



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Actividad antiinflamatoria de proteínas tipo lectina de *Acacia
cornigera* L. Willd en un modelo murino

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

ALEJANDRA SOFÍA ÁLVAREZ MARQUINA

Laboratorio de Terapia Molecular L-7

JURADO DE EXÁMEN

DIRECTORA: CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ

ASESOR: ERNESTO MENDOZA VALLEJO

ASESOR: GENARO MONTAÑO ARIAS

SINODAL: MARGARITA

SINODAL: CARLOS ALBERTO SANTANA



Ciudad de México, Noviembre 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

- Agradezco a la maestra Catalina por haberme permitido formar parte de este laboratorio, por brindarme su confianza, por siempre tener algún consejo y principalmente por apoyarme tanto en múltiples aspectos para lograr realizar este trabajo hasta el final.
- Muchas gracias al profesor Ernesto por siempre brindar palabras de aliento en momentos difíciles.
- Gracias infinitas a mi familia, por estar siempre dispuestas a escuchar y por buscar siempre la manera de apoyarme con cada decisión.

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada con mucho cariño a mi familia y amistades, por estar presentes en cada paso de este proyecto.

- A mi mamá, quien me ha dado la fuerza para enfrentar cada una de las dificultades que se presentan. Gracias por recordarme que a veces es necesario tomar una pausa para poder seguir adelante y por enseñarme a ser paciente; pero sobretodo gracias por todo tu cariño.

A mis hermanas:

- Laura, quien sé que a pesar de las grandes dificultades que pueda estar pasando en su propia vida, siempre me hace sentir amparada; quien jamás dejará de brindarme un abrazo o un “te quiero” cuando ni yo sé que lo necesito.
- Bárbara, que de una manera muy particular me recuerda la importancia de mantenerme con los pies en la tierra y solo concentrarme en el presente, para no abrumarme por un futuro incierto.
- Ingrid, quien siempre me recuerda que la frustración es normal, pero que aún con mis emociones, solo debo hacer lo que me corresponde y ocuparme de las cosas que realmente están en mi control.

Gracias por siempre estar presentes, por hacerme sentir entendida y acompañada en cada paso. Cada logro en mi vida es posible por su cariño y apoyo. Las amo.

A mi mejor amigo, Emmanuel, por siempre hacerme reír, por su gran ayuda dentro del laboratorio; por escucharme, entenderme y tenerme paciencia; por recordarme lo capaz que soy y recordarme que puedo llegar a ser un ejemplo. Te quiero.

Índice

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	7
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1 INFLAMACIÓN.....	11
2.2 BLANCOS DE INFLAMACIÓN.....	12
2.3 FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS.....	13
2.4 GLICOSILACIÓN.....	15
2.5 LECTINAS.....	16
2.6 ACACIA CORNIGERA (L.) WILLD.....	23
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVOS.....	26
OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
6. MATERIAL Y MÉTODO.....	27
6.1 RECOLECTA DEL MATERIAL VEGETAL.....	27
6.2 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.....	27
6.3 DESGRASADO DEL MATERIAL VEGETAL.....	27
6.4 EXTRACCIÓN SALINA.....	27
SEMIPURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	28
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	28
CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES TOTALES.....	29
PRUEBAS DE HEMAGLUTINACIÓN.....	29
EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO.....	29
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
7. RESULTADOS.....	32
7.1 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.....	32
7.2 EXTRACCIÓN SALINA DE LECTINAS VEGETALES.....	32
7.3 PRUEBAS DE HEMAGLUTINACIÓN.....	33
7.4 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.....	37
7.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	41
7.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO.....	43
8. DISCUSIÓN.....	53
9. CONCLUSIÓN.....	56
10. REFERENCIAS.....	57

Índice de Abreviaturas

AA	Ácido Araquidónico
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
Asn	Asparagina
CDR	Sitio de Reconocimiento a Carbohidratos
COX	Ciclooxigenasa
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
IFN- γ	Interferón Gamma
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleucinas
Malt	Maltosa
Man	Manosa
MBL	Lectina de Unión a Manosa
NaCl	Cloruro de sodio
Neu5Ac	Ácido Siálico
PBS	Buffer Fosfato Salino
RER	Retículo Endoplásmico Rugoso
RI	Respuesta Inflamatoria
RIA	Respuesta Inflamatoria Aguda
RIC	Respuesta Inflamatoria Aguda
Sac	Sacarosa
Ser	Serina
Thr	Treonina
TNF	Factor de Necrosis Tumoral

Índice de Figuras

Figura 1. Interacción de las lectinas con los residuos de carbohidratos en la membrana de los eritrocitos en un ensayo de hemaglutinación para la detección de lectinas.	16
Figura 2. Representación esquemática de lectinas según su estado de maduración	19
Figura 3. Estructura general de las lectinas de leguminosas. A) Tetrámero con dominios de reconocimiento a carbohidratos.	20
Figura 4. Estructura de los antígenos del sistema ABO	21
Figura 5. Aplicación de las lectinas en biomedicina	22
Figura 6. Fotografía del lugar donde se recolectó a <i>A. cornigera</i> en Plan de Limón, Veracruz... ..	23
Figura 7. Diluciones de eritrocitos en suero fisiológico	32
Figura 8. Asignación del grado de hemaglutinación en los extractos acorde a la cantidad de agregados eritrocitarios formados	33
Figura 9. Pruebas de hemaglutinación en grupo sanguíneo A ⁺ transcurridas tres horas.....	34
Figura 10. Pruebas de hemaglutinación en grupo sanguíneo B ⁺ transcurridas tres horas.....	35
Figura 11. Pruebas de hemaglutinación en grupo sanguíneo O ⁺ transcurridas tres horas.....	36
Figura 13. Pruebas de hemaglutinación en grupo sanguíneo A ⁺ transcurridas tres horas.....	38
Figura 14. Pruebas de hemaglutinación en grupo sanguíneo B ⁺ transcurridas tres horas.....	39
Figura 15. Pruebas de hemaglutinación en grupo sanguíneo O ⁺ transcurridas tres horas.....	40

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de lectinas vegetales por su especificidad a monosacáridos que inhiben su actividad hemaglutinante. formados	18
Tabla 2. Diseño experimental para la administración de tratamientos.....	29
Tabla 3. Rendimiento porcentual de ácidos grasos obtenidos de las hojas de <i>A. cornigera</i> antes y después de desgrasar con hexano.	31
Tabla 4. Concentración de proteínas y carbohidratos totales en los distintos extractos salinos de <i>A. cornigera</i> con los dos métodos de cuantificación empleados.	32
Tabla 5. Relación proteínas-carbohidratos en las fracciones del extracto obtenidas por cromatografía en columna.....	37
Tabla 6. Relación proteínas-carbohidratos con el grado de hemaglutinación de las fracciones del extracto de <i>A. cornigera</i>	41

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Efecto inflamatorio por inducción de edema con albúmina en la pata trasera derecha en ratones CD1.....	42
Gráfica 2. Efecto inflamatorio del extracto crudo de <i>A. cornigera</i> en la inducción de edema con albumina en la pata trasera derecha en ratones CD1.....	43
Gráfica 3. Efecto inflamatorio de la fracción obtenida de Maltosa de <i>A. cornigera</i> en la inducción de edema con albumina en la pata trasera derecha en ratones CD1.....	44
Gráfica 4. Efecto inflamatorio de la fracción de Glucosa de <i>A. cornigera</i> en la inducción de edema con albumina en la pata trasera derecha en ratones CD1.....	45
Gráfica 5. Efecto inflamatorio de la fracción de Galactosa-Sacarosa de <i>A. cornigera</i> en la inducción de edema con albumina en la pata trasera derecha en ratones CD1.....	46
Gráfica 6. Efecto inflamatorio de la fracción de Manitol-Maltosa de <i>A. cornigera</i> en la inducción de edema con albumina en la pata trasera derecha en ratones CD1.....	47
Gráfica 7. Permeabilidad vascular de los órganos en presencia de los distintos extractos representada en concentración (ug/mL) de Azul de Evans.....	48
Gráfica 8. Concentración de Azul de Evans (ug/mL) en los riñones de ratones CD1. Permeabilidad vascular del riñón en presencia de los distintos extractos.	49
Gráfica 9. Concentración de Azul de Evans (ug/mL) en los riñones de ratones CD1. Permeabilidad vascular del bazo en presencia de los distintos extractos.	50
Gráfica 10. Concentración de Azul de Evans (ug/mL) en los riñones de ratones CD1. Permeabilidad vascular del hígado en presencia de los distintos extractos.....	51

