 mL de EDTA 20 mM a 6° C. Posteriormente la muestra se dializó exhaustivamente en una cámara de microdiálisis marca Bethesda Research Laboratories (BRL), con una membrana de 3.5 kDa marca Spectra/Por el contrario tris-HCl 20 mM pH 8. Se tomaron alícuotas de 100 μ L y se incubaron individualmente con 100 μ L de CaCl₂, MgCl₂ o MnCl₂ 2mM por 24 y finalmente se realizó el ensayo de aglutinación.

5.6.3.12 Estabilidad al pH y determinación del pH óptimo

Para la determinación del pH óptimo se incubó la muestra por 24 h a 6° C en diferentes soluciones amortiguadoras desde pH 2 hasta pH 10. Las soluciones amortiguadoras utilizadas fueron 50 mM de glicina-HCl (pH 2-3), 50 mM de ácido succínico (pH 4-5), 50 mM de ácido succínico-NaOH (pH 6), 50 mM Tris-HCl (pH 7-8), 50 mM de glicina-NaOH (pH 9-10). Finalmente se realizó el ensayo de aglutinación.

Para determinar la estabilidad al pH se incubó 1 mg de la muestra por 24 h y se disolvió en 100 µL de agua y 900 µL de cada buffer; posteriormente se mantuvo la mezcla a 6° C durante 24 h. Pasado este tiempo se realizó el ensayo de aglutinación diluyendo serialmente con PBS.

5.6.4 Ensayos de lectinas en la actividad antitumoral en *Agrocybe aegerita* propuestos por Zhao et al. en 2003.

5.6.4.1 Ensayos de MTT (reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)

Las suspensiones celulares se prepararon a una concentración de 3×10^4 células / ml, y se incubaron en una placa de 96 recipientes múltiples durante 24 h.

Después de desechar el medio de cultivo y lavar las células con PBS, 0.1 ml de medio de [suplementado con 2% (v / v) de suero de ternera fetal], que contiene la muestra a diversas concentraciones, a continuación, se incubaron durante otras 48 h. Para los experimentos de control positivo, las células se trataron con 0.1 ml ofmedium (suplementado con 2% de suero fetal de ternero) que contiene 100 mg / ml de la adriamicina, y el grupo de control negativo se trató con el samemedium sin adriamicina. El número de células supervivientes se determinó por el Método de MTT. La relación de inhibición se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = (\text{A grupo control} - \text{A grupo tratado AAL}) / \text{A grupo control} \times 100\%$$

5.6.4.2 Estudios *in vivo*

Las células S-180 (que se mantienen en la cavidad peritoneal de ratones BALB / c macho) se utilizaron para el ensayo de actividad antitumoral. La suspensión celular se diluyó a 1.18×10^8 células / mL, y 0.1 ml de la suspensión se inoculó por vía subcutánea en la zona oter de los ratones BALB / c (7 semanas de edad, 20 g). Los ratones portadores de tumores se trataron, 3 días después de la inoculación, por en el tumor *in situ* inyecciones de 0.06 ml del hongo aislado (1.67 mg / mL en solución salina fisiológica) a la dosis de 0.1 mg / ratón cada dos días. El grupo de control se trató con 0.9% de NaCl.

Los ratones fueron sacrificados 20 días después de la inoculación de las células tumorales, y sus tumores sólidos se extirparon y se pesaron. La relación de inhibición del tumor se calculó como sigue:

$$\text{Radio de inhibición (\%)} = [(C - T) / C] \times 100\%$$

Donde C es el peso medio del tumor del grupo de control y T es el peso medio del tumor del grupo tratado con AAL. Tejidos tumorales se presentaron para inclusión en parafina y se seccionaron en cortes de 5 µm. Algunas partes de los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina / eosina, y las otras partes se utilizaron en ensayos de TUNEL (uridina transferasa terminal deoxytidyl final).

5.6.4.3 Tinción Hoechst 33258

Células HeLa fueron expuestas a 100 µg / mL de la muestra durante 48 h, se lavaron con PBS y se fijaron en solución de fijación de Carnoy fresco (metanol / ácido acético, 3:1 en vol.). Después de la tinción con Hoechst 33258 (0.5 µg / mL en PBS) durante 30 min, fueron tomadas fotomicrografías representativas con una Leica DM / LM microscopio bajo iluminación UV (380 nm).

5.6.4.4 Sensor de membrana mitocondrial ApoAlert

Las células HeLa se incubaron en una placa de 6 recipientes durante 24 h, en el que el hongo aislado se añadió a una concentración final de 100 mg / mL. El Kit de sensores de membrana mitocondrial ApoAlert se utilizó para detectar la apoptosis celular 48 h más tarde. Las células se examinaron bajo un microscopio utilizando un filtro de paso de banda. Las células HeLa adherentes se retiraron de la placa y aprox. 1×10^6 células fueron alícuotadas en tubos de citometría de flujo.

5.6.4.5 Análisis del ciclo celular

Se cultivaron células HeLa (2×10^5) con o sin las muestras (100 µg / mL) a 37 °C. A las 24 h y 48 h se recogieron, se lavaron con PBS, y se fijaron con 75% de etanol a 4 °C durante 2 h. Las células fueron tratadas con RNasa A (0.25 mg / mL) a 37 °C durante 1 h. Después del lavado, las células se tiñeron con 50 mg / mL de yoduro de propidio a temperatura ambiente durante 10 min. El análisis del ciclo celular se realizó en citómetro de flujo Coulter EpicsXL.

5.6.4.6 Prueba de TUNEL

Pruebas TUNEL en cortes de parafina se realizaron utilizando un kit comercial (en el kit de detección de muerte celular *in situ*, POD), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las laminillas fueron teñidas con hematoxilina y se observaron bajo un microscopio de luz.

5.6.4.7 Prueba de actividad de DNasa

La actividad de la DNasa del hongo aislado se midió usando una prueba de digestión de plásmido, utilizando pCDNA3 como el sustrato. La incubación se realizó con 2 µg de plásmido en 19 µL de buffer de digestión (6 mM de Tris / HCl, 6 mM de MgCl₂, 100 mM de NaCl, 1mM dithiothreitol), al que se añadió 1 µL de muestra (a una concentración final de 50 g / mL , 5 mg / mL o 0.5 g / mL). Después de 30 min a 37 °C, la integridad de la pCDNA3 se monitoreó mediante electroforesis en gel. Alternativamente, la actividad de la DNasa se siguió semi-cuantitativamente por incubación del sustrato (40 µL o 1.6 µg de ADN de esperma de salmón) junto con 10 µL de muestra (las muestras fueron diluidas en 100 mM de Tris / HCl, pH 7.1). Después de una incubación de 30 min a temperatura ambiente, la integridad del ADN de esperma de salmón se controló mediante electroforesis en gel del ADN en un gel de agarosa al 0.7% (w / v).

5.6.5 Ensayos moleculares y bioquímicos de lectinas propuestos por Khan y Khan en 2011.

5.6.5.1 Punto isoelectrico

Los puntos isoelectricos de la mayoría de las lectinas fúngicas están en el rango de 5-8. Las lectinas de *Chlorophyllum molybdites* son proteínas altamente ácidas con un pI de 3.75.

Por otro lado, las lectinas de *Laccaria amethystea*, *Auricularia polytricha* y *Rhizoctonia solani* son proteínas altamente básicas con los valores de pI de 9.5, 10.6, y >9, respectivamente.

5.6.5.2 El contenido de carbohidratos

El contenido de carbohidratos varía de lectina a lectina y en algunos casos podría llegar a 30% como en la lectina de *Rigidoporus lignosus* mientras que en algunos casos está totalmente ausente como en las lectinas de *Laccaria amethystea* y *Laetiporus sulphureus*.

5.6.5.3 Requerimiento de iones metálicos

Las lectinas fúngicas en general no requieren iones metálicos para su actividad. La lectina de *Xerocomus chrysenteron* requiere Mn^{2+} para su actividad. En caso de la lectina de *Xerocomus spadiceus* Zn^{2+} y Al^{3+} estimularon la actividad mientras Fe^{3+} estimuló la actividad de la lectina de *Polyporus adusta*. Por el contrario, Fe^{3+} , Al^{3+} y Zn^{2+} inhibieron la actividad de la lectina de *Armillaria luteo-virens*.

La actividad de la lectina de *Pholiota adiposa* se ve reforzada por Cu^{2+} , Fe^{2+} y Al^{3+} . La actividad hemaglutinante de *Inocybe umbrinella* es inhibida por Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} pero no es afectada por Fe^{3+} , Zn^{2+} , Al^{3+} .

Curiosamente, la actividad hemaglutinante de la lectina de *Pleurotus citrinopileatus* fue inhibida por $HgCl_2$ pero reforzada por $AlCl_3$.

5.6.5.4 Estabilidad y desnaturalización

Algunas lectinas mostraron una gran estabilidad como la lectina de *Pholiota adiposa*, que es estable hasta 50 °C en soluciones de baja molaridad de NaOH y HCl. La lectina de *Pleurocybella porrigens* es estable por debajo de 60 °C y en un rango de pH 4.5 a 8.0, mientras que la lectina del ascomiceto *Cordyceps militaris* es estable entre el rango de pH 2-13. Las lectinas de *Agaricus edulis* mostraron muy alta estabilidad térmica y podrían soportar alta concentración de urea y pH extremo.

La lectina de *Ganoderma capense* es estable a 100 °C durante 60 minutos, mientras que, la lectina de *Armillaria luteo-virens* es estable hasta 70 °C, pero sensible a pH alto y bajo. La estabilidad de la conformación de la lectina de *Fusarium solani* se estudió a pH, temperatura y urea extrema y en presencia de tiocianato de guanidina. La lectina mostró estructura terciaria flexibles a pH bajo, pero mantuvo la estructura secundaria y cuaternaria. En la presencia de urea y guanidina tiocianato, mostró curvas de desplegamiento monofásicas y su capacidad de calor se mantuvo constante durante la desnaturalización térmica.

5.6.5.5 Propiedad fluorométrica

En la lectina de *Agrocybe cylindracea* el desactivado de fluorescencia y modificación de residuos de triptófano indicaron que se encontraban alrededor de dos residuos de triptófano en la proteína y uno de ellos podría encontrarse en la superficie, mientras que el otro fue enterrado en el surco plano hidrófobo cerca de la superficie.

En caso de la lectina de *Fusarium solani* el desactivado de fluorescencia reveló que el triptófano único en la subunidad es 100% accesible a acrilamida, pero sólo el 50% a succinimida y al efecto del pH sobre la inactivación inducida por yoduro de cesio y se indicó que el residuo de triptófano podría estar presente en la vecindad de aminoácidos positivamente cargados.

5.6.5.6 Las modificaciones químicas

Estudios de modificaciones químicas de la lectina de *Ischnoderma resinatum* mostraron participación de lisina, carboxilato, arginina, triptófano, histidina, cisteína y tirosina en la actividad de unión de la lectina. Un inhibidor de azúcar de la lectina lactulosa no pudo protegerla contra la inactivación mediada por modificación NBS, mientras que, protegió la inactivación inducida por un éster glicinetilo, ciclohexano-1, 2 - diona, anhídrido etoxiformico y N-acetilimidazol (NAI).

Triptófano, carboxilato y tirosina participaron en la actividad de unión de la lectina de *Hericium erinaceum*.

La modificación química de la serina / treonina e histidina mostró la necesidad parcial de estos residuos para la actividad hemoaglutinante de la lectina de *Agrocybe cylindracea*. Sin embargo, las modificaciones de la arginina, tirosina y cisteína no tuvieron ningún efecto sobre su actividad hemoaglutinante. En caso de *Fusarium solani* sólo los residuos de tirosina se involucraron en la hemoaglutinante de la lectina y la inactivación provocada por la modificación de la tirosina por N-acetilimidazol (NAI) fue revertido por hidroxilamina. El triptófano, lisina e histidina se han implicado en la actividad hemoaglutinante de la lectina de *Ganderma lucidum*.

5.6.6 Ensayos de actividad hemoaglutinante, actividad antiproliferativa en líneas de células tumorales e inhibición de la actividad transcriptasa inversa VIH-1 en lectinas de *Pholiota adiposa* propuestos por Zhang *et al.* en 2009.

5.6.6.1 Ensayo para la actividad de lectina (hemoaglutinante)

En el ensayo, una serie de diluciones de la solución de lectina en placas de microtitulación en U (25 μ L) se mezcló con 25 μ L de una suspensión de 2% de glóbulos rojos de conejo en un buffer de solución salina fosfatada (pH 7.2) a 20 ° C. Los resultados se registraron después de 1 h, cuando los eritrocitos en el espacio en blanco habían totalmente sedimentado. El título de hemoaglutinación, que se define como el recíproco de la dilución más alta de hemoaglutinación exhibida, fue contado como una unidad de hemoaglutinación. La actividad específica es el número de unidades de hemoaglutinación / mg proteína.

Para investigar las pruebas de inhibición de hemoaglutinación inducida por lectinas por diversos carbohidratos, se llevaron a cabo de una manera análoga a la prueba de hemoaglutinación. Los carbohidratos del ensayo incluyen inositol, sorbosa, rafinosa, L-ramnosa, D-fructosa, D-manosa, celobiosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-melibiosa, lactosa, inulina, maltosa, D-galactosa, D-glucosa y O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido. Se prepararon diluciones seriadas dobles de muestras de azúcar en un buffer de solución salina con fosfato (pH 7.2). Todas las diluciones se mezclaron con un volumen igual (25 μ L) de una solución de la lectina con 16 unidades de hemoaglutinación. La mezcla se dejó en reposo durante 30 min a temperatura ambiente y luego se mezcló con 50 μ L de una suspensión de eritrocitos de conejo al 2%.

Los efectos de la temperatura, NaOH, HCl, y cloruros metálicos sobre la actividad hemoaglutinante de la lectina se determinaron como se ha descrito previamente.

5.6.6.2 Ensayo de la actividad antiproliferativa en líneas de células tumorales

Las líneas de células tumorales, el cáncer de mama humano (MCF-7) y de hepatoma (Hep G2) se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 mg / L de estreptomina y 100 UI / mL de penicilina a 37 ° C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. Las células (1×10^4) en su fase de crecimiento exponencial se sembraron en cada recipiente de una placa de cultivo de 96 recipientes y se incubaron durante 3 h antes de la adición de la lectina.

La incubación se llevó a cabo durante otras 48 h. Se añadió entonces a cada recipiente un precursor radiactivo, 1 Ci, ([³H-metil] timidina, de GE Healthcare) y se incubó durante 6 h. Los cultivos se recogieron por un recolector de células. La radiactividad incorporada se determinó por recuento de centelleo líquido.

5.6.6.3 Ensayo para el inhibidor de la actividad transcriptasa inversa VIH-1

La actividad inhibitoria frente a virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH) -1 transcriptasa inversa (RT) se evaluó mediante el uso de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando un kit de Boehringer Mannheim. El ensayo se aprovecha de la capacidad de la transcriptasa inversa para sintetizar ADN, a partir de la plantilla / cebador híbrido de poli (A)-oligo (dT) 15. La digoxigenina-y los nucleótidos marcados con biotina en una proporción optimizada se incorporan en la molécula de ADN sintetizada por el RT. La detección y cuantificación del ADN sintetizado como una medida de la actividad de la RT sigue el protocolo de ELISA de tipo sándwich. Se utilizó una cantidad fija (4-6 ng) de recombinante VIH-1 RT. La actividad inhibitoria de la lectina se calculó como porcentaje de inhibición en comparación con un control sin la proteína.

5.6.7 Ensayos de hemoaglutinación, actividad antifúngica, actividad inhibitoria de la transcriptasa inversa y de actividad antitumoral en lectinas de *Pleurotus ostreatus* propuestos por Zhang *et al.* en el 2009.

5.6.7.1 Ensayo de hemoaglutinación

El título de hemoaglutinación, que se define como el recíproco de la dilución más alta de hemaglutinación exhibiendo, fue contado como una unidad de hemaglutinación. La actividad específica es el número de unidades de hemaglutinación por mg de proteína.

Para llevar a cabo las pruebas para investigar la inhibición de la hemaglutinación inducida por lectinas por diversos carbohidratos, se llevaron a cabo de una manera análoga a la prueba de hemaglutinación. Se prepararon diluciones seriadas dobles de muestras de azúcar en solución salina tamponada con fosfato. Todas las diluciones se mezclaron con un volumen igual (25 µl) de una solución de POL con 16 unidades de hemaglutinación. La mezcla se dejó en reposo durante 30 min a temperatura ambiente y luego se mezcla con 50 µl de una suspensión de eritrocitos de conejo al 2%. Se calculó la concentración mínima del azúcar en la mezcla de reacción final que inhibe completamente la hemaglutinación 16 unidades de la preparación POL.

5.6.7.2 Ensayo de actividad antifúngica

El ensayo de POL para la actividad antifúngica se realizó usando placas de Petri estériles (100 x 15 mm) que contienen 10 ml de agar de dextrosa de patata. En el centro de la placa se inoculó el micelio del hongo ensayado. Alrededor de la colonia de hongos y a una distancia de 0.5 cm a partir de que fueron colocados discos de papel del mismo tamaño. Una parte alícuota de 6 µl de POL en 10 mmol / L de buffer de acetato de sodio (pH 5.5) que contenían 0.13 mol / L NaCl a un disco, 6 µL del buffer sirvió como control. La incubación de la placa Petri se llevó a cabo a 23 ° C durante 72 h hasta que el crecimiento micelial tenía discos periféricos con envoltura conteniendo el control y se había formado medias lunas de inhibición alrededor de los discos con muestras de actividad antifúngica. Tres especies de hongos, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *comatus* se examinaron en el ensayo.