Resumen

Las lectinas son una clase de proteínas cuya principal característica es la aglutinación celular, particularmente de eritrocitos. Una de las familias más estudiadas por sus múltiples aplicaciones en biomedicina son las lectinas aisladas de leguminosas. *Acacia cornígera* es una planta de la familia fabácea (leguminosas) que no cuenta con estudios acerca de lectinas. En este estudio se aislaron y caracterizaron proteínas tipo lectina, de hojas de *A. cornígera*, recolectada en el ejido Limón Chiquito, Cazonas de Herrera, Veracruz. Se analizó su actividad biológica en células sanguíneas del sistema ABO RH⁺ y su capacidad antiinflamatoria en ratones de la cepa CD-1. Se encontró la presencia de proteínas con actividad hemaglutinante en todos los extractos salinos, las cuales mostraron alta afinidad por las combinaciones de azúcares Maltosa-Galactosa, Sacarosa-Glucosa, seguidas de Glucosa y Maltosa. Se observó actividad hemaglutinante no específica para este sistema sanguíneo, sin embargo, los extractos revelaron mayor afinidad por el grupo sanguíneo B⁺. Concluyendo que las lectinas enlazadas a Glucosa conservan su efecto antiinflamatorio hasta 120 minutos y la fracción de Manitol-Maltosa es efectiva durante los primeros 60 minutos, lo que demuestra la variabilidad en su respuesta fisiológica.

1. Introducción

La inflamación es una respuesta fisiológica relacionada con la reparación de daño generado por agentes endógenos o exógenos hacia células y tejidos vascularizados (García, 2008). Se caracteriza por cinco signos clínicos: dolor, calor, rubor, tumor y ocasionalmente impotencia funcional. Por el tiempo de duración la inflamación se puede clasificar en aguda y crónica. La fase aguda tiene lugar inmediatamente después de que se provoca algún daño al organismo (minutos a horas); sus características principales son la formación de edema y la migración de leucocitos (especialmente neutrófilos). Si el estímulo dañino persiste o no hay resolución satisfactoria de la inflamación, se convierte en inflamación crónica (Cervantes *et al.*, 2014), la cual ocurre en días, semanas y hasta meses. Se caracteriza por la proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis tisular (León *et al.*, 2015). En el proceso inflamatorio participan mecanismos tanto de la respuesta inmune innata como de la adquirida. En el caso de la fase aguda, participa principalmente la respuesta innata, que posteriormente activa a la adquirida. Mientras que en la fase crónica, aunque pueden activarse mecanismos de la respuesta innata, es la adquirida la que mantiene el proceso en el tiempo y causa daño tisular (González y Padrón, 2019).

Para evitar o disminuir la inflamación se utilizan fármacos de dos tipos: antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos. Los primeros son compuestos muy potentes y de gran efectividad, derivados del cortisol, una hormona producida por la corteza adrenal para la adaptación del organismo al estrés (Serra *et al.*, 2012), que pertenece a un grupo particular de corticoides, los glucocorticoides. Estos inhiben la dilatación vascular y disminuyen la formación de edema pues impide el paso de leucocitos a la zona de daño e interfiere con la respuesta inmune celular y la producción o efecto de mediadores de la inflamación (Flórez y Amado, 2014). Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son compuestos que actúan sobre enzimas (ciclooxigenasas) implicadas en la producción de prostaglandinas. Además de reducir la inflamación, tienen acción, analgésica y antipirética (Divins, 2014), por lo que alivian el dolor y disminuyen la fiebre. Sin embargo el uso de antiinflamatorios de cualquier tipo, se ve limitado por los efectos secundarios que trae consigo sobre el metabolismo, principalmente a nivel gastrointestinal, renal y plaquetario. Lo anterior, ha llevado a la comunidad científica a buscar en otras fuentes alternativas para contrarrestar la inflamación, encontrando que los sacáridos cumplen un papel crucial dentro del proceso inflamatorio. Para comprender las funciones biológicas y

posibles alteraciones de los sacáridos se debe conocer más acerca de su estructura química, las enzimas que catalizan su biosíntesis y las lectinas que los reconocen (Gimeno y Barbeito, 2004)

En glicobiología, la glicosilación ha sido reconocida como una de las modificaciones más importantes de las proteínas (Van Damme, 2011), pues juega un papel vital en procesos biológicos como la inflamación, la fecundación, la diseminación de células tumorales (Gimeno y Barbeito, 2004), la respuesta inmune (permiten que un organismo distinga proteínas ajenas de las propias), el plegamiento de proteínas y determinación de su vida media en el torrente sanguíneo (Palomares, 2005). Cambios en la glicosilación pueden derivar en enfermedades como el cáncer. Por ello la identificación de modificaciones discretas de carbohidratos y la comprensión de sus efectos biológicos, proporciona novedosos objetivos para la investigación (Cuello, 2018). Dentro del proceso inflamatorio, la infiltración de neutrófilos de la sangre al tejido afectado es un rasgo distintivo de la inflamación aguda, pero para que esto ocurra primero deben unirse a selectinas (lectinas eucariotas de tipo C). Las interacciones que involucran selectinas dependen del reconocimiento de glicoconjugados específicos de la superficie celular (Assreuy *et al.*, 1997). Debido a que las lectinas pueden unirse a carbohidratos específicos sin modificar su estructura, en los últimos años, se han hecho estudios detallados sobre ellas, especialmente de la familia de las leguminosas, ya que presentan múltiples aplicaciones en biomedicina (Lagarda *et al.*, 2017). Algunos de los más recientes incluyen el estudio de su efecto anti-coronavirus, donde se plantea el uso de estas proteínas para conocer del sitio de reconocimiento del epítipo del virus, neutralizando así el efecto de virulencia por la respuesta inmune desencadenada, así como usarlas con objeto de inhibir el ciclo de replicación del SARS-CoV al interferir con la unión viral a la célula huésped (Konozy *et al.*, 2022). Aunque los efectos inflamatorios de las lectinas han sido estudiados, los mecanismos aún no se conocen bien (Gong *et al.*, 2017). Se sabe que las lectinas vegetales son capaces de modular la secreción de citocinas, principalmente las que participan en el proceso inflamatorio; sin embargo, se ha demostrado que hay lectinas vegetales que inhiben la inflamación, pero existen otras que la promueven, por lo que el papel de estas proteínas en el proceso inflamatorio sigue siendo controversial (Mishra *et al.*, 2019). Freitas y colaboradores (2015) demostraron que una lectina aislada de *Dioclea violacea*, perteneciente a la familia de las leguminosas, presenta propiedades antiinflamatorias, de manera que inhibe la migración de neutrófilos tras la inflamación al administrarse vía intravenosa. *Acacia cornigera* es una planta que pertenece a la familia de las leguminosas; sin embargo, sus efectos biológicos han sido poco

estudiados, teniendo solo un reporte de actividad antiinflamatoria (Maldini *et al.*, 2009). En este trabajo se evaluó el efecto antiinflamatorio de extractos enriquecidos en proteínas tipo lectina de hojas de *A. cornigera*.

2. Marco Teórico

2.1 Inflamación

De manera natural el organismo cuenta con mecanismos de defensa a tres niveles: barrera externa, sistemas inespecíficos, y respuestas antígeno-específicas. Una respuesta inicial y por lo tanto inespecífica, es la inflamación, proceso fisiológico de origen inmune ante el daño por agentes endógenos y exógenos hacia las células y tejidos vascularizados (García, 2008). En esta respuesta, se producen cambios hemodinámicos que dan a lugar a los signos clásicos asociados a la inflamación: dolor, tumor, por la extravasación de líquido al sitio de daño; calor y rubor, por el aumento de flujo sanguíneo e incremento de la disponibilidad de oxígeno; y ocasionalmente impotencia funcional (García *et al.*, 2000).

La respuesta inflamatoria (RI) está relacionada con la reparación y es útil para destruir, atenuar o mantener localizado al agente lesivo (León *et al.*, 2015). Según su tiempo de evolución se puede clasificar como respuesta inflamatoria aguda (RIA) o crónica (RIC).

2.1.1 Inflamación Aguda

Enseguida de un estímulo dañino, se lleva a cabo la RIA, que ocurre los primeros minutos y puede perdurar unas horas. Para producir esta respuesta, se activa la respuesta inmune innata que posteriormente activará a la adquirida. Es en esta fase donde se presentan los signos clínicos típicos de la inflamación (calor, rubor, tumor, dolor e impotencia funcional). Su objetivo es neutralizar el agente agresor, controlar el proceso inflamatorio y promover el proceso de reparación, iniciando el retorno a la normalidad fisiológica (Brandan *et al.*, 2007). Es una respuesta coordinada por una cascada de mediadores inflamatorios, especialmente citocinas que inducen la activación, proliferación, cambios del comportamiento y cambios metabólicos de una serie de células, dejando que actúen en primer lugar los neutrófilos, posteriormente acuden los macrófagos y por último los linfocitos. También intervienen hormonas, fundamentalmente glucocorticoides naturales.

2.1.2 Inflamación Crónica

La RI tiene una serie de puntos de control que limitan la duración y magnitud de la inflamación, sin embargo, hay ocasiones en que las causas de la inflamación no son resueltas con éxito, es entonces cuando entra la fase crónica, que se lleva a cabo en días, semanas y hasta meses. En esta fase participan algunos mecanismos de la respuesta innata, pero es la adquirida la que mantiene el proceso en el tiempo y causa daño tisular (González y Padrón, 2019). Sus características distintivas son la infiltración de macrófagos, linfocitos y células dendríticas en el sitio de mayor daño, lo que induce la producción de citocinas, factores de crecimiento y enzimas, que contribuyen a la progresión de daño tisular, llegando a generar necrosis. En estos casos se requiere la administración de medicamentos antiinflamatorios, aunque estos solo atenuarán los síntomas, sin resolverlos completamente (Coico y Sunshine, 2015). Si no se solucionan las causas y se reparan los daños de la fase crónica, el organismo puede desarrollar enfermedades autoinmunes, metabólicas, crónicas y degenerativas, como la artritis reumatoide.

2.2 Blancos de inflamación

Durante el proceso inflamatorio se ven afectados múltiples órganos del cuerpo, sin embargo, el bazo, el hígado y los riñones se verán mayormente involucrados ya que, además de ser órganos altamente vascularizados, intervienen mediante diversos mecanismos en la respuesta inmunológica.

2.2.1 Hígado

Detrás de las costillas y cartílagos costales, bajo el diafragma, se encuentra el hígado, un órgano de gran tamaño (aproximadamente 2.5 kg en adultos) (Pedone, 2013) formado por células llamadas hepatocitos, los cuales se encargan de la producción de bilis (esta se almacena en la vesícula biliar para su liberación cuando sea requerida). Entre sus componentes están los ácidos biliares, electrolitos, colesterol y bilirrubina. Dichas sustancias tienen funciones digestivas y excretoras (Gálvez, 2022).

El hígado es el principal órgano que participa en la regulación metabólica, tanto de moléculas como carbohidratos, lípidos y proteínas, como de vitaminas, hormonas y fármacos. almacena vitaminas solubles en lípidos y ciertos minerales. Interviene en el metabolismo de los fármacos, así como en la desintoxicación y eliminación de hormonas y amoniaco; y participa en el sistema inmune con la fagocitosis de macrófagos (Pozo et al., 2016)., síntesis de TNF- α y la liberación de IgA.

2.2.2 Riñones

Los riñones son órganos pares de color pardo rojizo, que en los humanos están localizados en la parte posterior del perineo, en los costados de la columna vertebral. Su tamaño promedio en adultos es de 10-12 cm de longitud, 5-7 cm de ancho y 3 cm de espesor, con un peso aproximado de 115-155 g en mujeres y de 125-170 g en hombres (Fernández *et al.*, 2005). La función principal de los riñones consiste en regular la composición del líquido extracelular mediante el mantenimiento del equilibrio hídrico y electrolítico, el cual es posible gracias a su función excretora, por la cual son desechados los solutos y agua que haya en exceso, ya sea que estos se hayan producido por el cuerpo o sean resultado del consumo de medicamentos. También regulan la presión arterial mediante secreción de factores vasoactivos como la renina; la eritropoyesis, por la producción de eritropoyetina; la producción de vitamina D. Así mismo, participa en la gluconeogénesis, particularmente en situaciones de ayuno prologado (Eaton y Pooler, 2006).

2.2.3 Bazo

El bazo es un órgano vascular localizado detrás del estómago, en el cuadrante superior izquierdo del abdomen, con una porción que se extiende hasta la región epigástrica (Ladrón, 2015). Es un importante filtro sanguíneo que elimina eritrocitos viejos o dañados (Barret *et al.*, 2010) y su papel principal es inmunológico, ya que el inicio de la RI y la elaboración de los antígenos ocurre en la zona marginal del bazo. Produce además IgM contra los antígenos bacterianos y es responsable de la fagocitosis. Almacena plaquetas (células involucradas en la reparación de lesiones vasculares), eritrocitos y granulocitos. De igual forma, es uno de los órganos donde maduran los linfocitos (Ramírez *et al.*, 2016). Lo anterior se debe a que se compone de dos tipos de tejido: pulpa blanca y pulpa roja, la primera está formada principalmente por tejido linfoide, donde se localizan tanto linfocitos B, organizados tanto en agregados de células B vírgenes como en folículos con centros germinales con células de memoria, células dendríticas foliculares y macrófagos fagocíticos como linfocitos T. La pulpa roja contiene macrófagos, eritrocitos, plaquetas, granulocitos y linfocitos maduros, así como numerosas células plasmáticas (Fernández *et al.*, 2005).

2.3 Fármacos Antiinflamatorios

Aunque hay múltiples fármacos que tienen propiedades antiinflamatorias, solo se reconocen dos grupos de fármacos para el tratamiento de los síntomas de la inflamación: antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos (AINE) (Divins, 2014).

2.3.1 Antiinflamatorios esteroideos

En la corteza adrenal se producen tres tipos de hormonas: glucocorticoides, mineralocorticoides y hormonas gonadales. De estas, solo se ha visto efecto antiinflamatorio por parte de los glucocorticoides y en farmacología se han fabricado corticoides semisintéticos derivados del cortisol, que tienen características estructurales y farmacológicas similares a los que produce el organismo (Divins, 2014), pero con mayor potencia y efectividad. Actúan formando en el citoplasma un complejo entre un receptor esteroideo con el glucocorticoide, posteriormente entra en el núcleo donde inhiben la transcripción de genes que codifican quimiocinas, moléculas de adhesión y enzimas reguladoras de la síntesis de mediadores (ciclooxigenasa 2, metaloproteasas óxido nítrico sintasa inducible), citocinas como las interleucinas (IL) 1, 2, 3, 5, 6, 8 y 12, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Serra *et al.*, 2012). Además, disminuyen la supervivencia de eosinófilos y reducen la presencia de linfocitos, basófilos y células presentadoras de antígenos, inhiben la exudación de plasma y la secreción mucosa glandular, así como la disminución de otras células como los linfocitos o los basófilos (Cosío *et al.*, 2002). Sin embargo, existen efectos adversos (generalmente dependientes de la dosis) como aumento de peso, retención de sodio y agua, hipertensión, alteración de la barrera mucosa gastrointestinal, fallo renal, entre otros (Florez y Amado, 2014). Lo anterior ha llevado a la comunidad científica a buscar en fuentes alternativas para contrarrestar la inflamación, encontrando que los sacáridos cumplen un papel crucial dentro del proceso inflamatorio. Para comprender las funciones biológicas y posibles alteraciones de los sacáridos se debe conocer más acerca de su estructura química, las enzimas que catalizan su biosíntesis y las lectinas que los reconocen, siendo este último punto central en este estudio.