5.6.7.3 Ensayo de actividad inhibidora de la transcriptasa inversa

El ensayo de la actividad inhibidora de la transcriptasa inversa del VIH se midió por ELISA utilizando un kit no radiactivo de Boehringer Mannheim. El ensayo de inhibición se realizó como se describe en el protocolo incluido en el kit, excepto que cada recipiente contenía 2 ng-1 transcriptasa inversa del VIH recombinante en un volumen de reacción total de 60 µl.

Las glicohidrolasas están implicados en la infección por VIH. En el ensayo para la inhibición de la actividad glicohidrolasa, α-glucosidasa, β-glucosidasa y β -glucuronidasa y sus correspondientes sustratos glucósido de p-nitrofenilo se utilizaron para establecer la reacción enzimática en pH 6.4 10 mmol / L de buffer MES, en una microplaca de 96 recipientes.

Sustratos y enzimas se disolvieron en 50 mmol /L de buffer apropiado para cada enzima. Para probar la inhibición de la enzima, cada recipiente de la microplaca contenía 2 mmol /L de sustrato, 40 mmol /L de buffer, una muestra de ensayo y la enzima suficiente para causar un cambio medible en la absorbancia a 405 nm. POL se dejó interactuar con las enzimas durante 5 min antes de la reacción que inició por adición de sustrato. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. La reacción se terminó mediante la adición de 50 µl de 2 mol /L de glicina-NaOH, pH 10. La placa se leyó en un lector de microplacas BioRad a 405 nm.

5.6.7.4 Los ensayos para la actividad antitumoral

Sarcoma 180 o células de hepatoma H-22 se utilizaron para el ensayo de la actividad antitumoral. Un ratón ICR fue sacrificado en el séptimo día después de la inoculación de las células tumorales y se recogió el líquido ascítico. Después las células se lavaron tres veces con un buffer de solución salina y fosfato, la suspensión celular se diluyó a 5×10^7 células / mL, y 0.1 mL de la suspensión se inoculó por vía subcutánea en el área inguinal del ratón ICR.

Después de la inoculación los ratones recibieron diariamente inyecciones intraperitoneales de POL con dosis de 1.5 mg / kg de peso corporal / día durante 20 días. El grupo control fue tratado con un buffer fosfato salino (pH 7.2) al día durante 20 días. En el vigésimo primer día después de la inoculación del tumor las células, los ratones se sacrificaron y sus tumores sólidos se extirparon y se pesaron. La actividad de inhibición del tumor se calculó como:

$$\% \text{ Inhibición del tumor} = (C - T) / C \times 100\%$$

Donde C es el peso medio del tumor del grupo de control y T es el peso medio del tumor del grupo tratado con POL.

Los ratones se dividieron en 8 grupos con 8 animales por grupo. Se inocularon células de sarcoma S180 o células de hepatoma H-22 por vía intraperitoneal a los animales a las dosis de 5×10^6 células y 2.5×10^5 células. El grupo tratado con POL se trató con 1.5 mg de lectina / kg / día hasta que el 50% de los ratones en el grupo de control tratado con el buffer de solución salina con fosfato había muerto. Los pesos corporales se registraron una vez cada dos días y se observó la duración de la supervivencia.

5.6.8 Ensayos de determinación de proteínas, de la actividad de la glucosidasa y de tinción de proteínas en lectinas de *Pleurotus ostreatus* propuestos por Brechtel *et al.* en 2001.

5.6.8.1 Determinación de proteínas

La lectina de *Pleurotus* fue aislado de hongos disponibles comercialmente por cromatografía de afinidad en mucina gástrica de cerdo desialilada, inmovilizada sobre Sefarosa 4B.

La determinación de proteínas se llevó a cabo ya sea mediante la medición de la absorbancia (A_{280}) o por el método del ácido bicinónico (BCA) con albúmina de suero bovino como estándar. La aglutinación se puso a prueba con una suspensión al 2% de eritrocitos (grupo sanguíneo O (H)) en un buffer Tris-HCl 0.05 mM que contenía 0.1 M NaCl.

Se utilizó un instrumento de fabricación casera para la electroforesis capilar. Se realizaron separaciones en un 50 μm x 40 cm (longitud efectiva de principio a detector de 25 cm) capilar de sílice (Polymicro, Phoenix, AZ) a 10-20 kV. La longitud de onda de detección fue de 214 nm.

La acetanilida sirvió como un indicador para el flujo electroosmótico. Para determinar el punto isoeléctrico de la lectina, 25 mL de 0.2 M Tris base fue llevado a los valores de pH deseados (pH 7.5, 7.6, 7.7, y 7.8) mediante la adición de HCl 0.1 M y se completó hasta 100 mL con agua.

Antes de su uso, los capilares frescos fueron pre-condicionados por lavado con NaOH 0.1 M durante 5 min y la aplicación de 10 kV durante 15 min. Después de esto, se equilibró primero de un enjuague con buffer durante 5 minutos y, posteriormente, mediante la aplicación de un voltaje de 10 kV durante 30 min. Las muestras se disolvieron en el buffer respectivo y se inyectaron electrocinéticamente (1-3 kV, 10-30 s). Entre carreras individuales, los capilares se enjuagaron con buffer durante 2 min.

Para la determinación de la k_{diss} , se mezclaron 50 mM de Tris: HCl pH 7.4 y 25 mM de α -lactosa-1-fostato en este buffer en las proporciones adecuadas para obtener las concentraciones deseadas del ligando. Todas las operaciones se llevaron a cabo en condiciones estrictamente asépticas.

5.6.8.2 Actividad de la glucosidasa

La actividad de la glucosidasa se determinó de acuerdo con los glucósidos de p-nitrofenilo de los siguientes monosacáridos como glucosa en sustratos: (a y b), galactosa (a y b), manosa (a), L-fucosa (a), y N-acetilglucosamina (b). Los glucósidos se disolvieron en 50 mM en acetato 50 mM (pH de 3 a 6.5) o buffers Tris-HCl (pH 7), cada buffer contiene 0.1 mM de CaCl_2 , MgCl_2 , y ZnCl_2 .

Se añadieron dos soluciones de 5-200 μL de sustrato, buffer y 50 μl de la muestra de enzima para dar un volumen total de 500 μl .

Dependiendo de la actividad de la enzima, la reacción se dejó transcurrir entre 2 y 20 min a 37 ° C. Se terminó mediante la adición de 500 μl de NaOH 0.1 M, y la lectura A_{405} . Se utilizó para el cálculo un coeficiente de absorción molar de p-nitrofenolato de 18 000 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Todos los experimentos cinéticos se realizaron al menos por triplicado.

Para la electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, 10 μg de lectina en 10 μl de un buffer 0.044 M b-alanina acetato de pH 4.5 se aplicó a un gel de poliacrilamida al 7.5% en un buffer 0.08 M acetato de potasio pH 4.3, y se sometió a electroforesis a una corriente constante (20 mA) durante 2.5 h. Después de la electroforesis, el gel junto con una membrana de nitrocelulosa se colocó entre las pilas de papel de filtro humedecido con 0.1 M de buffer de acetato sódico pH 4.5 y electrodos de grafito. Electrotransferencia se llevó a cabo a una corriente constante de 40 mA y una tensión de aproximadamente 40 V. Después de esto, la membrana de nitrocelulosa se secó en

el aire abierto durante 1 h, después se lavó primero con NaOH 0.2 M y se bloqueó con 0.05% de Tween 20 en PBS (9.76 g de NaCl, 1.14 g de Na₂HPO₄, 0.31 g de NaH₂PO₄ · 2H₂O añadido a 1000 mL de agua).

5.6.8.3 Tinción de proteínas

Para la tinción de proteínas, la membrana de nitrocelulosa se sumergió en tinta de la India (50 µL Fount la India (Pelikan) y 500 mL de ácido acético en 50 mL de 0.05% de Tween en PBS) durante 2 h, se lavó dos veces con agua y se secó.

La tinción de la actividad α -galactosidasa se realizó como sigue: Como una solución de sustrato, se disolvieron 15 mg de 6-bromo-2-naftil- α -galactopiranosido en 10 mL de metanol y 15 mL de agua caliente, a continuación, 55 mL de agua con 5.8 g de NaCl y 20 mL de un buffer de pH 4.95 que se preparó a partir de 0.2 M de Na₂HPO₄ y se añadió ácido cítrico 0.1 M.

Después de esto, la membrana se lavó tres veces con NaCl al 1% y se incubó durante 2 minutos en una solución recién preparada de sales de diazonio (50 mg de sal Fast Red B, 50 mg de sal de Fast Blue B en 20 ml de buffer de fosfato pH 7.5 0.2 M, se ajustó el volumen a 100 ml con agua). Por último, la membrana se lavó con agua y se secó.

Para la tinción de la membrana de la lectina, i. e. para la unión de carbohidratos, se sintetizó una neoglicoproteína que contiene biotina. 680 mg de albúmina de suero bovino (10 µmol), 1.05 g de lactosa - H₂O (3 mmol) y 1 g de NaCNBH₃ (16 mmol) se disolvieron en 50 ml de 0.2 M de fosfato de potasio pH 8.0 y la mezcla se agitó durante 10 días a temperatura ambiente. Después de esto, la solución se dializó contra agua y se liofilizó. Se obtuvo neoglicoproteína (597 mg) que tenía 10 residuos de galactosa por molécula de proteína.

En un segundo paso, el neoglicoproteína se disolvió en 100 ml de carbonato de hidrógeno de sodio 0.1 M y se mezcló con 25 ml de éster biotinil 0.1 M de N-hidroxisuccinimida en dimetilformamida. Después de 1 h de agitación a temperatura ambiente, la solución se dializó primero contra PBS pH 7.2, y luego contra el agua. El rendimiento de la b-galactosil-biotinil-BSA fue de 795 mg por GOF la neoglicoproteína.

Después de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó en 0.05% de Tween 20 en PBS durante 2 h y se sumergió en una solución que contiene 50 µg/ml de la β -galactosil-biotinil-BSA en PBS que contenía 0.05% de Tween 20 durante 20 h. La membrana se lavó primero con PBS: Tween 20, a continuación, se incubaron durante 1 h en 2 µl ml⁻¹ de un conjugado de estreptavidina-peroxidasa, se lavó de nuevo en PBS/ Tween 20 y 0.05 M de Tris-HCl pH 7.4 y finalmente se incubaron durante 2 min en una solución de sustrato recién preparada: De una solución stock de 3-amino-9-etilcarbazol (1 mg/ml de acetona), 670 µl se mezclaron con 10 ml de un buffer 0.1M de acetato sódico pH 5.2, la solución se filtró y se añadió 10 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. Después de la incubación, la membrana se lavó con agua y se secó. Para determinar la actividad de fosfatasa se prepararon 30 mM de ATP, ADP, 3'AMP, 5'AMP, fructosa-1,6-bisfosfato, fructosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato y fosfoenolpiruvato en un buffer de acetato de sodio pH 6.5, suplementado con 0.1 mM de CaCl₂, MgCl₂, y ZnCl₂ cada uno.

Se hicieron varias cantidades de sustrato y (donde era aplicable) soluciones de lectina a 250 µl con el buffer de acetato de pH 6.5 y se preincubaron durante 10 minutos a 30 ° C. A continuación, se añadieron 50 µl de la enzima y la reacción se dejó proceder durante 2 a 20 minutos, dependiendo de la actividad de la enzima.

Después de esto, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de ácido tricloroacético al 17.5%. Los espacios en blanco se realizaron primero añadiendo ácido tricloroacético y después la enzima.

Se determinó el fosfato inorgánico liberado por medio de un reactivo que contiene 0.5% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 2% de ácido ascórbico y 0.6 M de H_2SO_4 en agua. Se añadieron 800 μl de reactivo de 200 μl de la muestra o de un estándar (KH_2PO_4), se incubaron durante exactamente 120 minutos a 37 ° C y la absorción se leyó a 720 nm.

5.7 Secuencias de aminoácidos

A continuación se presentan algunas secuencias de aminoácidos de lectinas de organismos cuyas propiedades han sido estudiadas que fueron comparadas con algunas de las secuencias de aminoácidos de lectinas presentes en bacidiomicetos con el fin de encontrar similitudes en su constitución y posiblemente en sus funciones. Los datos fueron obtenidos de The National Center for Biotechnology Information.

Con el número de acceso y autores se pueden buscar las secuencias en el apartado de “anexos”.

Tabla 3. Algunas secuencias de aminoácidos de lectinas presentes en el banco de datos de "The National Center for Biotechnology Information" así como sus posibles efectos.

Lectina	Acceso	Autores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Ricinus communis</i>	XM_002520451	Chan A., et al.	x	x						x	x		
<i>Canavalia ensiformis</i>	X01632	Carrington D., et al.		x	x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	AJ439715	Lioi L., et al.					x		x	x			x
<i>Pisum sativum</i>	EU825771	Zhang X., et al.										x	

Simbología	
1	Efecto inhibitorio en el crecimiento de tumores
2	Efecto inhibitorio en la inducción de cáncer
3	Hemaglutinación
4	Reconocimiento de grupos sanguíneos
5	Acción mitógena
6	Reconocimiento de estructuras glucídicas
7	Activación linfocitaria
8	Degranulación del mastocito
9	Receptores en superficies de parásitos
10	Evaluación acrosomal
11	Reducción de absorción intestinal de glucosa

Las secuencias de aminoácidos de lectinas de basidiomicetos encontradas fueron:

Agaricus bisporus

Acceso: U14936

Autores: Crenshaw R., *et al.*

Athelia rolfsii

Acceso: FJ211419

Autores: Chandrashekar T., *et al.*

Paxillus involutus

Acceso: AY585977

Autores: Le Quere A., *et al.*

Pleurotus ostreatus

Acceso: HQ606464

Autores: Chen Y., *et al.*

Pleurotus cornucopiae

Acceso: AB116253

Autores: Oguri S., *et al.*

Xerocomus chrysenteron

Acceso: AF338360

Autores: Trigueros V., *et al.*

Para hacer la comparación de las secuencias, se ocuparon los programas de la página de internet del National Center for Biotechnology Information, más específicamente el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se buscaron las secuencias deseadas mediante el número de acceso y el programa realizó la comparación con la base de datos arrojando que no hay similitud en la secuencias de dicha base tanto de aminoácidos, dominios así como de nucleótidos entre las lectinas de *Pleurotus* y los organismos que también presentan lectinas como puede observarse en las figuras 5,6,8 y 9 mientras que las lectinas de las especies *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus cornucopiae* sólo tuvieron una similitud del 60 al 72% aunque pertenecen al mismo género como puede observarse en la figura 7.

No existe actualmente un modelo tridimensional de la estructura de las lectinas del género *Pleurotus* spp. en el banco de datos del NCBI sin embargo se revisó la estructura de una hidrolasa de *Streptomyces avermitilis* que es un organismo que tuvo una similitud entre 33 a 52% con las secuencias de aminoácidos de *Pleurotus ostreatus*. En dicho modelo se marcaron los aminoácidos similares para poder observar cual sería la estructura aproximada de una lectina de *P. ostreatus*, como se puede observar en la figura 10, la estructura primaria de *P. ostreatus* abarca una buena parte del esqueleto que conforma la estructura de la hidrolasa.

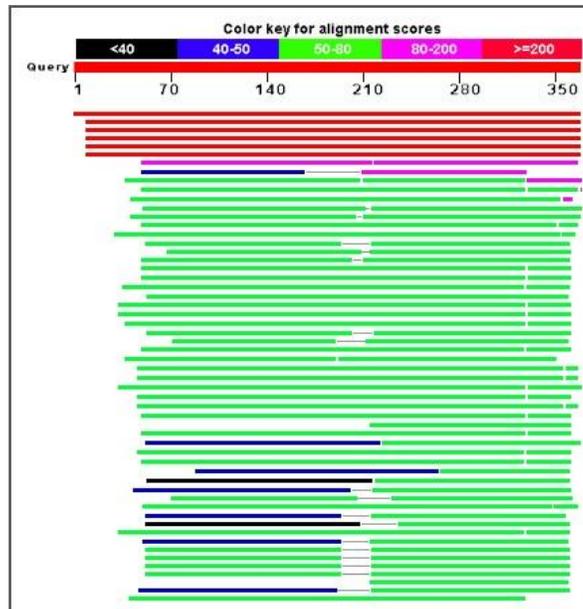


Figura 5. Gráfica de similitud entre secuencias de aminoácidos de lectinas de *Pleurotus ostreatus* y otras lectinas pertenecientes al National Center for Biotechnology Information. Un color rojizo indica que hay más de 200 aminoácidos similares (en este caso todas las secuencias en rojo pertenecen a otras secuencias de *Pleurotus ostreatus*), un color morado indica que hay entre 80 a 200 aminoácidos similares, un color verde indica una similitud entre 50 a 80 aminoácidos, un color azul indica una similitud entre 40 a 50 aminoácidos y el color negro indica hay una similaridad de menos de 40 aminoácidos.