2.3.2 No esteroideos

Los AINEs son un grupo de fármacos que además de reducir la inflamación, alivian el dolor y disminuyen la fiebre por su acción analgésica y antipirética (Divins, 2014). Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la actividad de alguna de las isoformas de la ciclooxigenasa, enzima que promueve la síntesis de prostaglandinas. La ciclooxigenasa (COX) presenta al menos dos isoformas con funciones distintas: COX-1 y COX-2. La primera regula procesos como la protección gastrointestinal, agregación plaquetaria, función renal y la homeostasis vascular (Gómez *et al.*, 2013). Por ello los AINEs que la inhiben suelen tener efectos secundarios a estos niveles. La COX-2 es quien está implicada directamente en el proceso inflamatorio, pues su

expresión es provocada por mediadores como INF- γ , TNF- α , IL-1, entre otros (Feria, 2014). Sin embargo, continúa la búsqueda de alternativas con mayor efectividad, selectividad y menos efectos secundarios, ya que no todos los AINEs son selectivos de esta enzima e inhiben ambas isoformas. La indometacina pertenece a este último grupo.

La indometacina es un derivado del ácido indolacético con el nombre químico de ácido 1- (p-clorobenzoil) 25-metoxi-2-metilindol-3-acético. Se cree que su efecto farmacológico está mediado por una inhibición potente y no selectiva de la enzima ciclooxigenasa (COX), a través de la vía del ácido araquidónico (AA). La indometacina, está disponible actualmente en forma de cápsulas orales, así como en otros métodos de administración, incluidas formulaciones rectales e intravenosas (Drugbank, 2024).

2.4 Glicosilación

Además de tener funciones estructurales y servir como principal fuente de energía para el organismo, los carbohidratos desempeñan un papel importante en la señalización celular, pues modifican a otras moléculas (lípidos y proteínas) mediante un proceso llamado glicosilación. En esta modificación postraduccional los glicanos se enlazan de forma covalente a lípidos y proteínas, lo que resulta en la formación de glicoconjugados. Este proceso les proporciona a las proteínas mayor estabilidad ante las modificaciones del medio, así como características estructurales y funcionales particulares que son relevantes en interacciones ligando-receptor y, por ende, participa en procesos como la diferenciación celular, el desarrollo del cáncer, la infectividad viral, bacteriana y parasitaria (Pérez *et al.*, 2013). Aunque se encuentran múltiples glicoconjugados al interior de la célula, gran parte de ellos están en la superficie externa de la membrana celular, proporcionándole a las células una cubierta azucarada comúnmente conocida como glicocáliz, un arreglo glicosídico diverso, complejo, variable estructuralmente y exclusivo de cada organismo (Medrano *et al.*, 2023).

La glicosilación es un proceso sofisticado altamente orquestado por múltiples enzimas (glicosidasas y glicosiltransferasas). Los tipos de glicanos que existen se clasifican acorde con el tipo de modificación que sufran, teniendo N-glicanos y O-glicanos.

2.4.1 N-glicosilación

Los N-glicanos son complejos macromoleculares que se forman en el retículo endoplásmico rugoso (RER). Este proceso inicia con la síntesis de un oligosacárido común constituido por 14 residuos de monosacáridos: dos N-acetil glucosamina (GlcNAc), nueve manosas (Man) y tres glucosas

(Glc), que se unen a dolicol fosfato, un transportador lipídico anclado a la membrana del RER. Posteriormente es transferido al extremo amino (NH₂) de la cadena lateral de la asparagina (Asn) (Gorocica *et al.*, 2008) que forma parte de una secuencia consenso Asn-X-Ser o Asn-X-Thr (Pérez *et al.*, 2013). Finalmente termina su modificación en el aparato de Golgi.

2.4.2 O-glicosilación

Las cadenas oligosacáridicas tipo O son mucho más complejas que las tipo N. Esta modificación ocurre directamente en el aparato de Golgi, comenzando con la unión covalente de los carbohidratos a grupos hidroxilo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) formando una cadena lateral de un residuo de Serina (Ser) y Treonina (Thr) presente en el esqueleto polipeptídico, que resulta en el antígeno “Tn” (GalNAc-Thr/Ser) (Pérez *et al.*, 2013) siendo este el precursor de otras moléculas.

2.4.3 Importancia de la glicosilación

Alteraciones en la glicosilación, sus componentes e interacciones, pueden llevar a fallas letales del organismo, puesto que este proceso juega un papel significativo en múltiples funciones biológicas como la respuesta inmune, fecundación, replicación viral, infección por parásitos, crecimiento celular, inflamación, adhesión celular (Rosenfeld *et al.*, 2008), transducción de señales, migración y comunicación celular (Muller *et al.*, 2004). En su mayoría estos procesos están mediados por el reconocimiento e interacción proteína-carbohidrato. Además, existen estudios que demuestran que modificaciones en la glicosilación tienen relación con el desarrollo y evolución de ciertos tipos de cáncer (Gorocica *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2013; Theodoratou *et al.*, 2014). Dado el papel tan relevante de las interacciones proteína-carbohidrato en estos procesos, se requieren herramientas que faciliten el estudio más profundo de las mismas.

2.5 Lectinas

Las lectinas son un grupo grande y heterogéneo de proteínas o glicoproteínas con gran estabilidad, de origen no inmune, sin actividad enzimática, que tienen la capacidad de unirse de forma específica y reversible a sacáridos (mono y oligosacáridos) sin alterar la estructura de estos. Esto se debe a su propiedad polivalente (Khan *et al.*, 2002), es decir que en su estructura, presentan al menos dos sitios de reconocimiento a carbohidratos, lo cual les permite unirse a los glicoconjugados de la superficie celular, formando entramados de ellas (Clavijo, 2018), de ahí su capacidad característica de aglutinación celular, particularmente de eritrocitos (Figura 1).

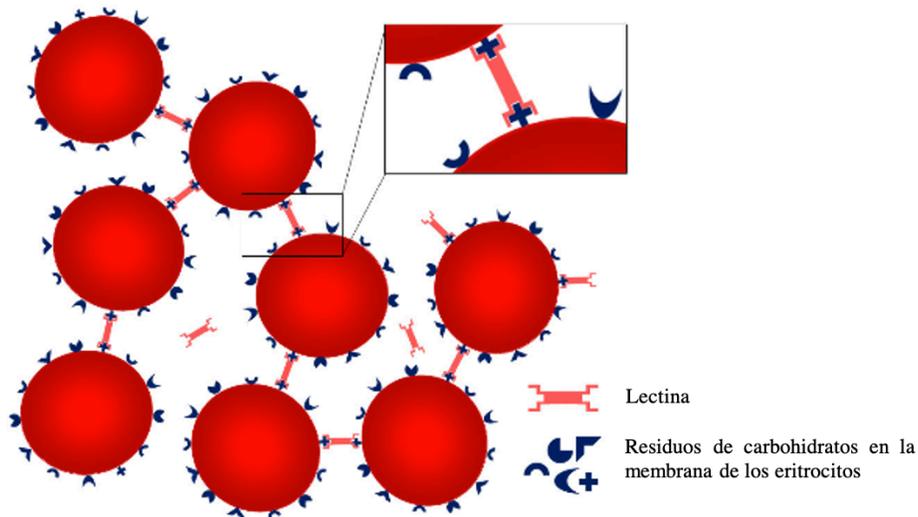


Figura 1. Interacción de las lectinas con los residuos de carbohidratos en la membrana de los eritrocitos en un ensayo de hemaglutinación para la detección de lectinas. Modificado de Gallegos *et al.*, 2022.

A nivel celular las lectinas son sintetizadas en RER y son procesadas para la eliminación del péptido señal, la escisión proteolítica del péptido C-terminal y la adición de oligosacáridos a la cadena polipeptídica en los residuos de Asn, lo que resulta en dos protómeros de uno o dos dominios. Si es un dominio, este tendrá una masa de 11-14 kDa que originan un monómero, si son dos dominios, tendrán un peso de 30 kDa que originan dos monómeros con masas similares, que pueden combinarse para formar homo/hetero-dímeros o tetrámeros; y son transportadas para su acumulación en vacuolas o cuerpos proteicos (Flores, 2016).