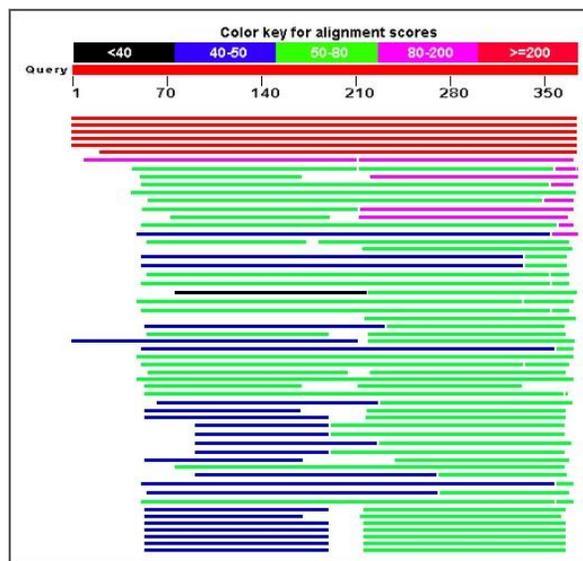


Figura 6. Gráfica de similitud entre secuencias de aminoácidos de lectinas de *Pleurotus cornicopiae* y otras lectinas pertenecientes al National Center for Biotechnology Information. Un color rojizo indica que hay más de 200 aminoácidos similares (en este caso todas las secuencias en rojo pertenecen a otras secuencias de *Pleurotus cornicopiae*), un color morado indica que hay entre 80 a 200 aminoácidos similares, un color verde indica una similitud entre 50 a 80

aminoácidos, un color azul indica una similitud entre 40 a 50 aminoácidos y el color negro indica hay una similaridad de menos de 40 aminoácidos.

Range 1: 7 to 373		GenPept	Graphics			Next Match	Previous Match
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps		
426 bits(1095)	1e-144	Compositional matrix adjust.	220/369(60%)	268/369(72%)	7/369(1%)		
Query 10	LVSLVVALVAAAAPDSQVC	----DV-DSTATCKITATPSQFQFALLNASKNIWTGENPIP			64		
Sbjct 7	FVPLITAVLIGAVPNKQ	MCGDTADVTDINFTCKGKMVPSAFEPFLNISKYIWTGENTVP			66		
Query 65	GGSNIIISRPFRRKNITAPCGKCSVCATIVVASDDAHTFYVNGVRIGTGAGFRQGGQALFVA				124		
Sbjct 67	EANNFVGTTRAFRRKNITSACGKCATCATIVVAADDSSTVYVNGVAIGSGAGWITGQVYFAP				126		
Query 125	LQPTWNLFAIAGQNLVANSFAGIMASILVHFSDDTSETFVIDESWKTILRAAPPENFQLPS				184		
Sbjct 127	LNPSSNLFAIAGVNNVAR--AALMATINIHYSDGTHETFITDESWKTIVRGAAPQGFQLPA				184		
Query 185	TNSDNWPSAAVQGAYQNSVWGPVLPVLPVPLRGSNWIWISDNVNGAAPVGSRAFRKTVNQ				244		
Sbjct 185	TSDSWTWFAMLQGFQNSFWGNPALFPVPLAQSKEWISANAATTAPAASNAFRKTIDD				244		
Query 245	CTKVAVCATVLIADDRYTLVYVNGATVSGSSSYTVADAYTIPNLHPTFNTFAINATNGGG				304		
Sbjct 245	CTKVAVCATVLIAD+Y LYVNG VSGS S+ A+AY+IP LHPT NTFAI+A N G				304		
Query 305	PAGVIATILITYSDGSNETVVIDASWKAIQTIPQGFQPLIDFEGWESAKIIGAFGVAPW				364		
Sbjct 305	PAGVIATI ITY DG+N+T+VID SWKA QT+P GFQ D+ W +A ++G +G+APW				364		
Query 365	GAGMVIPSA	373					
Sbjct 365	GSAVAIPPA	373					

Figura 7. Comparación de secuencias de aminoácidos entre lectinas de *Pleurotus ostreatus* (query) y lectinas de *Pleurotus cornicopiae* (subject), puede observarse que a pesar de pertenecer al mismo género solamente tienen una similitud del 60 (identidad) al 72% (funcionalidad).

heme-binding protein [*Pedospaera parvula*]

Sequence ID: [ref|WP_007417182.1](#) Length: 1027 Number of Matches: 2

[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 30 to 184		GenPept	Graphics			Next Match	Previous Match
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps		
77.4 bits(189)	2e-12	Compositional matrix adjust.	50/156(32%)	74/156(47%)	2/156(1%)		
Query 219	NWIWISDNVNGAAPVGSRAFRKTVNQCTKVAVCATVLIADDRYTLVYVNGATVSGSSSYT				278		
Sbjct 30	DWIWHDNKGKEPANGAIRYFRKTFNVTGKVS-NAILSAAADDEIQVFINGNMVLEGGWS				88		
Query 279	V-ADAYTIPNLHPTFNTFAINATNGGGPAGVIATILITYSDGSNETVVIDASWKAIQTIP				337		
Sbjct 89	KGSHADVTKHIHPGENLIAIRGRNVSGPAAVIAMVEMQLPKRQKQYLLTDKSWLSSDTGV				148		
Query 338	QGFQPLIDFEGWESAKIIGAFGVAPWAGMVIPSA	373					
Sbjct 149	DNWYTTNYNDSNWKPVSLGKLVQVQVWGDVLSLPKA	184					

Figura 8. Comparación de secuencias de aminoácidos entre lectinas de *Pleurotus ostreatus* (query) y lectinas de *Pedospaera parvula* (subject) que fue el organismo más cercano a la lectina de *Pleurotus ostreatus* en cuanto a su composición resultando en una similitud entre 32 (identidad) a 47% (funcionalidad).

Planctomycete cytochrome C [Pedosphaera parvula]

Sequence ID: [ref|WP_007415673.1](#) Length: 817 Number of Matches: 2

► [See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 532 to 683		GenPept	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
70.5 bits(171)	4e-10	Compositional matrix adjust.	47/153(31%)	75/153(49%)	7/153(4%)
Query	218	SKWIWTSANAATTAPAASNAFRKTIIDDCTKVAVCATVLISADNHYKLYVNGQAVGSGDSF			277
		+KWIWT A AA A +N FRK + A +I+ADN + L+VNG+ G+G +			
Sbjct	532	AKWIWTEATAAQAAKPGTNYFRKVV-VLDGEPTSAMGVITADNSFTLFVNGKKAGAGKKY			590
Query	278	GRAEAYSIPK-LHPTLNTFAIDAKND---EGPAGVIATIHITYRDGTNQTIV--TDGSWK			331
		+ + K L N A+ A ND PAG+ ++ + + ++ + ID SW			
Sbjct	591	DELQVVDLRKHLVKGITNYIAVSAVNDGDKPNPAGLFLYAYVRFNGKASKVMDFGTDKSWV			650
Query	332	ASQIVPNGFQETFFDDSDWVAATVVGNYGIAPW			364
		S + + F+ ++W AA +G G+ PW			
Sbjct	651	WSGNKEKNWDKPKFNGANWSAAAELGAIGLGPW			683

Figura 9. Comparación de secuencias de aminoácidos entre lectinas de *Pleurotus cornicopiae* (query) y lectinas de *Pedosphaera parvula* (subject) que fue el organismo más cercano a la lectina de *Pleurotus cornicopiae* en cuanto a su composición resultando en una similitud entre 31 (identidad) a 49% (funcionalidad).

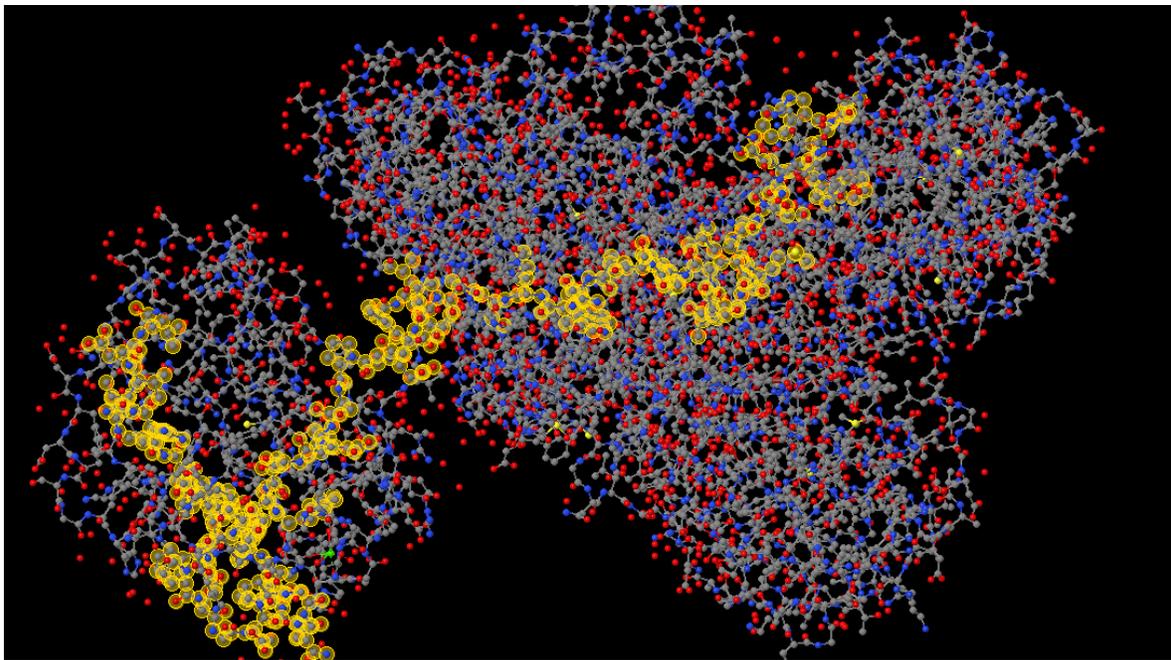


Figura 10. Estructura de una cadena A de una hidrolasa de *Streptomyces avermitilis*. La estructura resaltada en amarillo son los aminoácidos que resultaron ser similares a los de la lectina de *Pleurotus ostreatus*.

Khan y Khan en 2011 hicieron una comparación de secuencias de aminoácidos de lectinas de *Xerocomus chrysenteron*, *Paxillus involutus*, *Agaricus bisporus* y *Athelia rolfsii* determinando que son bastante similares entre si, sin embargo en su publicación omitieron bastantes detalles por lo que en el presente trabajo, se volvieron a hacer las comparaciones en la base de datos del National Center for Biotechnology Information tratando de encontrar alguna relación con los organismos mencionados en este trabajo así como con el género *Pleurotus* spp. Una vez realizadas las comparaciones se encontró que a diferencia de las secuencias de lectinas de *Pleurotus* hay bastantes organismos similares, en el caso de *Xerocomus chrysenteron* y *Paxillus involutus* ambos fueron entre si los organismos más similares como puede apreciarse en la figura 11 con una similitud de entre 66 a 82% mientras que *Agaricus bisporus* y *Athelia rolfsii* son similares entre si con una similitud entre 64 a 75% como puede apreciarse en la figura 12. Sin embargo no tuvieron similitud con las secuencias de aminoácidos de lectinas del género *Pleurotus* spp.

lectin [Paxillus involutus]

Sequence ID: [gb|AAT91249.1](#) Length: 143 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 140 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
201 bits(512)	2e-63	Compositional matrix adjust.	93/140(66%)	115/140(82%)	0/140(0%)
Query 1	MSYSITLRVYQINRDRGYFSIVEKTVWHFANGGTWSEANGAHLTQGGSGTSGVLRFLST				60
Sbjct 1	MSYSI LR++Q N G+FSIVE TVW++ANGGTWS+A+G ILT GGSGTSG LRF+S				60
Query 61	KGERITVAVGVHNYKRWCDDVVTGLKPDOTALVINPQYNNNGGRDYVREKQLAEYSVTSAI				120
Sbjct 61	GER+ VA+GVHNYKRWCDD+ TGL P+ T +V+N +YYN+G R Y+REKQL++YSVTS				120
Query 121	GTKVEVVYTVAEGNNEANV		140		
Sbjct 121	GTKV + YTV+GN LEA+V		140		

Figura 11. Comparación de secuencias de aminoácidos entre lectinas de *Xerocomus chrysenteron* (query) y lectinas de *Paxillus involutus* (subject) resultando en una similitud entre 66 (identidad) y 82% (funcionalidad).

Chain A, The Crystal Structure Of Sclerotium Rolfsii Lectin

Sequence ID: [pdb|2OFC|A](#) Length: 142 Number of Matches: 1

▶ [See 5 more title\(s\)](#)

Range 1: 2 to 132 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
179 bits(453)	2e-54	Compositional matrix adjust.	85/132(64%)	100/132(75%)	1/132(0%)
Query 2	TYTISIRVYQITPKGFFRPFVERTINWKYANGGTWDEV RGEYVLT MGGSGTSGSLRFVSSDT				61
Sbjct 2	TY I++RVYQT P FF PVE+T WKYANGGTW ++VLT MGGSGTSG+LRF +D				60
Query 62	DEIFVATFGVHNYKRWC DIVTNLTNEQTALVINQEYYGVPIRDQARENQLTSYNVANAKG				121
Sbjct 61	E F ATFGVHNYKRWC DIVTNL ++T +VINQ+YY R++ARE QL++Y V NAKG				120
Query 122	RRFAIEYTVTEG	133			
	R F I Y T EG				
Sbjct 121	RNFEIVYTEAEG	132			

Figura 12. Comparación de secuencias de aminoácidos entre lectinas de *Agaricus bisporus* (query) y lectinas de *Athelia rolfsii* (subject) resultando en una similitud entre 64 (identidad) y 75% (funcionalidad).

6. ANÁLISIS DE DATOS Y DISCUSIÓN

Clasificación

La clasificación de los organismos siempre ha sido una actividad importante en todas las culturas, lo cual se ve reflejado en la enorme riqueza de términos botánicos y zoológicos existentes y en los vocabularios encontrados de los diferentes dialectos y lenguajes. Desde que el primer estudio sobre lectinas fue reportado por Stillmark en 1888 en extractos de semilla de *Ricinus communis*, se han postulado diversas clasificaciones.

La mayoría de las lectinas que han sido estudiadas son de origen vegetal, ubicadas principalmente en los cotiledones y endospermos de las semillas, mientras que una mínima parte se han encontrado en animales invertebrados (en la hemolinfa y órganos sexuales) y en el veneno de algunos vertebrados como es el caso de las serpientes *Bothrops jararacá*, *Bitis arietans*, *Lachesis muta*, entre otras.

Recientemente, el reino Fungi comenzó a tener auge en las investigaciones acerca de lectinas siendo así que en varios Basidiomicetos (incluyendo al género *Pleurotus* spp.) se han encontrado diversas lectinas como lo son la AAL y la ABA.

En tabla 1 puede observarse claramente un ejemplo de la distribución de las lectinas según su origen, aunque dicha tabla abarca únicamente a las citadas en el presente trabajo se puede ver una dominancia de las lectinas vegetales seguidas por las lectinas fúngicas.

En 1995 Peumans y Van Damme propusieron una de las clasificaciones más completas, ya que hasta ese momento las lectinas no eran tan estudiadas como otras estructuras, basándose en sus propiedades estructurales que en este caso fueron los dominios de unión creándose entonces las Merolectinas (con un único dominio de carbohidratos), las Hololectinas (lectinas con dos o más dominios de unión a carbohidratos) y las Quimerolectinas (lectinas que contienen un dominio de unión a carbohidratos y un dominio con actividad catalítica u otra actividad biológica). Ésta categorización fue tomada en cuenta un año después por Sharon quien propuso una clasificación similar basada en las propiedades moleculares sin embargo con la adición de que tomó en cuenta su origen formando unas de las primeras familias de lectinas que consistían en lectinas de origen animal, de leguminosas y de cereales.

En 1996 Weis y Drickamer proponen una clasificación más específica al tomar en cuenta únicamente los receptores que presentaban las lectinas.

En el 2005 Hernández regresa a clasificar a las lectinas según su estructura molecular debido a la gran cantidad de datos cristalográficos de lectinas vegetales, la cual tiende a reemplazar a la clasificación basada en la especificidad y en la cual podemos distinguir seis familias de lectinas: lectinas aisladas de leguminosas, lectinas con dominios tipo heveína o específicas de quitina, lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa, lectinas en forma de prisma β o del tipo jacalina, lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas y las lectinas tipo amaranto.

Cabe mencionar que Kolberg en 1981 reporta una clasificación en donde menciona lectinas compuestas de un solo tipo de cadena polipeptídica en donde no describe dichos compuestos.

Se puede notar que actualmente no hay una clasificación única para agrupar a las lectinas, sin embargo los criterios que prevalecieron hasta ahora fueron las estructuras moleculares, la especificidad de los receptores y el origen de la lectina.

Usos de las lectinas

El haber clasificado a las lectinas apoyó el estudio de las mismas, con lo que es posible dar a conocer sus diversos usos pero que hasta la fecha están lejos de concluirse.

Uno de estos usos (y también uno de los más importantes) está en el campo de las respuestas inmunitarias ya que las lectinas pueden desencadenar una activación linfocitaria. Al realizar una función mitogénica (es decir que estimulan la división celular) algunas lectinas permitieron dar un gran salto en el estudio de la respuesta inmune así como los estudios relacionados con cromosomas e incluso se piensa que podrían servir de vacunas en un futuro como lo plantea Luther en 1978. Se piensa que además, gracias a éstas reacciones, las lectinas podrían utilizarse para estudiar cómo los receptores de la membrana celular transmiten mensajes tal y como lo postula Berridge en 1985.

Gracias a ésta función mitogénica las lectinas pueden usarse para evaluar la producción de citocinas como el interferón e interleucinas, determinar fenómenos de la respuesta inmune (inmunosupresión), evaluar la relación que existen entre virus patógenos y su resistencia a ellos, evaluar terapias antirretrovirales, investigar los efectos citotóxicos de algunas drogas en células mononucleares, estudiar los efectos de la nutrición en la proliferación de linfocitos así como tratar de inducir genes en los mismos y detectar anomalías cromosómicas, entre otras aplicaciones.

Mientras tanto en las células madre de la médula ósea se ha observado que tanto la PHA (*Phaseolus vulgaris*) como la concanavalina-A y la lectina de *Ricinus communis* pueden estimular también la degranulación del mastocito. Por el contrario la degranulación es inhibida por las lectinas del *Ulex europaeus* y de *Sophora japonica* según Hook en 1974, quien también reporta que bajo ciertas circunstancias las lectinas que producen degranulación, la inhiben. Freed en 1982 menciona que algunas lectinas como concanavalina-A desatan la liberación de histamina y podrían usarse medicinalmente en enfermedades como la fibrosis quística o mucoviscidosis. Según éste autor la causa primaria no es conocida pero tiene efectos altamente perjudiciales. El mucus no puede ser eliminado de las membranas del tracto respiratorio, se producen bloqueos en los tubos y sobrevienen infecciones. La infección incentiva la producción de mucus y el fenómeno se recicla. La inhalación o ingestión de concanavalina-A podría ayudar a la expulsión de mucus, ya que el plasma exudado por sus efectos alérgicos disminuiría la viscosidad del mismo. Al ser una respuesta inmune habría que tener especial cuidado con los niños que son los principales casos de mucoviscidosis.

En un campo diferente pero igual de práctico encontramos que las lectinas pueden utilizarse para estudiar cambios en la superficie de parásitos que pueden estar relacionados con la adhesión y penetración celular, así como para diferenciar distintas especies y estadios del mismo como lo menciona Katzin en 1979. El parásito compete por el consumo de las sustancias alimentarias que ingiere el huésped, se ha especulado que la vía de las lectinas puede tener una consecuencia fisiológica en la interacción helminto-hospedero ya que la deposición del complemento en la superficie, puede activar este sistema por la vía de las lectinas y puede conducir a la activación de células efectoras a través de los receptores de colestina, o mediar en la inflamación de los tejidos tal como lo menciona Klabunde *et al.* en el 2000. Esto podría suponer un avance significativo en el desarrollo de sustancias que ayuden a eliminar parásitos no sólo en humanos sino también en otros animales y posiblemente plantas y otros organismos, hay que tomar en cuenta que dada la toxicidad de varias lectinas aún no es posible decir con exactitud hasta cuándo será factible este tipo de tratamientos (en el caso de que sea posible).

Inclinándose a un enfoque médico un estudio importante es con respecto al sistema nervioso, existen anticuerpos en sangre circulante que posiblemente posean actividad tóxica con respecto al

sistema nervioso central ya sea destruyéndolo, desmielinizándolo o bloqueando procesos fisiológicos vinculados a la transmisión del flujo nervioso. Los linfocitos de la sangre parecen tener efectos citotóxicos frente a las células nerviosas expone Nagasawa en 1977. Sin embargo no se pudieron encontrar trabajos similares recientes y Nagasawa parece haber tomado otra rama de investigación por lo que el trabajo de lectinas en sistema nervioso queda trunco.

Dentro en las aplicaciones farmacológicas y médicas de las lectinas también hay que destacar su cualidad anticoagulante. Las CTLLP o lectinas de tipo C son moléculas con actividades coagulantes y anticoagulantes, que se unen a factores de la coagulación y a receptores de la membrana celular de las plaquetas de las que también son moduladoras las CTLLP podrían servir para dilucidar los mecanismos involucrados en la coagulación y la activación plaquetaria, así como en la producción de nuevas moléculas útiles en el diagnóstico y tratamiento de algunos trastornos de la hemostasia, por su capacidad de interactuar con las plaquetas como lo mencionan Pereáñez y Vargas en el 2009. Estas investigaciones sobre el efecto de las lectinas en la coagulación son llevadas a cabo en su mayoría en veneno de serpientes.

En 1960 Jaffe sugiere que la ingestión de lectinas podría ser utilizada en casos de obesidad, hasta esa fecha solamente se había utilizado como tratamiento en algunos animales, no obstante, Jenkins en 1980 propone el uso de lectinas en humanos en casos de diabetes insulina dependientes, los pacientes llevaban una dieta adecuada de leguminosas que permitió eliminar el uso de la hormona, sin embargo, se hablaba únicamente de una dieta y no de una administración de la lectina purificada como tal.

Cuando hablamos de investigación en lectinas un tema crucial es la investigación en la diferenciación de células malignas así como la ya mencionada actividad mitogénica, ya que se podrían prevenir tumores malignos y por consiguiente sería un gran avance en el desarrollo de tratamientos contra el cáncer, no obstante, uno de los principales problemas es la alta toxicidad proveniente de las lectinas y hasta la fecha los estudios de los efectos antitumorales en humanos siguen realizándose. Reismer en 1983 recomienda el uso de lectinas para remover células malignas antes del trasplante de médula ósea en pacientes que sufren de neuroblastoma o leucemia. Este mismo autor ha empleado lectinas para eliminar timocitos inmaduros presentes en la médula ósea del dador y que intervienen activamente en los casos de reacción injerto contra el huésped, en dichos trasplantes. Se ha afirmado también que la extraordinaria resistencia de las lectinas a la acción de enzimas proteolíticas las convertirían en un elemento terapéutico de elección para el tratamiento de tumores del tracto gastrointestinal.

De la misma manera varios autores han comenzado a indagar acerca del uso terapéutico de lectinas como lo menciona Mazumder en 1984 con la lectina PHA que aún se encuentra también en fase experimental para estimular el desarrollo in vitro de linfocitos T citotóxicos frente a tumores, que luego son reinyectados en pacientes en los cuales ha fracasado toda otra terapia.

Por último y yéndonos un poco al futuro, podemos ver a las lectinas siendo utilizadas como tratamiento de infertilidad, hoy en día ya son utilizadas para este fin en ganado. Gracias a su exquisita selectividad para unirse a determinadas secuencias oligosacáridicas las lectinas son unas moléculas que pueden ser de gran utilidad para darnos una mayor información acerca de los receptores espermáticos que intervienen en la fecundación especialmente en el acrosoma que es donde se presentan los problemas de fecundación tal y como lo mencionan Mortimer y colaboradores en 1990.

Algunas lectinas aún no han sido lo suficientemente estudiadas o al menos no se encontraron reportes para este trabajo como lo demuestra la tabla 2 por lo que sus usos aún están pendientes por definir.

Purificación

Aunque las lectinas se comenzaron a estudiar en 1888 no fue hasta 1936 que Summer y Howell pudieron cristalizar a la concaivalina A siendo las primeras personas en purificar una lectina sin embargo no pudieron eliminar completamente los carbohidratos contaminantes y desde entonces diversas variedades de métodos han surgido para este fin.

Actualmente las lectinas se pueden purificar con una pureza verificable por métodos fisicoquímicos e inmunoquímicos. Tal y como lo menciona el presente trabajo, el aislamiento de una lectina comienza con una extracción con solución salina (o buffer) del material de la cual se obtiene. A veces se emplea una extracción previa con un solvente orgánico (metanol o éter etílico) para remover los lípidos.

El fraccionamiento con sulfato de amonio, posterior centrifugación y redisolución del precipitado brinda un líquido que contiene lectinas. Actualmente los esquemas de purificación de lectinas emplean la cromatografía de afinidad que aprovecha la capacidad de unirse a azúcares (más o menos específicamente) de la lectina. Básicamente un carbohidrato (con el cual la lectina actúa) es insolubilizado uniéndolo a Sephadex, Sepharosa, etc.

Luego se pone en contacto con el extracto a purificar. La lectina se fijará y podrá ser posteriormente eluída. Esta elución se puede hacer con un azúcar que compite por la lectina con el carbohidrato insolubilizado o alterando las condiciones en las cuales la lectina se halla fijada como lo menciona Micucci en 1987.

Sin embargo no sólo la cromatografía es utilizada para purificación de lectinas, la electroforesis ha sido usada con resultados bastantes confiables como lo hicieron Nanne y Aragón en 1991, con el objetivo de purificar una lectina de la planta *Erythrina costaricensis* cuyo método fue una electroforesis en gel de acrilamida.

En 1999 Chattopadhyay *et al.* purificaron una lectina de *Pleurotus ostreatus* mediante una cromatografía líquida de alta eficacia mientras que en el año 2000 los siguientes autores reportan purificaciones: Ganem y Martin en *Canavalia ensiformis*, Hexiang *et al.* en *Pleurotus ostreatus* y Kawagishi *et al.* también en *Pleurotus ostreatus*. Todos ellos utilizaron cromatografía para la purificación.

Si bien es verdad que la técnica mayormente usada es la cromatografía, también es cierto que distintos autores han manejado variables de ella como es el caso de Khan y Khan en 2011 que utilizaron una cromatografía de afinidad para purificar lectinas de *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus fumigatus* y de Salgado y Valadez en 2006 que ocuparon la misma técnica para purificar lectinas de semillas de amaranto mientras que Blasco en 2004 utilizó la cromatografía de exclusión molecular para purificar lectinas de *Caesalpinia spinosa*.

Otra variedad de cromatografía es la de intercambio iónico y algunos autores que reportan haberla ocupado son Palomina *et al.* en 2012 en lectinas de veneno de *Lachesis muta* y Zhang *et al.* que la utilizó tanto en *Pholiota adiposa* así como en *Pleurotus ostreatus*. Este último autor utilizó exactamente el mismo método en ambos organismos mostrándonos que aunque experimentemos en distintos organismos podemos tratarlos hasta cierto punto de la misma manera.

Ensayos

Para evaluar cualitativamente o cuantitativamente la medición de la presencia o la cantidad o la actividad funcional de una entidad de destino, que puede ser un fármaco o sustancia bioquímica o una célula en un organismo o muestra orgánica, se procede con un ensayo. Una vez aislada la

lectina hay que aplicarle pruebas para evaluar sus distintas actividades y así una vez estudiada asignarle un posible uso.

El ensayo más frecuente en estudios sobre lectinas es el de hemoaglutinación como se puede observar los trabajos de Blasco en 2004, Zhang *et al.* en 2009, Torres en 2010 y Palomina en 2012. De hecho hoy en día el efecto hemoaglutinante de las lectinas es uno de los aspectos mejor estudiados de las mismas. Sin embargo dependiendo del tema a tratar, los diversos autores han realizado numerosas pruebas como es el caso de Blasco en 2004 que al trabajar con lectinas de *Caesalpinia spinosa* evaluó su afinidad por carbohidratos o en un enfoque más médico tenemos a Zhao *et al.* quienes evaluaron la actividad antitumoral de una lectina de *Agrocybe aegerita*.

Algunos estudios aún no han dado los resultados deseados sin embargo en un futuro cercano podrían ser clave en el desarrollo de tratamientos y medicamentos, como ejemplo tenemos a los ensayos de Zhang *et al.* quienes han evaluado el efecto inhibitorio de las lectinas de *Pholiota adiposa* y de *Pleurotus ostreatus* sobre la transcriptasa inversa VIH-1.

Además de los ensayos ya mencionados también se han realizado pruebas de estabilidad al pH, del efecto de cationes metálicos, de contenido de carbohidratos, de propiedades fluorométricas, entre otras.

Secuencias de aminoácidos y nucleótidos

Uno de los objetivos del presente trabajo fue comparar las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de algunas lectinas ya estudiadas con secuencias de lectinas de *Pleurotus spp.* Sin embargo al consultar la base de datos del "The National Center for Biotechnology Information" se encontró que las lectinas de *Pleurotus spp.* han sido poco estudiadas (solamente hay información de lectinas de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus cornucopiae*) y éstas lectinas no guardan relación alguna con las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de lectinas de organismos como *Agrocybe aegerita*, *Caesalpinia spinosa*, *Phaseolus folius*, entre otros mencionados previamente en este trabajo como se puede observar en las figuras 5,6,7 y 8. Inclusive entre las secuencias de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus cornucopiae* se encontró una baja similitud aún cuando se trata de organismos del mismo género (del 60 al 72%).

Además se realizó una comparación de dominios, sin embargo, la similitud no fue significativa y al ser el organismo más cercano un ejemplar del género *Drosophila* se determina que la similitud fue coincidencia.

Las lectinas del género *Pleurotus spp.* no cuentan con un modelo tridimensional de su estructura y por ello se tuvo que tomar una estructura similar que fue la de *Streptomyces avermitilis*, marcando los aminoácidos puede observarse una proximidad del tamaño y estructura de una lectina del género *Pleurotus spp.* Sin embargo, sería recomendable proponer un modelo propio de las secuencias de aminoácidos de las lectinas de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus cornucopiae* así como de las futuras lectinas reportadas.

Esto no significa que los organismos del género *Pleurotus spp.* estén totalmente aislados de los demás organismos en los que se han encontrado presencia de lectinas, por el contrario, la falta de información nos demuestra que al tema de las lectinas en *Pleurotus spp.* aún le falta mucho por averiguar y es un campo abierto para la investigación.

7. CONCLUSIONES

-Existen distintos tipos de clasificaciones de lectinas según el tema a tratar y la época en que se han propuesto, hoy en día aún siguen surgiendo propuestas que se van actualizando con las investigaciones efectuadas y por realizar. La clasificación de Weis y Drickamer es una de las más utilizadas actualmente (en especial las lectinas de tipo C) sin embargo para la presente investigación tomó mayor importancia la clasificación por enlaces propuesta por la empresa Fluoprobes.

- Las lectinas han sido utilizadas en diversos campos de la investigación como en estudios de activación linfocitaria, estudios de hemoaglutinación, diferenciación de células malignas, en estudios de receptores en parásitos y en purificación de glicoconjugados y por lo tanto aplicadas al campo médico en tratamientos de sistema nervioso, como anticoagulantes, en tratamientos del sistema inmune, como tratamiento de obesidad y diabetes, tratamiento de tumores y en un futuro posiblemente como tratamiento de cáncer, VIH y de fertilidad.

- Las lectinas que han sido más estudiadas son las vegetales mientras que las lectinas fúngicas comienzan a tomar importancia, sin embargo aún no es un campo muy explotado en la investigación.

- Las técnicas más utilizadas para la purificación de lectinas son las variedades de cromatografías, específicamente para purificar lectinas fúngicas se utiliza cromatografía de exclusión molecular. También se ha reportado el uso de electroforesis.

- Sólo se encontraron 9 secuencias de aminoácidos de *P. cornicopiae* y una de *P. ostreatus* en la base de datos "The National Center for Biotechnology Information", además de que dichas lectinas no guardan similitud con secuencias de diversos organismos ya estudiados.

- Se han reportado lectinas tanto en *P. ostreatus* como en *P. cornucopiae* cuyos nombres no han sido asignados. No se encontraron secuencias de las especies *P. djamor* y *P. pulmonarius* en la base de datos "The National Center for Biotechnology Information".

8. RECOMENDACIONES

- Estudiar a fondo el tema de la toxicidad de las lectinas ya que es uno de los principales obstáculos en la investigación de tratamientos y medicamentos.
- Seguir con la línea de investigación del efecto de las inmunoglobulinas en la esclerosis múltiple ya que ha quedado trunca desde que Nagasawa publicó su artículo en 1977.
- Darle una mayor importancia a las lectinas fúngicas ya que han sido menos estudiadas que las lectinas vegetales.
- Estandarizar una técnica de purificación específica para lectinas fúngicas.
- Estudiar y establecer las secuencias de aminoácidos de lectinas fúngicas así como crear modelos de estructura cristalizada, específicamente del género *Pleurotus spp.*
- Poner énfasis en la investigación sobre el efecto de las lectinas en tumores, cáncer y VIH.
- Realizar pruebas en humanos del efecto de las lectinas en el acrosoma para estudios de fertilidad.
- Efectuar pruebas acerca del efecto del sustrato del hongo en el desarrollo de lectinas del género *Pleurotus spp.*

9. LITERATURA CITADA

Albert M., June H., Anthony H., Jia- Hau L. 2003. Effect of polyvalencies of glycotopes on the binding of a lectin from the edible mushroom, *Agaricus bisporus*. *Biochem* 371: 311-320

Anaya A. (2008). Análisis de viabilidad económica de un producto derivado de la seta *Pleurotus pulmonarius*. Universidad de Puerto Rico. Mayaguez (Puerto Rico). 123 páginas.