El término lectina fue acuñado hasta 1954 por Boyd y Shapleig (Mishra *et al.*, 2019). Anteriormente se les nombraba hemaglutininas por su capacidad de aglutinar glóbulos rojos, o fitohemaglutininas puesto que la mayoría eran aisladas de plantas y semillas, de modo que, en 1888, Hermann Stillmark realizó el primer estudio sobre “lectinas” con una fitohemaglutinina aislada de ricino (*Ricinus communis*). Con los años, los investigadores descubrieron que estas proteínas pueden ser aisladas de diversas fuentes: virus, bacterias, hongos, animales, líquenes y plantas, aunque esta última sigue siendo la principal fuente de obtención, por su fácil manejo.

2.5.1 Lectinas vegetales

Aunque en las plantas, las lectinas pueden estar presentes en la savia del floema o en el néctar (Flores, 2016), principalmente se encuentran en los cotiledones, en el endospermo, constituyendo del 2 al 10% del total de las proteínas (Flores, 2012) y en segunda instancia en órganos de reserva, siendo esto 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 como fuente de nitrógeno o como factor de reconocimiento específico, sino que también interactúan con los glicoconjugados de otros organismos (Mendoza, 2007).

2.5.2 Estructura y clasificación de las lectinas

La estructura general de las lectinas se constituye de una cadena polipeptídica a la que se unen de 1 a 15 monosacáridos residuales formados por dos o más azúcares. Esta cadena toma una forma tridimensional, dentro de la que se encuentran los sitios de interacción glicosídica. Dependiendo la naturaleza de la molécula y su estado de oligomerización (Santos *et al.*, 2014), puede haber de 2 a 12 sitios de reconocimiento a carbohidratos (CDR), por lo que llegan a presentar especificidad conformacional (Gallegos *et al.*, 2022). Al formar complejos con los azúcares, la estabilidad y especificidad de estas moléculas está dada por puentes de hidrógeno principalmente, pero también por interacciones de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas de aminoácidos aromáticos cerca de las porciones hidrofóbicas de los monosacáridos. Están formadas por residuos de aminoácidos con alto contenido de ácido glutámico/glutamina, ácido aspártico, asparagina, serina, glicina, y bajo contenido de lisina.

Se han clasificado de acuerdo a diversos parámetros:

- Por su especificidad hacia monosacáridos que inhiben su actividad aglutinante (Tabla 1) y hacia estructuras de oligosacáridos al que se unen, teniendo lectinas que reconocen O-glicanos (oligosacáridos unidos covalentemente a residuos de Ser o Thr con unión a una GalNAc) o N-glicanos (oligosacáridos unidos de forma covalente a residuos de asparagina en una secuencia consenso: Asn-X-Ser/Thr unida a una GlcNAc)
- Por su forma y número de cadenas polipeptídicas: diméricas, tetraméricas, octaméricas y decaméricas (Vázquez *et al.*, 2012).

Tabla 1. Clasificación de lectinas vegetales por su especificidad a monosacáridos que inhiben su actividad hemaglutinante.

Monosacárido	Lectina	Abreviatura
α -D-manosa, α -D-glucosa	<i>Canavalia ensiformis</i>	ConA
	<i>Lens clinaris</i>	LCA
β -galactosa, N-acetil- α -D-galactosamina	<i>Ricinus communis</i>	RCA
	<i>Glycine max</i>	SBA
	<i>Arachis hypogaea</i>	PNA
	<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL
N-acetil- β -D-glucosamina	<i>Triticum vulgare</i>	WGA
α -D-fucosa	<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA
	<i>Ulex europeus</i>	UEA
α -N-acetilneuramínico	<i>Limulus polyphemus</i>	LPA

Modificada de Hernández *et al.*, 2005.

- Por su estado de maduración: merolectinas, que son monovalentes (solo tienen un CDR) por que lo que no aglutinan células; hololectinas, con dos o más CDR; chimerlectinas, que se forman por fusiones de proteínas que además de contener al menos un CDR, cuentan con un dominio enzimático o con otra actividad biológica; y superlectinas, cuentan con al menos dos CDR que reconocen carbohidratos no relacionados estructuralmente (Figura 2) (Flores, 2016).

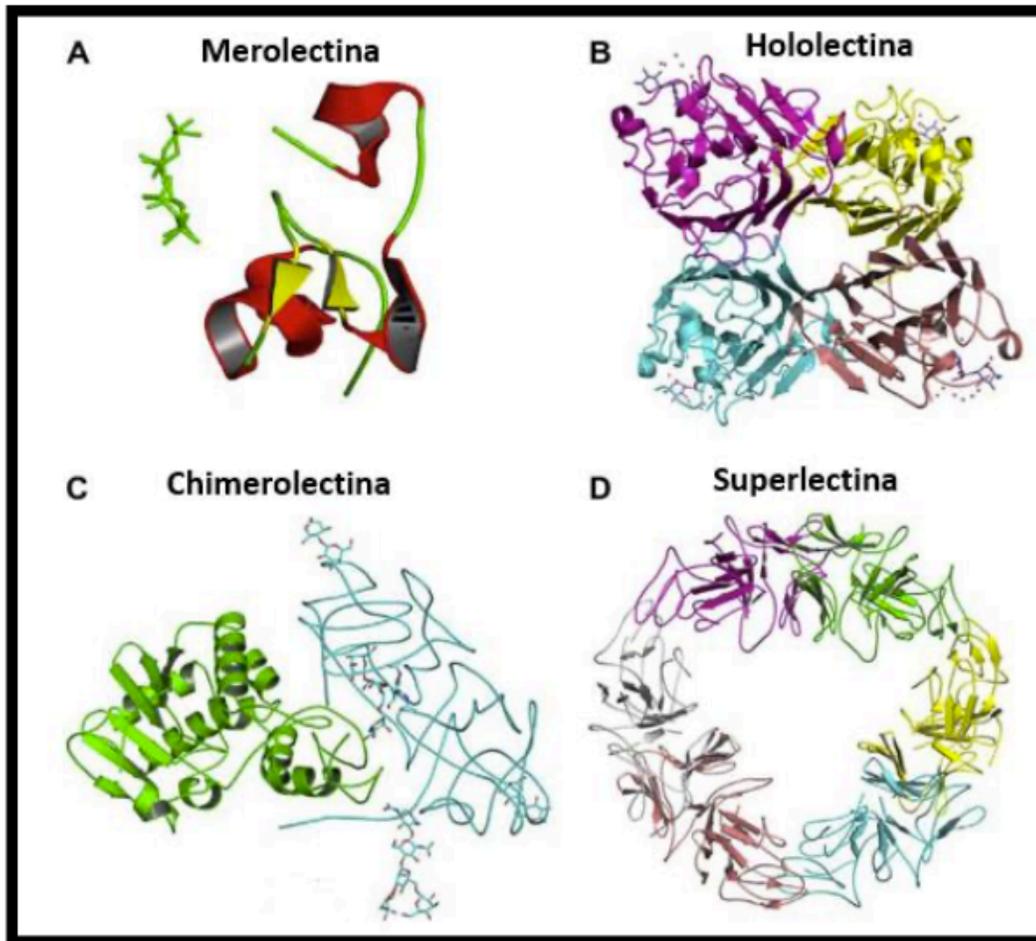


Figura 2. Representación esquemática de lectinas según su estado de maduración (Flores, 2016)

- Por especificidad de reconocimiento a diferentes carbohidratos. Existen al menos cinco grupos de lectinas según su enlace a manosa (Man), (Gal/GalNAc), N- acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc) o ácido siálico (Neu5Ac), respectivamente (Molist *et al.*, 2017).
- Por su estructura molecular. Esta clasificación es la más utilizada actualmente y se conforma por siete familias: lectinas de floema de *Curcubitaceae*, lectinas de unión a quitina con dominio heveína, inactivadoras de ribosomas tipo 2, lectinas de unión a manosa de monocotiledóneas, lectinas relacionadas con jacalina, amarantinas y la familia de las leguminosas (Santos *et al.*, 2014), siendo esta última la más estudiada y mejor definida debido al interés en sus propiedades con aplicaciones biológicas (Figura 3).

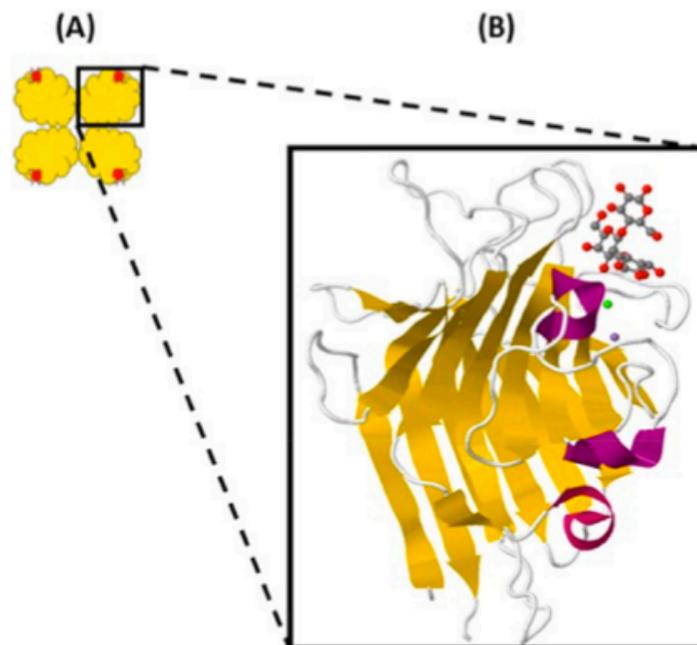


Figura 3. Estructura general de las lectinas de leguminosas. A) Tetrámero con dominios de reconocimiento a carbohidratos. B) Amplificación de un monómero de láminas β y α -hélices (Lagarda, 2017).

2.5.3 Lectinas de leguminosas

La familia de las fabáceas (leguminosas) es rica en lectinas. Estructuralmente, la mayoría de las lectinas aisladas de leguminosas son glicoproteínas, que contienen hasta un 10% de carbohidratos, estos se unen al grupo amino de la cadena lateral de Asn (N-glicosilación) (Mancera, 2021). Suelen tener estructuras homólogas del nivel primario al terciario, sin embargo, las estructuras cuaternarias muestran variaciones considerables que conducen a cambios en las interacciones monómero-monómero y en la glicosilación. El impacto de estas variaciones tiene implicaciones funcionales ya que dictan la especificidad de la unión de glucanos multivalentes (Lagarda *et al.*, 2017). La estabilidad de esta familia de proteínas se atribuye a las interacciones hidrofóbicas y los enlaces de hidrógeno, pero en ocasiones, algunas lectinas requieren la presencia de iones metálicos, los cuales se sugiere que además conferir mayor estabilidad a la molécula, mantienen activos y funcionales sus CDR (Salgado, 2006). Diversos estudios han demostrado que las lectinas de esta familia muestran un rango de especificidad más amplio que cualquier otra familia de lectinas. Pueden extraerse de manera simple en fomas altamente purificadas. Las proteínas de la familia de las leguminosas, han sido estudiadas extensamente, debido a su alta concentración, estabilidad y fácil extracción.

2.5.4 Funciones biológicas de las lectinas

A través de la historia, estas moléculas han llamado la atención de los investigadores en el campo de la biomedicina gracias a su principal característica, la hemaglutinación. Un claro ejemplo es Karl Landsteiner, que en 1900 utilizó una “hemaglutina” aislada de ricino para establecer los antígenos responsables de la existencia de los grupos sanguíneos del sistema ABO (Figura 4) (Medrano, 2023). Dicha propiedad fue estudiada más adelante por múltiples autores, por lo que algunas lectinas se han empleado en la tipificación de grupos sanguíneos (Rodríguez *et al.*, 2004) y actualmente es posible distinguir entre lectinas específicas y no específicas de grupos sanguíneos. También suelen utilizarse en estudios de detección de transformaciones malignas de células, pues las lectinas muestran aglutinación preferencial con estas células (Gallegos y Reyes, 2011). Además, se ha demostrado que participan en eventos apoptóticos, actividad antitumoral y anticarcinogénica (Abdullaev y Castillo, 2005), mediadores en la metástasis del cáncer, efectos inmunomoduladores, antifúngicos y antivirales. Algunas también presentan inducción de mitosis o citotoxicidad en linfocitos (Hernández *et al.* 1999). En histología, las lectinas se usan para estudiar la distribución tisular de distintos tipos de azúcares de manera específica (Molist *et al.*, 2017), de manera que con esta técnica se obtienen perfiles de glicosilación en tejidos, permitiendo hacer la comparación entre tejidos con alguna alteración metabólica o patológica y tejido sin alteración, empleando microscopía óptica o fluorescente, logrando realizar perfiles glicoproteicos de ciertos tipos de cáncer mediante microarreglos (figura 5) (Gallegos *et al.*, 2022).

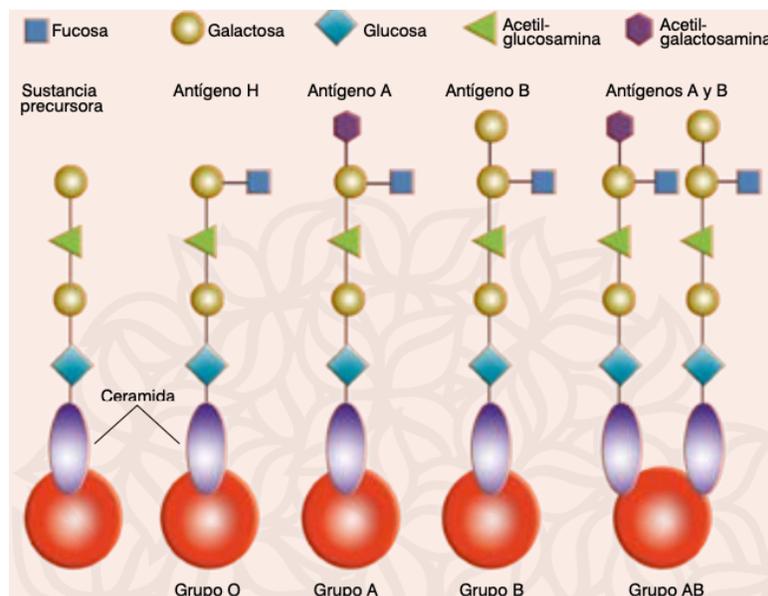


Figura 4. Estructura de los antígenos del sistema ABO (Arbeláez, 2009).

En el caso de las lectinas de leguminosas, se ha observado que ofrecen una gama amplia de funciones biológicas que tienen aplicación biomédica: propiedades citotóxicas, antiproliferativas, mitóticas (Aguilar *et al.*, 2021) y actividad insectistático e insecticida (Casas *et al.*, 2016). En 2020, Acedo observó que *Acacia constricta* contiene una lectina con actividad antiproliferativa dependiente de la concentración en células de cáncer de mama.