Aub J. 1863. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, Sf. *Journal of Food Protection*. 53(10):883-894

Baluna R., Sausville A., Stone M., Steter-Stevenson M., Uhr J., Vitetta S. 1996. Decrease in levels of serum fibronectin predict the severity of vascular leak syndrome in patients treated with ricin A chain-containing immunotoxins. *Clin Cancer Res* 2(10): 1705-1712

Barker S. 1974. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, Sf. *Journal of Food Protection*. 53(10):883-894

Barondes S. 1984. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, Sf. *Journal of Food Protection*. 53(10):883-894

Baveja U., Basack S., Thusoo T. 1995. A study of immune profile in human hydatid diseases. *J Commun Disc* 27(2):61-66

Berridge M. 1985. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, Sf. *Journal of Food Protection*. 53(10):883-894

Blasco E. 2004. Lectinas de *Sambucus palmensis* y *Euphorbia handiense*, Aislamiento y preparación como marcadores en tumores gástricos. Instituto canario de investigación del cáncer.

Bohinski C.(1991).Bioquímica. 5ta edición. Addison-Wesley Iberoamericana. Delaware, (USA).

Born J., Uthgenannt D., Dodt C., Nunnighoff D., Ringvol E. 1995. Cytokine production and lymphocyte subpopulation in aged humans. An assessment during nocturnal sleep. *Mech Ageing Dev* 84(2):113-126

Brechtel R., Watzig H., Rudiger H. 2001. The lectin from the mushroom *Pleurotus ostreatus*: a phosphatase-activating protein that is closely associated with an α -galactosidase activity. *Plant Science* 160: 1025-1033

Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, Sf. *Journal of Food Protection*. 53(10):883-894

Cardona L. y Bedoya A. 1996. Producción de orellanas (*Pleurotus ostreatus*), deshidratadas y condimentadas. Trabajo de grado de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias.

- Caron M. 1985. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, St. Paul. Journal of Food Protection. 53(10):883-894
- Casellas P. 1982. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, St. Paul. Journal of Food Protection. 53(10):883-894
- Casseb J., Bernard G., Saito R., Brigido L., Joaquim E., Duarte A. 1995. The value of the lymphocyte proliferation test with phytohemagglutinin in the immune evaluation of Brazilian HIV-infected patients. J Invest Allergy Clin Immunol 5(6):347-349
- Castillo- Villanueva A., Abdullaev F. 2005. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. Revista de investigación clínica 57 (1): 55- 64
- Chattopadhyay T., Lisgarten J., Rudiger H., Palmer R. 1999. Crystallization of *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) lectin. Acta Cryst. 55: 1589-1590
- Cheema A. 1972. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, St. Paul. Journal of Food Protection. 53(10):883-894
- Chet I., Benhamou S. 1998. Mycoparasitism and lectin enzymes. Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications. Harman GE, Kubicek 2: 153-152
- Diwakar B., Munjal R. y Bahukhandi D. 1989. Cultivation of *Pleurotus* species on different agricultural residues. Indian-Phytopathology 42(4):492-495
- Fluoprobes. 2012. Lectins. Interchim. <http://www.interchim.fr/ft/M/MS902z.pdf> (consultada el 15/08/2013)
- Freed D. 1982. Lectins. Biology, biochemistry 2: 33-45
- Ganem F. y Martín O. 2000. Lectina concanavalina A: obtención y purificación. Laboratorios Beterá.
- Ganeshpurkar A., Rai G. y Jain A. 2010. Las Setas Medicinales Producen Efectos Beneficiosos en el Ser Humano. Pharmacognosy Reviews 4(8):127-135
- Gbolagade J., Kigigha L. y Ohimain E. 2007. Antagonistic effect of extracts of some Nigerian higher fungi against selected pathogenic microorganisms. J. Agric y Environ. Sci. 2(4):364-368
- Gregori A., Suagelj M. y Pohleven J. 2007. Cultivation Techniques and Medicinal Properties of *Pleurotus* spp. Food Technol. Biotechnol. 45(3): 236-247
- Goodman A. 1986. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Panamericana. México.
- Guzmán G. 1993. El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales. Instituto Politécnico Nacional.

Hernández P. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-Carbohidrato. REB 24(1): 21- 27

Hernández P., Martín O., Rodríguez Y., Ganem F. 1999. Aplicaciones de las lectinas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 15 (2): 91-95

Hexiang W., Jiquan G., Ng T. 2000. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the Oyster Mushroom *Pleurotus ostreatus*. Biochemical and biophysical research communications 275: 810- 816

Hook W. 1974. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, St. Paul. Journal of Food Protection. 53(10):883-894

Hynes R. 1986. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, St. Paul. Journal of Food Protection. 53(10):883-894

Inbar M., Sachs L. 1969. The formation of variants with a reversion of properties of transformed cells. Reversion of the structure of the cell surface membrane. Int J Cancer 4(5):690-696

Jaffe W. 1960. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, St. Paul. Journal of Food Protection. 53(10):883-894

Jenkins D. 1980. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, St. Paul. Journal of Food Protection. 53(10):883-894

Katzin A. 1979. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, St. Paul. Journal of Food Protection. 53(10):883-894

Kawagishi H., Suzuki H., Watanabe H., Nakamura H. 2000. A lectin from an edible mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake-suppressing substance. Biochimica et Biophysica Acta 1474: 299-308

Khan F., Khan I. 2011. Fungal lectins: current Molecular and Biochemical Perspectives. International Journal of Biological Chemistry 5 (1): 1-20

Klabunde J., Berger J., Jensenius J., Klinkert M., Zelck U., Kreamsner PG. 2000. Shistosoma mansoni: adhesion of mannan binding lectin to surface glycoprotein of cercariae and adult worms. Exp Parasitol 95(4):281-9

Kolberg J. 1981. Lectins. Biology, biochemistry 1: 111- 117

Lahfa F., Dahmani Y., Trouthaud D., Deshaux D. 1995. Nutritional influences on in vitro splenic lymphocyte proliferation in *Psammomys obesus* (Rodentia gerbilliadae). Cell Mol Biol Res 41(5):387-390

Lebrec H., Rober R., Blot C., Burslesun G., Buhon, Pallardy M. 1995. Immunotoxicological investigation using pharmaceutical drugs. In vitro evaluation of immune effects using rodent or human immune cells. Toxicology 96(2):147-156

Lis H. 1973. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, St. Paul. Journal of Food Protection. 53(10):883-894

Luther P. 1977. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, St. Paul. Journal of Food Protection. 53(10):883-894

Luther P. 1978. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, St. Paul. Journal of Food Protection. 53(10):883-894

Martínez-Carrera D. (2006). México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Biotecnología de Hongos Comestibles. ECOSUR-CONACYT. Ciudad de México.

Mazumder A. 1984. Phase I Study of the Adoptive Immunotherapy of Human Cancer with Lectin Activated Autologous Mononuclear Cells. Cancer 53: 896- 905

Miccuci H., Camps H. 1987. Lectinas: Obtención, Estructura Química, Propiedades y Aplicaciones Diagnósticas y Farmacológicas. Acta Farm. Bonaerense 6 (1):35-57

Montoya U., Ten J., Mendiola J., Guerrero J., Bernabeu R. 2008. Utilidad de las lectinas en el estudio de espermatozoides. Fertilidad 25 (4): 257- 266

Mortimer D., Curtis E., Camenzind A. 1990. Combined use of fluorescence peanut agglutinin lectin and Hoechst 33258 to monitor the acrosomal status and vitality of human spermatozoa. Hum Reprod. 5(1): 99-103

Nagasawa K. 1977. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, St. Paul. Journal of Food Protection. 53(10):883-894

Nanne C. y Aragón F. 1991. Aislamiento, purificación y caracterización de una lectina de la semilla del poró, *Erythrina costaricensis*. Rev. Biol. Trop. 39 (1): 15- 21

Nicolson G. 1974. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minnesota, St. Paul. Journal of Food Protection. 53(10):883-894

Padilla-Doca B., Dorta-Contreras A., Bu-Coifui-Fanego R., Callol-Barroso J. 2009. Rol de la lectina de unión a Manosa en infecciones parasitarias. Rev Panam Infectol 11 (3): 45- 48

Palomina M., Lazo F., Delgadillo J., Severino R., Yarlequé A. 2012. Purificación de una lectina tipo C del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. Rev Soc Quim Perú 78 (3): 161- 169

Pereáñez J., Vargas L. 2009. Toxinas de serpientes con alto potencial terapéutico y su uso en la biomedicina. IATREIA 22 (4): 382-391

Pérez M. (1999). Identificación de lectinas en frutas medicinales, su participación en la Hemaglutinación de la cepa *E. coli* enterohemorrágica 0157: H7. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Lima. Perú.

Pérez N. 2004. Manejo Ecológico de plagas. CEDAR: La Habana. 296 pp

Pernthaner A., Stankiewicz M., Bisset S., Jonas W., Cabaj W., Piulford H. 1995 The immune responsiveness of Romney sheep selected for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes. Lymphocyte blastogenic activity, eosinophilia and total white blood cell counts. *Int J Parasitol* 25(4):523-529

Rampinelli J., Silveira M., Gern R., Furlan S., Ninow J. y Wisbeck E. 2010. Valor nutricional de *Pleurotus djamor* cultivado en palma de platano. *Brazilian Journal of Food and Nutrition* 21 (2). 197 p.

Reisner Y. 1983. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minesota, Sf. Paul. *Journal of Food Protección.* 53(10):883-894

Sachs L. 1986. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minesota, Sf. Paul. *Journal of Food Protección.* 53(10):883-894

Salgado J. y Valadez M. 2006. Purificación y caracterización de lectinas de semillas de amaranto cultivado en el estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de la Salud.

Schwarz H, Valbracht J, Tuckwell J, Kempis J, Kotz M. 1995. ILA, the human 4-IBB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lines. *Cancer Lett* 107(2):285-291

Seguru O., Akikazu A., Yoshiho N. 1996. A Novel Developmental Stage- Specific Lectin of the Basidiomycete *Pleurotus cornucopiae*. *Journal of Bacteriology* 178 (19): 5692- 5698

Sharon, N. 1977. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minesota, Sf. Paul. *Journal of Food Protección.* 53(10):883-894

Stiles D. (1986). *Inmunología básica y clínica*. Ed. El manual moderno.

Suay I., Arenal F., Asencio F., Basilio A., Cabello M., Díez M., García J., González A., Gorrochategui J., Hernandez P., Peláez F. y Vicente F. 2000. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Khnwer academic Publishers Antonie van Leeuwenhoek.* 78: 129-139

Tomasseti P., Cometa G., Del Vecchio E., Baserga M. 1995. Chromosomal instability in multiple endocrine neoplasia type 1. Cytogenetic evaluation with DEB test. *Cancer Genet Cytogenet* 79(2):123-126

Torres I. (2010). Purificación y caracterización parcial de una lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) con actividad citotóxica sobre células cancerígenas. Tesis de maestría en nutrición. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Querétaro.

Toscano M., Ilarregui J., Bianco G., Rubinstein N., Rabinovich G., 2006. Interacción entre proteínas y glicanos en la regulación fisiológica de las células T. Facultad de Medicina de Buenos Aires 66: 357- 362

Trigos A., Hernández R., Sobal M., Morales P. y Robinson V. 1996. Ergosterol content in fruit bodies from *Pleurotus ostreatus* cultivated in the presence of sodium acetate. Micología Neotropical Aplicada 9:129-132

Van Damme E., Goossens K., Smeets K., Van Leuven F., Verhaert P., Peumans W. 1995. The major tuber storage protein of araceae species is a lectin. Characterization and molecular cloning of the lectin from *Arum maculatum*. Plant Physiol 107(4):1147–1158

Wadstrom T. 1981. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minesota, Sf. Paul. Journal of Food Protección. 53(10):883-894

Wang H., Ng T. y Lui, Q. 2003. A novel lectin from the wild mushroom *Polyporus adusta*. Biochem. Biophysic. Res. Commun. 307: 535-339

Weis W., Drickamer K. 1996. Structural basis of lectin- carbohydrate recognition. Annu Rev Biochem 65: 441-473

Werner M. 2007. Estudios estructura y función de una lectina aislada de semillas de *Caesalpinia spinosa* "kuntze" (Tara). IDESIA 25 (2): 49-58

Wu A., Wu J., Herp A. y Liu J. 2003. Effect of polyvalencies of glycotopes on the binding of a lectin from edible mushroom, *Agaricus bisporus*. Biochem. J. 371: 311-320

Zhang G., Sun J., Wang H., Ng T. 2009. A novel lectin with antiproliferative activity from the medicinal mushroom *Pholiota adiposa*. Acta Biochimica Polonica 56 (3): 415-421

Zhao C., Sun H., Tong X., y Qi Y. 2003. An antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. Biochem. J. 374: 321-327

Ziska P. 1978. Citado en Breene W. 1990. Nutritional and medicinal, value of specialty mushrooms. University of Minesota, Sf. Paul. Journal of Food Protección. 53(10):883-894

10. ANEXOS

I

Nombres científicos y comunes de los organismos mencionados en el trabajo

Agaricus bisporus: champiñón de París o champiñón común

Agaricus blazei: hongo de la almendra, champiñón del sol, seta de Dios, hongo de la vida real
agaricus sol, *jisongrong* o *himematsutake*

Agaricus edulis: champiñón

Agrocybe aegerita: seta de chopo, makal ziza, pollancró

Agrocybe cylindracea: seta de álamo, seta de chopo

Aleuria aurantia: peziza anaranjada, cassoleta taronja, katilu laranja

Amaranthus caudatus: kiwicha, quihuicha (quechua: kiwicha) o amaranto

Amaranthus leucocarpus: quelite, blero, alegría, amaranto, blede, quintonil, amaranto, moco de pavo

Armillaria luteo-virens: armilaria color de miel

Artocarpus integrifolia: jacalina

Aspergillus fumigatus: aspergillus

Athelia rolfsii: raíz del maíz, podredumbre de la corona, tizón del sur

Auricularia polytricha: oreja de la madera, oreja de árbol, hongo negro

Beauveria bassiana: seta de "Muscardina blanca"

Bitis arietans: víbora bufadora, monarub

Bothrops jararacá: Jararaca , yararaca, yararaca perezosa, caissaca, jaraca, jaracá, jararaca, jararaca-de-matta-virgem, jararaca-do-rabo-branco, jararaca-do-campo, jararaca-do-cerrado, jararaca-dormideira, jararaca-dominhoca, jararaca-preguicosa, malha-de-sapo, yará

Callosellasma rhodostoma: tisiphone, leioplepis

Canavalia ensiformis: canavalia, fríjol de chancho, fríjol espada, fríjol machete, fríjol mantequilla

Chlorophyllum molybdites: falso parasol, parasol de esporas verdes

Cordyceps militaris: beldar, mazo

Crotalus durissus terrificus: cascabel tropical, víbora de cascabel, cascabel o cascabela

Echis carinatus: víbora gariba

Echis multisquamatus: víbora gariba

Escherichia coli: E. coli

Fusarium solani: hongo del pie negro

Ganoderma cápense: lingzhi

Hericium erinaceum: melena de león, hongo puercoespín

Hygrophorus hypothejus: higróforo de láminas amarillas

Inocybe umbrinella: seta

Ischnoderma resinosum: políporo de final de otoño

Kluyveromyces bulgaricus: levadura

Laccaria amethystea: engañoso ametista

Lactarius lignyotus: lactario negruzco

Lactarius rufus: lactario rojizo

Laetiporus sulphureus: políporo de azufre, estante de azufre, gallina del bosque

Lens culinaria: lentejas

Lentinus edodes: shiitake, hongo del árbol shii, seta fragante o seta deliciosa (en chino)

Maackia amurensis: amur maackia

Paxillus involutus: llanta café, pax venenoso

Pedospaera párvula: bacteria verruga

Peziza sylvestris: hongo de copa café, hongo hada

Phallus impudicus: falo, pepinillo, impúdico

Phaseolus vulgaris: judía, fasolina, chaucha, chinameca, fríjol, habichuela, majora, patachete, poncha, poroto, tapiramo, tapirucuso, tineco

Pholiota adiposa: numerisugitake, slijmsteelbundelzwan

Phytolacca americana: espinaca de Indias, fitolaca, granilla, hierba carmín, hierba de la oblea, mechoacan, tintilla, uva de América.

Pisum sativum: guisantes verdes, guisante, arveja, arvejas, chícharo, chícharos

Pleurocybella porrigens: alas de ángel

Pleurotus citrinopileatus: cuerno de la abundancia amarillo, seta ostra amarilla

Pleurotus cornucopiae: cuerno de la abundancia, alziñoia, orelles de burro

Pleurotus djamor: hongo ostra rosa

Pleurotus ostreatus: gírgola, champiñón ostra o pleuroto en forma de ostra

Pleurotus pulmonarius: hogo hindú, hongo fenix, dhingri

Polyporus adusta: poliporo humeante

Rhizopus stolonifer: moho

Ricinus communis: ricino, higuera del diablo, higuera infernal, higuereta, higuerillo

Schistosoma mansoni: bilharzia, parásito de esquistosomiasis

Sophora japonica: árbol de la miel, árbol de las pagodas y falsa acacia del Japón

Streptomyces avermitilis: bacteria de las avermectinas

Trichinella spiralis: parásito de triquinelosis

Tripanosoma cruzi: parásito de la enfermedad de Chagas

Ulex europaeus: retamo espinoso, espinillo o tojo

Viscum album: muérdago blanco, liga o visco

Xerocomus chrysenteron: boleto de de carne amarilla

Xerocomus spadiceus: seta de las boletales

ALGUNAS SECUENCIAS DE AMINOACIDOS REPORTADAS POR EL NCBI

A continuación se presentan las secuencias de aminoácidos de lectinas mencionadas en la parte de resultados. Están en orden alfabético por su número de acceso.

Lectina *Pleurotus cornucopiae*

LOCUS AB116253 1202 bp mRNA linear PLN 17-SEP-2005

DEFINICIÓN *Pleurotus cornucopiae* pcl-mc2 mRNA for lectin, complete cds.

ACCESO AB116253

VERSIÓN AB116253.1 GI:46395307

FUENTE *Pleurotus cornucopiae* (cornucopia mushroom)

ORGANISMO *Pleurotus cornucopiae*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina;
Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Pleurotaceae;
Pleurotus.

REFERENCIA 1

AUTORES Oguri,S., Ando,A. and Nagata,Y.

TITULO A novel developmental stage-specific lectin of the basidiomycete
Pleurotus cornucopiae

JOURNAL J. Bacteriol. 178 (19), 5692-5698 (1996)

PUBMED 8824614

REFERENCIA 2

AUTORES Sumisa,F., Ichijo,N., Yamaguchi,H., Nakatsumi,H., Ando,A.,
Iijima,N., Oguri,S., Uehara,K. and Nagata,Y.

TITULO Molecular properties of mycelial aggregate-specific lectin of
Pleurotus cornucopiae

JOURNAL J. Biosci. Bioeng. 98 (4), 257-262 (2004)

PUBMED 16233702

REFERENCIA 3

AUTORES Sumisa,F., Iijima,N., Ando,A., Shiga,M., Kondo,K., Amano,K. and
Nagata,Y.

TITULO Properties of mycelial aggregate-specific lectin of *Pleurotus*
cornucopiae produced in *Pichia pastoris*

JOURNAL Biosci. Biotechnol. Biochem. 68 (4), 959-960 (2004)

PUBMED 15118334

REFERENCIA 4 (bases 1 to 1202)

AUTORES Nagata,Y. and Sumisa,F.

TITULO Direct Submission

JOURNAL Submitted (01-AUG-2003) Yoshiho Nagata, Chiba University; Matsudo
648, Matsudo, Chiba 2718510, Japan

CARACTERISTICAS Location/Qualifiers
source 1..1202

```

/organism="Pleurotus cornucopiae"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:5321"
gene 1..1202
/ gene="pcl-mc2"
CDS 16..1137
/ gene="pcl-mc2"
/ note="PCL-M2 (Lectin in mycelial aggregates of Pleurotus
cornucopiae)"
/ codon_start=1
/ product="lectin"
/ protein_id="BAD16585.1"
/ db_xref="GI:46395308"
/ translation="MKTLAWFVPLITAVLIGAVPNKQMC GDTADVDTNPTCKGKMVP
SAFEPAFLNISKYIWTGENTVPEADNPAGTRAFRKNITSACGKCATCATIVVAADDSS
TVYVNGVAIGSGAGWITGQVYFAPLNPSSNLFAIAGVNNVARAALMATINIHYS DGTH
ETFITDESWKTVRGAAPQGFQLPATSDSTWTFAMLQGFQNSLWGNPALPPVLP LAQS
KWIWTSANAATTAPAASNAFRKTIDDCTKVAVCATVLISADNHYKLYVNGQAVGSGDS
FGRAEAYSIPKLHPTLNTFAIDAKNDEGPAGVIATIHITYRDGTNQTIVTDG SWKASQ
TVPNGFQETFFDSDWVAATVVGNYGIAPWGSALAIPPA"

```

ORIGEN

```

1 acaccttgca acatcatgaa aactctagct tggtttgtgc ccttgatcac cgcggtgctc
61 atcgggtcgg tcccaacaa gcagatgtgt ggtgacactg cagacgtgac cgacactaat
121 ccgacttgca aggggaaat ggtccaagc gcattcgagc ctgcttct caacatcctc
181 aagtacatct ggaccggcga aaatactgtc cctgaagctg acaatcctgc tggactcgc
241 gcgttcgca agaacatcac gtctgctgt ggaaagtgc cgacgtgtgc taccattgtc
301 gtggctcgg acgactcaag tacggtgat gtcaatggtg tagcgattgg ctctggagcg
361 ggttgataa ctggacaagt ttatttcgcg cctttgaacc cgtcgtcaaa cctcttctg
421 atcgaggcg tcaacaactg tgcgcgca gctctcatgg ctacgattaa tattcactac
481 tctgacggca cccatgaaac tttcatcact gatgagagct ggaagactgt tcggggtgcg
541 gctccacaag gattccagct acctgacgaca tcagacagta cctggacatt cgctatgtt
601 caaggctcc cacagaattc attgtgggga aaccctgctc taccactgt ccttccgctc
661 gctcagtcta agtggatttg gacgtccgct aatgcagcta caactgcccc ggcgcgctca
721 aacgcgttcc gcaagaccat tgatgactgt accaaagtgg ccgtctgcgc caccgttctc
781 atatctcggg ataaccacta caagttgat gtgaacggac aagctgttgg cagtggcgac
841 agctttgaa gggcagaagc ctacagcatc cccaaactcc atccaacct caacacgttc
901 gccatcgatg cgaaaaacga cgaaggccca gcgggtgtca tcgccaccat ccacatcacc
961 taccgtgatg ggaccaacca aactattgtg actgatggct catggaaggc gtcgacgacc
1021 gttccgaatg gattccaaga gactttctc gacgactcgg actgggttgc ggcgactgtg
1081 gttggaaatt atgggattgc gccctggggc tcggcattgg cgattccacc agcctagttc
1141 ttccactgt gggagtgcac aagaactgt agtgaatgaat gcgtacttca tttcttgtt
1201 gc

```

Lectina de *Xerocomus chrysenteron*

LOCUS AF338360 872 bp DNA linear PLN 27-JUN-2003

DEFINICIÓN *Xerocomus chrysenteron* lectin gene, complete cds.

ACCESO AF338360

VERSIÓN AF338360.1 GI:18478670

FUENTE Xerocomus chrysenteron

ORGANISMO Xerocomus chrysenteron

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina;
Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Boletales; Boletineae;
Boletaceae; Xerocomus.

REFERENCIA 1 (bases 1 to 872)

AUTORES Trigueros,V., Lougarre,A., Ali-Ahmed,D., Rahbe,Y., Guillot,J.,
Chavant,L., Fournier,D. and Paquereau,L.

TITULO Xerocomus chrysenteron lectin: identification of a new pesticidal
protein

JOURNAL Biochim. Biophys. Acta 1621 (3), 292-298 (2003)

PUBMED 12787928

REFERENCIA 2 (bases 1 to 872)

AUTORES Trigueros,V., Lougarre,A., Baricault,L., Ali-Ahmed,D., Rabhe,Y.,
Guillot,J., Chavant,L., Fournier,D. and Paquereau,L.

TITULO Insecticidal properties of a lectin from the mushroom Xerocomus
chrysenteron

JOURNAL Unpublished

REFERENCIA 3 (bases 1 to 872)

AUTORES Trigueros,V., Paquereau,L., Lougarre,A., Ali-Ahmed,D., Rabhe,Y.,
Caporalino,C., Guillot,J., Chavant,L. and Fournier,D.

TITULO Direct Submission

JOURNAL Submitted (18-JAN-2001) Biochimie des Proteines, Universite Paul
Sabatier, 118 Route de Narbonne, Toulouse 31092, France

CARACTERISTICAS Location/Qualifiers

source 1..872

/organism="Xerocomus chrysenteron"

/mol_type="genomic DNA"

/db_xref="taxon:5386"

mRNA join(1..22,82..521,584..872)

/product="lectin"

CDS 90..521

/note="insecticidal protein"

/codon_start=1

/product="lectin"

/protein_id="AAL73236.1"

/db_xref="GI:18478671"

/translation="MSYSITLRVYQTNRDRGYFSIVEKTVWHFANGGTWSEANGAHTL

TQGGSGTSGVLRFLSTKGERITVAVGVHNYKRWCDVVTGLKPDOTALVINPQYYNNGG

RDYVREKQLAEYSVTS AIGTKVEVVYTV AEGNLEANVIFS"

ORIGEN

1 agctcgaaaa agatctgaaa aagttgtct cttctcttt cttgcaccc gactatactg

61 aaacctacgt acggtgtgta ggcatcacca tgtcttacag tattaccctc cgtgtctacc

121 agaccaaccg cgatcgcggg tacttctcca tcgttgagaa gaccgtttg cactttgcca

181 acggtgttac ttggtccgag gccaacggcg cccacacct caccagggt gtagcggca

241 cgtctggagt tctctgttc ttgtcgacca agggcgagcg catcactgtc gctgtcgggg

301 tgcacaacta caagcgttg tgcgacgtc tctctggct taagcccgac gagaccgctc

361 tgggatcaa cccgcagtac tacaacaacg gaggacggga ctatgtcagg gagaaacaat
 421 tggctgagta cagcgtcacg agcgccattg gaacgaaagt cgaagttgt tacaccgtcg
 481 ctgaaggcaa caatctcgag gccaacgtca tcttctcttg agtgagtga ttaccgtttc
 541 taccgcccgt cgttcgtcgg attgaccgta tttcgcatag taggcgttct ccgctacttg
 601 ttaccggttg agcaagaatg tgtacagtag tctcatcgaa ggaagagtca gtcagtatga
 661 atgaatgatc gtatctaggg gaaggaaaat ggcagaaaac ttgaatatca tgcaactcag
 721 tgaagtcaca cgtctggaa ttgtaagggg catccctgat agttcaggaa tggactgtcc
 781 caaaaagtct tatgcgtctc gttactctcg tagcgagtag aacctcgtg tgtctctat
 841 gttctctgc tacagtcca acatacctag ct

Lectina de *Phaseolus vulgaris*

LOCUS AJ439715 828 bp mRNA linear PLN 15-APR-2005

DEFINICIÓN Phaseolus vulgaris mRNA for lectin (lec4-B17 gene).

ACCESO AJ439715

VERSIÓN AJ439715.1 GI:19773405

FUENTE Phaseolus vulgaris

ORGANISMO Phaseolus vulgaris

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
 rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Phaseoleae;
 Phaseolus.

REFERENCIA 1

AUTORES Lioi,L., Sparvoli,F., Galasso,I., Lanave,C. and Bollini,R.

TITULO Lectin-related resistance factors against bruchids evolved through
 a number of duplication events

JOURNAL Theor. Appl. Genet. 107 (5), 814-822 (2003)

PUBMED 12819911

REFERENCIA 2 (bases 1 to 828)

AUTORES Lioi,L.

TITULO Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-MAR-2002) Lioi L., Germplasm Institute, Cnr, via G.
 Amendola, 165/A Bari, I-70126, ITALY

CARACTERISTICAS Location/Qualifiers

source 1..828
 /organism="Phaseolus vulgaris"
 /mol_type="mRNA"
 /specimen_voucher="G12949"
 /db_xref="taxon:3885"
 /clone="Pv4-B17"
 /tissue_type="cotyledon"
 /dev_stage="mid maturation"
 gene 1..828
 /gene="lec4-B17"
 CDS 1..828
 /gene="lec4-B17"
 /codon_start=1
 /product="lectin"
 /protein_id="CAD29133.1"

/db_xref="GI:19773406"
/db_xref="GOA:Q8RVX5"
/db_xref="HSSP:1LUL"
/db_xref="InterPro:IPR000985"
/db_xref="InterPro:IPR001220"
/db_xref="InterPro:IPR008985"
/db_xref="InterPro:IPR013320"
/db_xref="InterPro:IPR016363"
/db_xref="InterPro:IPR019825"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:Q8RVX5"
/translation="MASSKLLSLALFLVLLTLANSASETSFSFQRFNETNLILQGNAS
VSSGQLRLTNLKSNGEPTVGLGRAFYSTPIQIWDSTTGRLASFATSFTFNIIYAPIM
KNSADGIAFALVPVGSQPKTNAGLLGLFDNGTYDSNAHIVAVEFDTCINLWDPKQRH
IGIDVNSIKSIKTPWDFVNGENAEVLITYNSSTKLLVTSLVYPSQKTSFIISDRVEL
ESVLPEWVSVGFSATSGINEGNTETNDVLSWSFASKLSDGTTSEGLNLANSLLNQL"

sig_peptide 1..63
/gene="lec4-B17"

ORIGEN

1 atggcttct ccaagtact ctccctagcc ctcttcttg tgcttctcac cctcgcaaac
61 tcagctagcg aaacctcct cagctccaa aggttcaacg aaaccaacct tctctccaa
121 ggcaatgcct cgtctcctc ctccggccag ttacgactaa ccaatctta aagcaacgga
181 gaaccacgg tgggtctct gggccgccc ttctactcca ccccatcca aatctgggac
241 agcaccaccg gccgcttggc aagcttgcg acctcttca cattcaatat ctacgtccc
301 ataataaaaa actccgcga tggcattgcc tttgctctg tcccggtggg ctctcagccc
361 aaaaccaatg cgggtcttct aggtctgtc gacaacggca cctacgacag caatgccat
421 attgtggctg tggagtcca cacctgcatc aacctgggct gggaccctaa acagcgtcat
481 attggcatcg acgtcaactc catcaagtct atcaaaacga cgccgtggga tttgtgaac
541 ggagaaaacg ccgaggttct gatcacctat aactctcca caaagctctt ggtgactct
601 cttgtttacc ctctcagaa aacgagctc atcatctctg acagagtga gttggagagc
661 gttcttccc agtgggtgag cgtgggttc tctgctacct ctgggattaa tgaagggaac
721 actgaaacga acgagctct ctctgtgtct tttgcttcca agctctcca tggcaccaca
781 tctgaaggtt tgaatctgc aaactcgtc ctcaacccaa tcctctag

Lectina de *Paxillus involutus*

LOCUS AY585977 387 bp DNA linear PLN 02-FEB-2006

DEFINICIÓN Paxillus involutus strain Nau lectin (lecA) gene, partial cds.

ACCESO AY585977

VERSIÓN AY585977.1 GI:50980911

FUENTE Paxillus involutus

ORGANISMO Paxillus involutus

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina;
Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Boletales; Paxilineae;
Paxillaceae; Paxillus.

REFERENCIA 1 (bases 1 to 387)

AUTORES Le Quere,A., Eriksen,K.A., Rajashekar,B., Schutzendubel,A.,
Canback,B., Johansson,T. and Tunlid,A.

TITULO Screening for rapidly evolving genes in the ectomycorrhizal fungus

Paxillus involutus using cDNA microarrays
 JOURNAL Mol. Ecol. 15 (2), 535-550 (2006)
 PUBMED 16448419
 REFERENCIA 2 (bases 1 to 387)
 AUTORESS Rajashekar,B.
 TITULO Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-MAR-2004) Microbial Ecology, Lund University, Ecology
 Building, HST 50, Lund 22362, Sweden
 CARACTERISTICAS Location/Qualifiers
 source 1..387
 /organism="Paxillus involutus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="Nau"
 /db_xref="taxon:71150"
 gene <1..>357
 /gene="lecA"
 mRNA <1..>357
 /gene="lecA"
 /product="lectin"
 CDS <1..357
 /gene="lecA"
 /codon_start=1
 /product="lectin"
 /protein_id="AAT91302.1"
 /db_xref="GI:50980912"
 /translation="VWSYANGGTWSNADGDQTLTMGGSGTSGTLRFMSDMGERLIVAI
 GVHNYKRWCDIATGLAPNATGVVNGEYNSGKRAYMREKQLAEYSVTSPAGTKVAIK
 YTVAEGNCLEADVITIG"

ORIGEN

1 gtctggagct acgccaatgg cgggacgtgg tctaacgctg atggtgatca aaccctgacc
 61 atgggtggtg gtggtacatc aggtactctc cgcttcatgt cggacatggg cgaacgcctg
 121 atcgtcgcaa ttggtgtaca caactataaa cgttggtgcg acatcgcgac tggctcttgcg
 181 cctaattgcca cgggtgtcgt ggtcaatggg gaggattaca acagcggcaa gagagcttat
 241 atgagggaga agcagctggc cgagtacagc gttaccagtc ctgcggggcac caaggttgcg
 301 atcaagtaca cggttgcgga aggaaactgc ctcgaggctg atgtcacat cggatgaagt
 361 gagtccatcg ttgacgctcc cacatcc

Lectina de *Pisum sativum*

LOCUS EU825771 1948 bp DNA linear PLN 30-JUL-2008
 DEFINICIÓN Pisum sativum lectin (psl) gene, complete cds.
 ACCESO EU825771
 VERSIÓN EU825771.1 GI:194460511
 FUENTE Pisum sativum (pea)
 ORGANISMO Pisum sativum
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;

rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Fabaeae; Pisum.