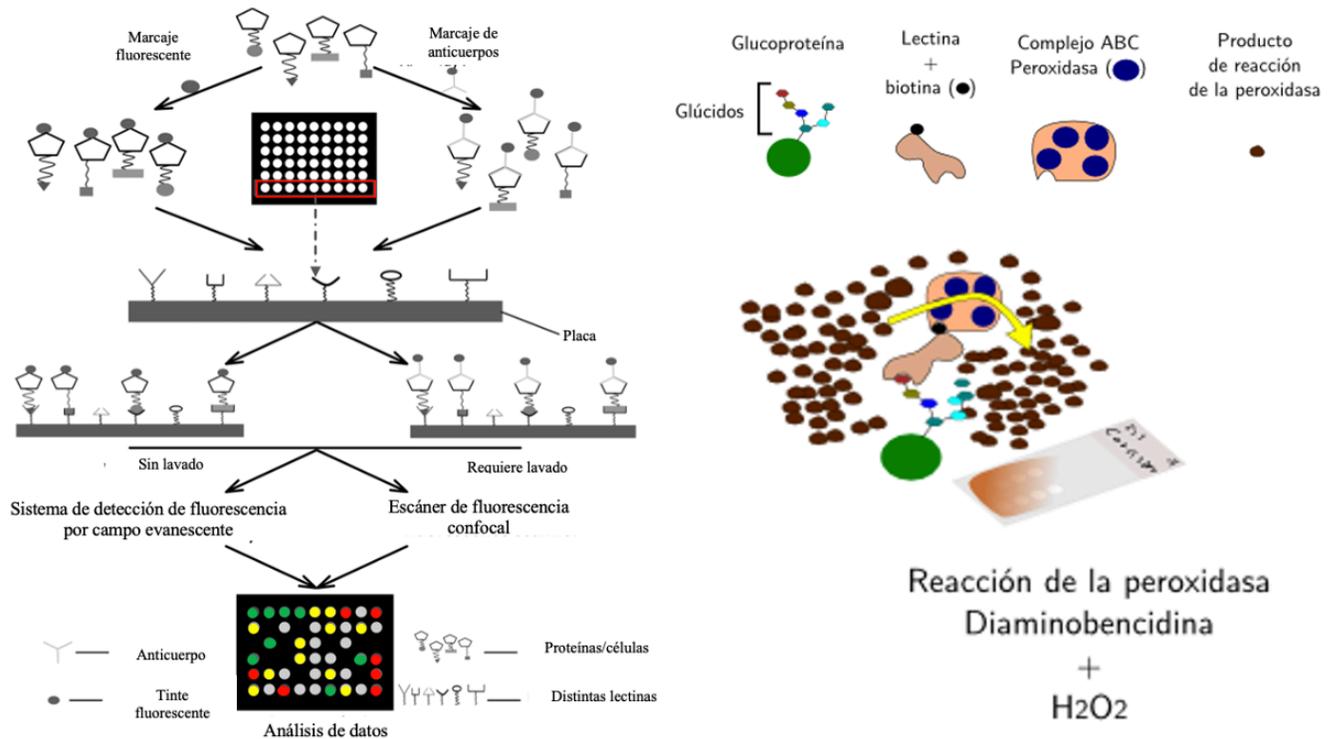


Figura 5. Aplicación de las lectinas en biomedicina: A) Microarreglos con lectinas. Modificado de Xiuli *et al.*, 2018. B) Detección de glúcidos con lectinas. Modificado de Megías *et al.*, 2019.

2.6 *Acacia cornigera* (L.) Willd

Es un arbusto espinoso de hasta 3 m de altura, con espinas dorsales estipulares, huecas, de color café en su madurez (Figura 6), a veces de color marfil amarillento, en las que habitan hormigas; con ramas delgadas de color verde grisáceo y hojas bipinadas con apariencia de plumas. Presenta inflorescencia en espiga, flores de color amarillo, florece en marzo/abril. El fruto es una vaina cilíndrica de 7 cm de longitud, con punta aguda, su fructificación es de octubre a diciembre (INIFAP, 2021).



Figura 6. A) Fotografía del lugar donde se recolectó a *A. cornigera* en Plan de Limón, Veracruz. 20°39'50.0"N 97°16'49.6"W. B) Hojas y espinas de *A. cornigera*. Por Alejandra Sofía Álvarez Marquina el 24/02/2023.

2.6.1 Distribución

A. cornigera se distribuye desde México hasta Costa Rica. Habita en climas cálido-semicálido desde el nivel del mar hasta los 1200 m. Crece en sitios con vegetación perturbada, asociada a manglar, palmar, pastizal, bosque tropical caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio y matorral xerófilo (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

2.6.2 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Acacia*

Especie: *A. cornigera*

2.6.3 Usos

De manera tradicional en México se utiliza la raíz en infusión como tratamiento contra la diarrea, las hojas maceradas se aplican para aliviar molestias por picadura de insectos; la corteza se usa para tratar mordeduras de víbora, puesto que se reporta como analgésico en heridas y astringente (INIFAP, 2021).

3. Planteamiento del problema

Actualmente, los pacientes con síntomas inflamatorios suelen recurrir a medicamentos antiinflamatorios comerciales; sin embargo, estos pueden tener efectos adversos para la salud, por ello se ha vuelto tendencia la búsqueda de fuentes naturales con mayor especificidad y disminución de efectos secundarios. Se ha observado que las lectinas vegetales tienen actividad pro o antiinflamatoria y, aunque no se conocen los mecanismos específicos, se ha propuesto que ocurre a través del reconocimiento de glicoconjugados específicos de la membrana celular. Por ello resulta importante para la investigación biomédica y farmacéutica, estudiar la actividad biológica de nuevas lectinas vegetales.

4. Hipótesis

Las proteínas tipo lectina presentes en *Acacia cornígera* (Fabácea) participan en el proceso antiinflamatorio de ratones CD-1.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de las lectinas de *A. cornígera* en el proceso inflamatorio en ratones CD-1

5.2 Objetivos particulares

- Obtener proteínas de tipo lectina de hojas de *A. cornígera* mediante dos métodos de extracción salina
- Conocer la afinidad glucosídica del extracto semipurificado por cromatografía de afinidad
- Determinar el efecto hemaglutinante de las proteínas tipo lectina extraídas de *A. cornígera* en eritrocitos humanos ABO⁺
- Analizar el efecto antiinflamatorio de lectinas de *A. cornígera* por edema plantar y permeabilidad vascular en ratones CD-1

6. Material y método

6.1 Recolección del material vegetal

El material vegetal se recolectó en el ejido de Limón Chiquito en Cazones de Herrera, Veracruz. Se recolectaron hojas maduras en buen estado (sin indicios de plagas).

6.2 Cuantificación de ácidos grasos

Se usó el método cloroformo-metanol 2:1. Se pesaron 2 g de hoja *in situ*, se maceraron en frío con 10 mL de cloroformo-metanol 2:1 v/v (Folch *et al.*, 1957). En el laboratorio, se centrifugó la muestra a 4000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se conservó a 4 °C durante 12 h, posteriormente, se calentó cuidadosamente para evaporar el solvente. Se pesó nuevamente el extracto y se obtuvo el rendimiento porcentual.

6.3 Desgrasado del material vegetal

Para desgrasar el material vegetal se utilizó hexano en proporción 1:10 p/v. *In situ*, se mantuvo en agitación constante durante 5 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se conservó a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio, donde se filtró al vacío y se mantuvo en reposo a temperatura ambiente hasta que el resto del solvente se eliminara.

6.4 Extracción salina

La extracción salina se basa en la solubilización de las proteínas por aumento de la fuerza iónica en el medio debido a la presencia de sales de sodio (Flores, 2016).

6.4.1 PBS sódico

Se pesaron 100 g de hoja, las cuales fueron maceradas con PBS sódico 0.1 M de pH 7.4 en proporción 1:10 p/v. El extracto se mantuvo en agitación constante durante 16 h a 4 °C, posteriormente fue centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos. Solo se conservó el sobrenadante (extracto crudo).

6.4.2 NaCl al 10%

Se pesaron 100 g de hoja, las cuales fueron maceradas con solución salina NaCl al 10% en proporción 4:1 (solución: material vegetal) *in situ* y se dejó reposando a 4 °C hasta su uso en el laboratorio. Se eliminó el exceso de material vegetal para centrifugar el extracto a 4000 rpm durante 20 min y se colectó el sobrenadante, que se conservó a 4°C hasta su uso para la semipurificación.

Se llevó a cabo la precipitación de proteína soluble con sulfato de amonio al 80%. Se centrifugó a 4000 rpm por 20 minutos (Salgado, 2006) el precipitado se conservó en frío hasta su uso para la cuantificación de azúcares y proteínas.

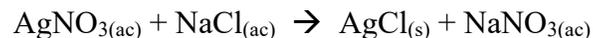
Dado que la precipitación de proteínas ocurre por transición de fase, cierta cantidad de proteína precipitará con las sales, por lo que se requiere llevar a cabo diálisis para mover la proteína a una solución definida (Hernández, 2016).