REFERENCIA 1 (bases 1 to 1948)

AUTORES Zhang,X., Zhou,X., Tian,T., Tong,C., Du,X. and Su,C.

TITULO Expression of the pea lectin and ENOD12A in tobacco

JOURNAL Unpublished

REFERENCIA 2 (bases 1 to 1948)

AUTORESS Zhang,X., Zhou,X., Tian,T., Tong,C., Du,X. and Su,C.

TITULO Direct Submission

JOURNAL Submitted (14-JUN-2008) College of Horticulture and Landscape
Architecture, Southwest University, 2 Tianshenglu, Chongqing
400715, China

CARACTERISTICAS Location/Qualifiers

source 1..1948
/organism="Pisum sativum"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:3888"
gene <855..>1682
/gene="psl"
mRNA <855..>1682
/gene="psl"
/product="lectin"
CDS 855..1682
/gene="psl"
/codon_start=1
/product="lectin"
/protein_id="ACF72660.1"
/db_xref="GI:194460512"
/translation="MASLQTMISFYAIFLSILLTTLFFKVNSTETTSFLITKFS
PD
QQNLIFQGDGYTTKEKLTAKVKNVGRALYSSPIHIWDRETGNVANFVTSFTFVIN
APNSYNVADGFTFFIAPVDTKPQTGGGYLGVFNSAEYDKTTQTVAVEFDTFYNAAWDP
SNRDRHIGIDVNSIKSVNTKSWKLNQEEANVVIAFNAATNVLTVSLTYPNSLEEENV
TSYTLSDVVSCLKDVPEWVRIGFSATTGAEYAAHEVLSWSFHSLSGTSSSKQAADA"

ORIGEN

1 gtaaagtct gatgatggtg tgtgatagct aggtcattgg tataaattta agtcaacata
61 ttagttaaata aattgatata ctatttaaac tgcgagagtt ttgtttctga aggttaaaaa
121 taaatcccct tcagtttaac gacgtgtaag ttttcaacta catatattga ctcagtgaca
181 tttctttcat gtcattgtcac aagaacttaa ttttttctc agaaattaac ggaagagaac
241 aaataagata aagaaagaag tgaaatataa agattaacat ataacatttt ttaattaaag
301 aattaaaca aatattataa ttaactataa aatttggtga ttaattgtgc caaaaaata
361 tgatgcagct agatctttta gcttaatttt taattggatg agatgatacc ttaattttta
421 attggatgag atacaaattt taccataaaa tatattagtt ataacaatac gaccaccctc
481 tccataagtt taaataaat atcagcccta aaaaactctt taataaatt gaaattta
541 gagtcatatt ttttaacat ataaatttta atagttatcg taccgaacaa aaacagtaat
601 catgatctaa accgaacaac ctcgaagaaa tacaagttat tacatgcaaa aatatatagt
661 aataaataaa taaactagtt aaacaaaata caatattttt tgtcttcaaa gaagattcga
721 tggacgcgta gaaaatgatg ggacatggtg ttgtatatgt gtttcattgt aacgcactat
781 aaagacacgt agaatgagtc atcaccacta tataaacaag tagcatgcat gcatgcatgc
841 aattataacc aataatggct tctcttcaaa ccaaatgat ctcgttctat gcgatatttc

901 tatccattct ctaacaaca atccttttct tcaagtgaa ctcaactgaa accacttct
 961 tcttgatcac caagttcagc cccgaccaac aaaacctaata cttccaagga gatggctata
 1021 ccacaaaaga gaagctgaca ctgaccaagg cagtaaagaa cactgttggc agagccctct
 1081 attcctcacc tatccatatac tgggatagag aaacaggcaa cgttgctaata tttgtaactt
 1141 ccttcacttt tgtcataaat gcaccaaca gttacaactg tgccgacggg tttacgttct
 1201 tcatcgcacc ttagataact aagccgcaga ccggcgggtg atatctcgga gttttcaata
 1261 gcgagagta tgataaaacc actcaaactg ttgctgtgga gtttgacact ttctataatg
 1321 ctgcatggga tccaagcaac agagatagac atattggaat cgatgtgaac agtatcaaat
 1381 ccgtaaacac taagtcgtgg aagttgcaga atgggtgaaga ggctaattgt gtgatagctt
 1441 ttaatgctgc tactaatgtg ttaactgtta gtttaactta tcttaattca cttgaggaag
 1501 agaatgtaac tagttatact ctagcgacg ttgtgtcttt gaaggatgtt gttcctgagt
 1561 gggttaaggat tggtttctca gctaccacag gagcagaata tgcagcacat gaagttcttt
 1621 catggtcttt tcattctgag ttgagtgga cttcaagttc taagcaagct gcagatgcat
 1681 agtttttttg cttttcatca tcatgcatgt caagtcatgt gtgacagatc cagtttctat
 1741 aaataaactg cgcatatgca gtacttttgt aatgttgta tgatgttac ttgatgcgtt
 1801 tattaatcaa tgtgtgat taattgttg agttatgtg gttaaattag atagttact
 1861 tctttttaa tattattgg ccaaatgca aactgttaa gcattagtga tcactagtat
 1921 agggcctaata agaaccatt cttggcaa

Lectina de *Athelia rolfsii*

LOCUS FJ211419 429 bp DNA linear PLN 01-JAN-2010

DEFINICIÓN *Athelia rolfsii* lectin (l1) gene, complete cds.

ACCESO FJ211419

VERSIÓN FJ211419.1 GI:225420801

FUENTE *Athelia rolfsii* (anamorph: *Sclerotium rolfsii*)

ORGANISMO *Athelia rolfsii*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina;

Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Atheliales; Atheliaceae; *Athelia*.

REFERENCIA 1 (bases 1 to 429)

AUTORES Chandrashekar,T.M., Bhat,R.S., Swamy,B.M., Inamdar,S.R. and Kuruvinashetti,M.S.

TITULO Direct Submission

JOURNAL Submitted (15-SEP-2008) Department of Biotechnology, University of Agricultural Sciences, Krishinagar, Dharwad, Karnataka 580 005, India

CARACTERISTICAS Location/Qualifiers

source 1..429
 /organism="Athelia rolfsii"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:39291"
 /note="anamorph: Sclerotium rolfsii"
 gene <1..>429
 /gene="l1"
 /note="sr11"
 mRNA <1..>429
 /gene="l1"
 /product="lectin"
 CDS 1..429

/gene="l1"
/codon_start=1
/product="lectin"
/protein_id="ACN89784.1"
/db_xref="GI:225420802"
/translation="MTYKITVRIYQTNPNFAFFQLVEETVWKYANGGTWAVENDQHVL
T
MGGSGTSGTLRFQADDGESFVAVFGVHNYKRWCDIVTGLASNQTGIVINEEYSLPVR
ERARERQLSEYQVKNNAKGRNFQVNFQAEAGDLHANVIIG"

ORIGEN

1 atgactata agattaccgt gcgcatctac cagaccaacc cgaacgcgtt cttccagctc
61 gtcgaagaga cagtgtggaa gtatgccaac ggtggtacct gggccgtgga aaacgatcag
121 catgtcctca caatgggtgg cagcggcact tccggtacac tgcgctcca ggccgatgat
181 ggcgagagct tcgtcgttgc gttggcgta cacaattaca aacgctggtg cgatcctg
241 acgggcctgg cgtctaata aactggcata gttatcaatg aagagtatta ctactgcct
301 gtgagggagc gtgctagga gcgtcagctg agcgagtatc aagtcaaaaa tgccaaaggc
361 aggaactcc aagtcaactt taccaggcg gaaggagggtg acctcatgc gaacgtcatt
421 atcgggtga

Lectina de *Pleurotus ostreatus*

LOCUS HQ606464 1122 bp mRNA linear PLN 22-DEC-2010

DEFINICIÓN *Pleurotus ostreatus* strain 739 lectin mRNA, complete cds.

ACCESO HQ606464

VERSIÓN HQ606464.1 GI:315190038

FUENTE *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom)

ORGANISMO *Pleurotus ostreatus*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina;
Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Pleurotaceae;
Pleurotus.

REFERENCIA 1 (bases 1 to 1122)

AUTORES Chen,Y.Y., Dong,J.Y., Huang,Q., Lei,J.H. and Ma,A.M.

TITULO *Pleurotus ostreatus* fruiting body specific mRNA for lectin

JOURNAL Unpublished

REFERENCIA 2 (bases 1 to 1122)

AUTORES Chen,Y.Y., Dong,J.Y., Huang,Q., Lei,J.H. and Ma,A.M.

TITULO Direct Submission

JOURNAL Submitted (10-NOV-2010) College of Food Science and Technology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan, China

CARACTERISTICAS Location/Qualifiers

source 1..1122

/organism="Pleurotus ostreatus"

/mol_type="mRNA"

/strain="739"

/db_xref="taxon:5322"

/tissue_type="fruiting body"

CDS 1..1122
 /codon_start=1
 /product="lectin"
 /protein_id="ADT89769.1"
 /db_xref="GI:315190039"
 /translation="MVLVIGLPLVSLVVALVAAAAPDSQVCDVDSTATCKITATPSQ
 FQPALLNASKWIWTGENPIPGGSNISTRPFRKNITAPCGKCSVCATIVVASDDAHTF
 YVNGVRIGTGAGFRQGQALFVALQPTWNLFAIAGQNLVANSAPAGIMASILVHFSDGTS
 ETFVTDESWKTLRAAPPENFQLPSTNDSNWPSAAVQAYQNSVWGPVLPVPLRGS
 NWIWTSDNVNGAAPVGSRAFRKTVNQCTKVAVCATVLIADDRYTLVNGATVSGSS
 YTVADAYTIPNLHPTFNTFAINATNGGGPAGVIATILITYSDGSNETVVTDASWKAIQ
 TIPQGFQPLIDFGWESAKIIGAFGVAPWGAGMVIPSA"

ORIGEN

1 atggttttac tagtaattgg cttgccttta gtgagtctcg tcgtggcact cgttgctgca
 61 gcagcccccg acagtcaggt gtgcgatgtg gatagcacgg cgacgtgcaa gatcactgct
 121 accccgagcc aatttcagcc cgccttggtg aacgcctcca agtggatttg gaccggcgag
 181 aaccgatcc caggaggtag caacatcatc agtactcggc ctttagaaa gaacatcacg
 241 gcaccttgcg gtaaatgctc cgtttgtgca accattgtgg tagcttccga tgatgcgcac
 301 acattctatg ttaatggtgt tcgtattggc actggcgag gcttcagaca aggccaggcc
 361 ttgtttgtgg cattgcagcc tacctggaac ctcttgcca ttgccgtca gaatctgtc
 421 gccaatagtc cagcaggtat catggcctcg atcttggctc acttctcaga tggaccagc
 481 gagacttctg ttaccgacga gtcgtggaaa acccttcgcg ctgcgcctcc cgaaaattc
 541 cagctcccat cgaccaatga cagcaactgg ccctccgccg cggtgcaagg ggcgtatcag
 601 aactcagttt ggggaccacc agtcctacct cctgtcctcc ccctccgagg ctcaaattgg
 661 atctggacgt ccgacaatgt aatgggtgct gcccctgtag gctctcgtgc cttcagaaag
 721 actgtcaatc aatgcacgaa agtcgcggtc tgcgctactg tcttgatcgc ggccgacgat
 781 cggatacatc tatacgtcaa cggagctaca gttggatcgg ggtctagcta caccgtcgcc
 841 gatgcctata ccattcccaa cctccatccc acctcaaca cctttgcat caacgcgacg
 901 aacggtggtg gccacgagg ggtcattgca actattctca ttacatactc agatggttcg
 961 aatgaaacgg tcgtcaccga tgctagctgg aaggcatcc agacgatccc tcaaggattc
 1021 cagccgctc tcacgatga atttggtgg gagagcgcga aaattattgg tgcttttga
 1081 gttgcaccgt gggcgctgg tatggttatc cctagcgctt ag

Lectina de *Agaricus bisporus*

LOCUS ABU14936 629 bp mRNA linear PLN 27-JAN-1996

DEFINICIÓN *Agaricus bisporus* lectin mRNA, complete cds.

ACCESO U14936

VERSIÓN U14936.1 GI:606959

FUENTE *Agaricus bisporus*

ORGANISMO *Agaricus bisporus*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina;
 Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Agaricaceae;
 Agaricus.

REFERENCIA 1 (bases 1 to 629)

AUTORES Crenshaw,R.W., Harper,S.N., Moyer,M. and Privalle,L.S.

TITULO Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a lectin gene from *Agaricus bisporus*
 JOURNAL Plant Physiol. 107 (4), 1465-1466 (1995)
 PUBMED 7770537
 REFERENCIA 2 (bases 1 to 629)
 AUTORES Privalle,L.S.
 TITULO Direct Submission
 JOURNAL Submitted (19-SEP-1994) Laura S. Privalle, Agricultural Biotechnology, Ciba-Geigy, P.O. Box 12257, Research Triangle Park, NC 27709-2257, USA
 CARACTERISTICAS Location/Qualifiers
 source 1..629
 /organism="Agaricus bisporus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:5341"
 /clone="ABA"
 /tissue_type="fruiting body"
 /dev_stage="fruiting"
 CDS 66..530
 /codon_start=1
 /product="lectin"
 /protein_id="AAA85813.1"
 /db_xref="GI:606960"
 /translation="MTYTISIRVYQTTPKGFVRPVERTNWKYANGGTWDEV RGEYVLT MGGSGTSGSLRFVSSDTDEIFVATFGVHNYKRWCDIVTNLTNEQTALVINQEYYGVPI RDQARENQLTSYNVANAKGRRFAIEYTVTEGIISRPISSDKCFIRLPSQKS"
 polyA_site 629
 /note="26 A residues"
 ORIGEN
 1 aacataccg aattcggcac gagctcgtgc gattcggcag cagattcacc tgctccacta
 61 acacaatgac ttacaccatc agcattcgcg tctaccagac cacccccaaa ggcttcttcc
 121 gtcccgttga acgaaccaac tggagtagtg ctaatggcgg tacttgggat gaagtgagag
 181 gggaaatgt cctgacctg ggagtagcga gaacctctgg ttctctccgc ttcgtctctt
 241 cggacaccga tgagatcttc gtggcgacgt ttggtgttca caactacaag cgttggtgtg
 301 acattgttac caactgacg aacgaacaaa cggcgctcgt tatcaatcaa gactactacg
 361 gtgtccctat aaggaccag gcaagggaga atcagttgac gagttacaat gtcgccaatg
 421 cgaagggcag gaggtttgcc atcgagtata ctgttaccga agggataatc tcaaggccaa
 481 tctcatcatc ggataagtgc tttatccgc taccgtctca gaaatcatga atgtatagtg
 541 acttgttttg aaagctcctg tagtgtttcc aaatagtgaa ttttatgcca attgaaatgc
 601 ataaatatac gttgtgttcc agtgtacca

Concavalina de *Canavalia ensiformis*

LOCUS X01632 1027 bp mRNA linear PLN 14-NOV-2006
 DEFINICIÓN *Canavalia ensiformis* mRNA for concanavalin A (Con A).
 ACCESO X01632
 VERSIÓN X01632.1 GI:312382
 FUENTE *Canavalia ensiformis* (jack bean)

ORGANISMO *Canavalia ensiformis*
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Phaseoleae;
Canavalia.

REFERENCIA 1

AUTORES Carrington,D.M., Auffret,A. and Hanke,D.E.

TITULO Polypeptide ligation occurs during post-translational modification
of concanavalin A

JOURNAL Nature 313 (5997), 64-67 (1985)

PUBMED 3965973

REFERENCIA 2

AUTORES Min,W., Dunn,A.J. and Jones,D.H.

TITULO Non-glycosylated recombinant pro-concanavalin A is active without
polypeptide cleavage

JOURNAL EMBO J. 11 (4), 1303-1307 (1992)

PUBMED 1563347

REFERENCIA 3 (bases 1 to 1027)

AUTORES Jones,D.H.

TITULO Direct Submission

JOURNAL Submitted (23-JUN-1993) Jones D.H., School of Biological Sciences,
University College of Swansea, Swansea, Wales - UK

CARACTERISTICAS Location/Qualifiers

source 1..1027
/organism="Canavalia ensiformis"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:3823"
CDS 61..933
/codon_start=1
/product="conA precursor"
/protein_id="CAA25787.1"
/db_xref="GI:17979"
/db_xref="GOA:P02866"
/db_xref="InterPro:IPR000985"
/db_xref="InterPro:IPR001220"
/db_xref="InterPro:IPR008985"
/db_xref="InterPro:IPR013320"
/db_xref="InterPro:IPR016363"
/db_xref="InterPro:IPR019825"
/db_xref="PDB:1APN"
/db_xref="PDB:1BXH"
/db_xref="PDB:1C57"
/db_xref="PDB:1CES"
/db_xref="PDB:1CJP"
/db_xref="PDB:1CN1"
/db_xref="PDB:1CON"
/db_xref="PDB:1CVN"

/db_xref="PDB:1DQ0"
/db_xref="PDB:1DQ1"
/db_xref="PDB:1DQ2"
/db_xref="PDB:1DQ4"
/db_xref="PDB:1DQ5"
/db_xref="PDB:1DQ6"
/db_xref="PDB:1ENQ"
/db_xref="PDB:1ENR"
/db_xref="PDB:1ENS"
/db_xref="PDB:1GIC"
/db_xref="PDB:1GKB"
/db_xref="PDB:1Hqw"
/db_xref="PDB:1I3H"
/db_xref="PDB:1JBC"
/db_xref="PDB:1JN2"
/db_xref="PDB:1JOJ"
/db_xref="PDB:1JUI"
/db_xref="PDB:1JW6"
/db_xref="PDB:1JYC"
/db_xref="PDB:1JYI"
/db_xref="PDB:1NLS"
/db_xref="PDB:1NXD"
/db_xref="PDB:1ONA"
/db_xref="PDB:1QGL"
/db_xref="PDB:1QNY"
/db_xref="PDB:1SCR"
/db_xref="PDB:1SCS"
/db_xref="PDB:1TEI"
/db_xref="PDB:1VAL"
/db_xref="PDB:1VAM"
/db_xref="PDB:1XQN"
/db_xref="PDB:2CNA"
/db_xref="PDB:2CTV"
/db_xref="PDB:2ENR"
/db_xref="PDB:2UU8"
/db_xref="PDB:2YZ4"
/db_xref="PDB:3CNA"
/db_xref="PDB:3D4K"
/db_xref="PDB:3ENR"
/db_xref="PDB:5CNA"
/db_xref="UniProtKB/Swiss-Prot:P02866"
/translation="MAISKKSSLFLPIFTFITMFLMVVNKVSSSTHETNALHFMFNQF
SKDQKDLILQGDATTGTEGNLRLTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVHIWESSAVVASF
EATFTFLIKSPDHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDANVIRNSTTIDFNA
AYNADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTAHIYN
SVDKRLSAVVSPNADSATVSYDVLNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTS
KLKSNEIPDIATVV"

sig_peptide 61..147

mat_peptide 148..903
 /product="concanavalin A mature seed (subunit 2)"
 misc_difference 246
 /note="results in Asp rather than Glu at aa 33 of
 pro-ConA;
 conflict"
 /citation=[2]
 /replace="t"
 misc_difference 256..257
 /note="results in Glu rather than Arg at aa 37 of
 pro-ConA;
 conflict"
 /citation=[2]
 /replace="ga"
 misc_difference 360
 /note="results in HindIII cut site at bp 360-365;
 conflict"
 /citation=[2]
 /replace="a"

ORIGEN

1 tcagaaattg tagcaagcag cactactagt gaagtagtga atatcaatag gtataccacc
 61 atggccatct caaagaaatc ctccctgttc cttcctatat ttacgttcat caccatgttc
 121 ctaatggtag tgaacaaggt gagttcatca acacatgaga caaatgcact ccatttcag
 181 ttcaaccaat ttagcaaaaga tcagaaggat ttgatccttc aaggtgacgc cacaacagga
 241 acagagggtg acttgagact cacaagggtg tcaagtaatg ggagtccaca gggaagcagt
 301 gtgggccggg cttgttcta tgccccagtc cacatttggg aaagtctgc tgtggtggcc
 361 agctttgaag ctacctttac atttctcata aaatcacccg actctcacc agctgatgga
 421 attgccttct tcattcaaa tattgacagt tcaatcccta gtggttcac tggaggctc
 481 ttgggactct tccctgatgc aatgttatc agaaattcca ctactattga tttcaacgct
 541 gcttacaatg ccgatactat tgttgctgtt gaattggata cttatccaa tactgatatt
 601 ggagatcaa gttatccaca catcggatc gatattaaat ctgttcgctc caagaagacc
 661 gcaaagtgga acatgcaaaa tgggaaggta ggactgcac acatcatcta taactctgtt
 721 gataagagac taagtctgt tgtttctat ctaacgctg actctgccac tgtctcttac
 781 gacgttgacc tcgacaatgt cctcctgaa tgggtagag ttggccttc tgcttcaacc
 841 ggactttaca aagaaccaaa taccattctc tcatggtctt ttacttctaa gttgaagagc
 901 aatgagatcc cggacattgc taccgtggtt tgatttcat ccatgtacca taataatctc
 961 tgctgctgtg taatccactg ttggccta atgccattaa tgaagacaat ataagtctct
 1021 ttattat

Lectina de *Ricinus communis*

LOCUS XM_002520451 486 bp mRNA linear PLN 06-AUG-2009

DEFINICIÓN *Ricinus communis* lectin precursor, putative, mRNA.

ACCESO XM_002520451

VERSIÓN XM_002520451.1 GI:255558947

FUENTE *Ricinus communis* (castor bean)

ORGANISMO Ricinus communis

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
rosids; fabids; Malpighiales; Euphorbiaceae; Acalyphoideae;
Acalypheae; Ricinus.

REFERENCIA 1 (bases 1 to 486)

AUTORES Chan,A., Puiu,D., Melake,A., Orvis,J., Zhao,Q., Wortman,J.,
Utterback,T., Rosovitz,M.J., Inman,J.M., Amedeo,P., Schobel,S.,
Galinsky,K., Fraser,C., Ravel,J. and Rabinowicz,P.

TITULO Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-OCT-2008) J. Craig Venter Institute, 9704 Medical
Center Dr., Rockville, MD 20850, USA

CARACTERISTICAS Location/Qualifiers

```
source      1..486
             /organism="Ricinus communis"
             /mol_type="mRNA"
             /cultivar="Hale"
             /db_xref="taxon:3988"
gene        <1..>486
             /locus_tag="RCOM_0732530"
             /db_xref="GeneID:8284091"
CDS         1..486
             /locus_tag="RCOM_0732530"
             /note="encoded by transcript RCOM_0732530A"
             /codon_start=1
             /product="lectin precursor, putative"
             /protein_id="XP_002520497.1"
             /db_xref="GI:255558948"
             /db_xref="GeneID:8284091"
             /translation="MTFCSIHLLLVFAFPFNVQTKTTSFNFTFTQTMFDIVFEGD
ATVVIRAIKLTKSFDLNSNDSVSRATYFKPIHLWDKDMSGKVSDFTTYFSFAINSKDN
ERKNGGFEFFLANKGYKVQASSENGHLGLSNATDVHPFVAVEFDTGYSPKWTRVIERS
T"
```

ORIGEN

```
1 atgactttct gctcaatcat catcctactc ttgacggtgt ttgctttccc tttcaatgct
61 caaacaaaaa caactctttt caatttcacc gaattcacc aaactatggt tgatcctg
121 ttgaaggag acgcaactgt agttattcga gcaattaaac taactaaatc cttgatgat
181 ttgaattcta atgacagtgt tagtcgtgca acatatttca aaccaatcca tctctgggac
241 aaagactccg gtaaggttct agacttcact acttattttt ctttcgctat caactccaaa
301 gataatgaga gaaaaggcaa tggatttgaa ttcttctcg ctaacaaggc ctacaaagtc
361 caggcttcat cagaaaatgg acatcttggc ctttcaaag caaccgatgt gcatccattt
421 gttgctgtgg aatttgatac aggatatagt cctaaatgga cccgagtgat cgagaggagc
481 acatag
```

SIMBOLOGÍA DE AMINOACIDOS

Aminoácido: **Alanina**

Código de tres letras: **Ala**

Código de una letra: **A**

Aminoácido: **Arginina**

Código de tres letras: **Arg**

Código de una letra: **R**

Aminoácido: **Asparagina**

Código de tres letras: **Asn**

Código de una letra: **N**

Aminoácido: **Ácido aspártico**

Código de tres letras: **Asp**

Código de una letra: **D**

Aminoácido: **Cisteína**

Código de tres letras: **Cys**

Código de una letra: **C**

Aminoácido: **Glutamina**

Código de tres letras: **Gln**

Código de una letra: **Q**

Aminoácido: **Ácido glutámico**

Código de tres letras: **Glu**

Código de una letra: **E**

Aminoácido: **Glicina**

Código de tres letras: **Gly**

Código de una letra: **G**

Aminoácido: **Histidina**

Código de tres letras: **His**

Código de una letra: **H**

Aminoácido: **Isoleucina**

Código de tres letras: **Ile**

Código de una letra: **I**

Aminoácido: **Leucina**

Código de tres letras: **Leu**
Código de una letra: **L**

Aminoácido: **Lisina**
Código de tres letras: **Lys**
Código de una letra: **K**

Aminoácido: **Metionina**
Código de tres letras: **Met**
Código de una letra: **M**

Aminoácido: **Fenilalanina**
Código de tres letras: **Phe**
Código de una letra: **F**

Aminoácido: **Prolina**
Código de tres letras: **Pro**
Código de una letra: **P**

Aminoácido: **Serina**
Código de tres letras: **Ser**
Código de una letra: **S**

Aminoácido: **Treonina**
Código de tres letras: **Thr**
Código de una letra: **T**

Aminoácido: **Triptófano**
Código de tres letras: **Trp**
Código de una letra: **W**

Aminoácido: **Tirosina**
Código de tres letras: **Tyr**
Código de una letra: **Y**

Aminoácido: **Valina**
Código de tres letras: **Val**
Código de una letra: **V**

TÉCNICAS

Cromatografía

La característica que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, es que se ponen en contacto dos fases mutuamente inmiscibles. Una fase es estacionaria y la otra móvil. Una muestra que se introduce en la fase móvil es transportada a lo largo de la columna que contiene una fase estacionaria distribuida. Las especies de la muestra experimentan interacciones repetidas (repartos) entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuando ambas fases se han escogido en forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil. Al final del proceso los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado emerge primero, el retenido más fuertemente eluye al último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra.

La columna de separación es el corazón del cromatógrafo. Proporciona versatilidad en los tipos de análisis que pueden realizarse. Esta característica, debida a la amplia gama de selección de materiales para las fases móvil y estacionaria, permite separar moléculas que difieren muy poco en sus propiedades físicas y químicas. En un sentido amplio, la distribución de un soluto entre dos fases es el resultado del balance de fuerzas entre las moléculas del soluto y las moléculas de cada fase. Refleja la atracción o repulsión relativas que presentan las moléculas o iones de las fases competidoras por el soluto y entre sí. Estas fuerzas pueden ser de naturaleza polar, proviniendo de momentos dipolares permanentes o inducidos, o pueden deberse a fuerzas de dispersión del tipo London. En cromatografía de intercambio iónico, las fuerzas en las moléculas del soluto son sustancialmente de naturaleza iónica; pero incluyen también fuerzas polares y no polares.

La fase móvil puede ser un gas o un líquido, mientras que la fase estacionaria sólo puede ser un líquido o un sólido dando lugar a la cromatografía de gases y a la cromatografía líquida.

En la cromatografía líquida, cuando la separación involucra predominantemente un reparto simple entre dos fases líquidas inmiscibles, una estacionaria y la otra móvil, el proceso se llama cromatografía líquido-líquido (LLC). Cuando en la aptitud retentiva de la fase estacionaria intervienen principalmente fuerzas físicas de superficie, el proceso se denomina cromatografía líquido-sólido (LSC, de liquid-solid chromatography) (o de adsorción).

Otros dos métodos de cromatografía líquida difieren un poco en su modo de acción, en cromatografía de intercambio iónico (IEC, de ionic-exchange chromatography), los componentes iónicos de la muestra se separan por el intercambio selectivo con contraiones de la fase estacionaria. En cromatografía de exclusión (EC, de exclusión chromatography), la fase estacionaria proporciona una clasificación de moléculas basadas en su mayor parte en la geometría y el tamaño molecular. Este método también se llama cromatografía de permeación en gel, en la química de los polímeros, y de filtración en gel.

Cuando la fase móvil es un gas, los métodos se llaman cromatografía gas-líquido (GLC), y cromatografía gas-sólido (GSC). Los métodos que implican fases móviles gaseosas y líquidas, serán tratados en forma individual. Aun cuando hay pocas razones fundamentales para estudios

separados, las diferencias en las técnicas de operación y en el equipo justifican su análisis en capítulos individuales.

Cromatografía de afinidad: es un tipo especial de cromatografía de adsorción, utilizada especialmente en bioquímica, en la que un sólido tiene enlazado un llamado ligando de afinidad que puede ser por ejemplo, un indicador enzimático o un anticuerpo.

Si es un líquido que se encuentra soportado en un sólido inerte, se trata de la cromatografía de partición. El soluto se reparte entre la fase móvil (líquido o gas) y la fase estacionaria.

Cromatografía de filtración en gel: Con la cromatografía de filtración en gel se separan moléculas en virtud de sus diferencias de tamaño. La capacidad separadora reside en el gel cuya matriz consta de un gran número de esferas porosas microscópicas. Estas esferas están constituidas por largas cadenas de polímeros unidas entre sí por enlaces químicos para formar una red tridimensional.

Cromatografía de intercambio iónico: El intercambio iónico es el intercambio reversible y estequiométrico de iones entre una fase sólida y una fase líquida.

En las cromatografías vistas anteriormente el equilibrio asociado al fenómeno de retención involucra a cada analito individualmente en una fase u otra. En equilibrios entre iones en solución esto no es posible dado que estamos sujetos a la condición de electroneutralidad que exige que para cada catión haya un anión y viceversa.

Si nos interesa separar analitos catiónicos deberemos utilizar una fase estacionaria que contenga sitios activos negativos, los cuales deberán encontrarse unidos a algún catión que mantenga la electroneutralidad. Este catión deberá ser desplazado por nuestro analito para establecer el equilibrio y unirse al sitio aniónico de la fase estacionaria.

De manera análoga, para separar aniones deberemos utilizar fases estacionarias con cargas fijas positivas que se encontrarán unidas a algún anión encargado de mantener la electroneutralidad, y que será desplazado por nuestro analito para el establecimiento del equilibrio.

Electroforesis

La mayoría de las biomoléculas poseen una carga eléctrica, cuya magnitud depende del pH del medio en el que se encuentran. Como consecuencia, se desplazan cuando se ven sometidas a un campo eléctrico.

Se denomina electroforesis a la técnica mediante la cual se separan las biomoléculas en disolución cuando se ven sometidas a un campo eléctrico. Se trata de una técnica fundamentalmente analítica, aunque también se puede realizar con fines preparativos.

Cada molécula se desplaza por efecto del campo, alcanzando rápidamente una velocidad constante al equilibrarse la fuerza impulsora (fuerza del campo eléctrico) con la resistencia al avance (fuerza de fricción o rozamiento) impuesta por el medio en el que se desplaza.

Fuerza del campo eléctrico = Fuerza de fricción

$$q \cdot E = f \cdot v$$

q = carga (C)

E = intensidad del campo (V/m = N/C)

f = coeficiente de fricción (C·V·s / m² = kg/s)

v = velocidad de la molécula (m/s)

El coeficiente de fricción mide la resistencia intrínseca debida a las características de cada molécula, esencialmente su forma y su tamaño. Así, por ejemplo, las moléculas grandes y asimétricas poseen un mayor coeficiente de fricción que las pequeñas y compactas. La velocidad por unidad de campo recibe el nombre de movilidad electroforética, μ

$$\frac{v}{E} = \mu = \frac{q}{f} = \frac{Ze}{f}$$

(Z = número entero; e = carga del electrón)

En unas condiciones determinadas de electroforesis, la diferente movilidad de cada molécula define su separación en el espacio; al ir transcurriendo el tiempo, se van separando progresivamente unas de otras.

Al ser el medio de soporte a su vez un polielectrolito, está constituido por iones, que son atraídos y así recubren los iones de la muestra, lo que altera el comportamiento de éstos en el campo. Todo ello hace que el tratamiento teórico cuantitativo de la electroforesis sea muy difícil y que esta técnica resulte poco útil para obtener información precisa sobre la estructura de las moléculas. Sin embargo, es enormemente útil como técnica analítica y preparativa.

La muestra debe situarse en o sobre un medio soporte, principalmente para evitar perturbaciones mecánicas y corrientes de convección durante la separación. En algunos soportes (papel o similares) la muestra queda sobre la superficie y avanza a lo largo de ella, con escasa fricción, por lo que el mecanismo principal de separación es la magnitud de la carga de cada componente de la muestra. Otros medios de soporte ("geles", medios semisólidos o gelatinosos) están formados por polímeros que forman una malla, matriz o red tridimensional a través de la cual deben avanzar las moléculas de la muestra, que queda embebida en el medio de soporte electroforético. Como consecuencia, la fricción es notable y los factores de forma y tamaño adquieren una alta relevancia en la separación.

Papel: sencillo, pero con elevada adsorción debido a los grupos hidroxilo de la celulosa.

Acetato de celulosa: los grupos -OH están acetilados, lo que reduce la adsorción; baja tinción de fondo; es posible transparentarla o disolverla para detectar y recuperar los componentes separados.

Almidón: pasta de almidón cuyos granos se han disgregado en un tampón caliente (se hinchan). Actualmente se utiliza poco, ha sido sustituido por la poliacrilamida.

Agarosa: polisacárido, producto purificado de algas (composición similar al agar-agar). Se disuelve en caliente (50-60°C) y al enfriar solidifica formando un gel, de alta porosidad.

Poliacrilamida: el gel es el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida. Regulando la concentración de ambas y su proporción se consiguen distintas porosidades, siempre menores que la de los geles de agarosa.