6.5 Semipurificación de los extractos

6.5.1 Diálisis

Se llevó a cabo una diálisis exhaustiva con membrana de 3 kDa Merck Millipore, acorde con el peso molecular de las lectinas que va de 12-65 kDa en agua destilada.

Para el extracto de NaCl al 10% se verificó la eliminación de la sal mediante la prueba de Nitrato de Plata (AgNO_3) 0.1 N, el cual en presencia de NaCl forma un complejo de cloruro de plata que produce una coloración lechosa (Flores, 2016).



6.5.2 Cromatografía de afinidad

Se prepararon columnas empaquetadas con una matriz de sílica gel para columna malla 60-200. Las muestras se corrieron a través de la columna con un flujo constante. Las proteínas retenidas se desplazaron mediante el paso de soluciones de Glucosa, Galactosa, Lactosa, Maltosa, Manitol y Sacarosa 0.1 M. Posteriormente cada una de las fracciones obtenidas fueron sometidas a pruebas de hemaglutinación con cada tipo sanguíneo del grupo ABO⁺.

6.6 Cuantificación de proteínas

6.6.1 Método Biuret

En tubos de ensaye se colocaron 500 μl de muestra con 500 μl de agua destilada y después se agregaron 2 mL de reactivo Biuret. Se agitaron suavemente y se llevaron al espectrofotómetro para cuantificar por lectura a 545 nm. Para extrapolar los datos obtenidos se realizó una curva patrón de albúmina purificada Sigma Chemical, a una concentración de 10 mg/mL.

6.6.2 Método Lowry

En tubos de ensaye se colocaron 200 µl de muestra con 2.5 mL de Reactivo Lowry, se agitó en vórtex y se dejó reposar durante 10 minutos, posteriormente se añadieron 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu 1:4, Sigma Chemical, nuevamente se agitó en vórtex y se mantuvo en reposo durante 30 minutos cubriendo los tubos de la luz con papel aluminio. Pasado este tiempo, se cuantificó por lectura a 500 nm en espectrofotómetro. Para extrapolar los datos obtenidos, se realizó una curva patrón de albúmina purificada a una concentración de 1mg/mL.

6.7 Cuantificación de azúcares totales

Se llevó a cabo el método fenol-ácido sulfúrico. Se colocaron 100 µl de muestra con 900 µl de agua destilada. Se añadieron 100 µl de fenol al 5%, se agitó en vórtex y se dejó reposar por 15 minutos, posteriormente se añadieron 2.9 mL de ácido sulfúrico, se agitó cuidadosamente en vórtex y se incubaron durante 30 minutos. Se dejó enfriar los tubos para realizar la cuantificación por lectura a 480 nm en espectrofotómetro. Para la extrapolación de los datos obtenidos, se realizó una curva patrón de glucosa a una concentración de 100 µg/mL.

6.8 Pruebas de hemaglutinación

Se obtuvieron muestras sanguíneas de individuos sanos del sistema ABO⁺, las cuales fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante aspirando la capa superior cuidadosamente. Los eritrocitos obtenidos se suspendieron en 6-7 volúmenes de suero fisiológico y se centrifugó en las mismas condiciones. El volumen de eritrocitos sedimentados fue resuspendido en suero fisiológico en una dilución 2.5%. En placas de microtitulación se colocaron 50 µl de la solución de eritrocitos como control negativo. Para probar los extractos, se colocaron 30 µl de solución de eritrocitos y 20 µl de los extractos por pozo. Se dejaron reposar durante 3 horas, monitoreando los resultados cada hora.

6.9 Evaluación del efecto antiinflamatorio

6.9.1 Diseño experimental

Se utilizaron 60 ratones hembra de la cepa CD1 del Bioterio de FES Zaragoza, los cuales fueron clasificados en diez grupos experimentales (Tabla 2) para posteriormente administrar el tratamiento vía oral con los extractos correspondientes a una concentración de 0.5 mg/mL, durante 15 días.

Tabla 2. Diseño experimental para la administración de tratamientos

Grupo	Descripción	Características	Número de ratón
1	Control positivo	Animales sin tratamiento con inducción de edema plantar	(1-6)
2	Control negativo	Animales que se les suministró indometacina (a una concentración de 10 mg/kg de peso), sin inducción de edema plantar	(7-12)
3	Extracto crudo	Animales que se les suministró extracto crudo (28 μ L a una concentración de 1.2 mg/mL) durante 15 días, sin inducción de edema plantar	(13-18)
4	Extracto crudo + edema	Animales que se les suministró extracto crudo (28 μ L a una concentración de 1.2 mg/mL) durante 15 días, con inducción de edema plantar	(19-24)
5	Fracción Maltosa	Animales que se les suministró la fracción del extracto purificada por cromatografía de afinidad con Maltosa (21 μ L a una concentración de 1.62 mg/mL) durante 15 días	(25-30)
6	Fracción Maltosa + edema	Animales que se les suministró la fracción del extracto purificada por cromatografía de afinidad con Maltosa (21 μ L a una concentración de 1.62 mg/mL) durante 15 días, con inducción de edema plantar	(31-36)
7	Fracción Glucosa + edema	Animales que se les suministró la fracción del extracto purificada por cromatografía de afinidad con Glucosa (18 μ L a una concentración de 1.9 mg/mL) durante 15 días, con inducción de edema plantar	(37-42)
8	Fracción Galctosa-Sacarosa + edema	Animales que se les suministró la fracción del extracto purificada por cromatografía de afinidad con Galactosa-Sacarosa (26 μ L a una concentración de 1.27 mg/mL) durante 15 días, con inducción de edema plantar	(43-48)
9	Fracción Manitol-Maltosa + edema	Animales que se les suministró la fracción del extracto purificada por cromatografía de afinidad con Manitol-Maltosa (22 μ L a una concentración de 1.53 mg/mL) durante 15 días, con inducción de edema plantar	(49-54)
10	Indometacina + edema	Animales que se les suministró indometacina (a una concentración de 10 mg/kg de peso), con inducción de edema plantar	(55-60)

6.9.2 Inducción de edema plantar con albúmina

Se llevó a cabo la inducción de edema plantar agudo inyectando 20 μ l de albúmina al 1% en solución fisiológica. Se midió la pata trasera derecha antes, 30, 60, 90 y 120 minutos después de inyectar.

6.9.3 Ensayo de permeabilidad vascular

Se inyectaron 200 μ l de una solución 0.5% de azul de Evans en PBS en la vena caudal del ratón dejándose reposar por 3 h. Posteriormente los animales se sacrificaron en cámara de éter. Se recolectaron y pesaron los órganos (hígado, riñón y bazo). Se colocó cada órgano en un tubo con formamida (Sigma Chemical) (500 μ l /100 mg de tejido). Se incubaron a 55°C durante 24 h para extraer el azul de Evans del tejido. La concentración de azul de Evans (μ g/g de tejido), se cuantificó por espectrofotometría a 620 nm.

6.10 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la permeabilidad vascular fueron analizados por la prueba de análisis de varianza múltiple (ANOVA), seguida de la prueba de Tukey. Se consideraron únicamente aquellas diferencias en las cuales la probabilidad fue menor a 0.05.

7. Resultados

7.1 Cuantificación de ácidos grasos

Mediante la prueba de cloroformo-metanol, se obtuvo el rendimiento porcentual de ácidos grasos a partir de 2 g de hojas de la planta (Tabla 3).

Tabla 3. Rendimiento porcentual de ácidos grasos obtenidos de las hojas de *A. cornigera* antes y después de desgrasar con hexano.

	Peso inicial	Peso final	Rendimiento porcentual (ácidos grasos)
Hoja cruda	2 g	0.0243 g	1.215%
Hoja desgrasada		0.0133 g	0.665%

Previo a la extracción, se optó por desgrasar 56 g de hoja, de los cuales al final de este proceso, se obtuvieron 44.5 g.

7.2 Extracción salina de lectinas vegetales

La extracción proteica se llevó a cabo por dos métodos distintos. Posteriormente, como proceso de semipurificación, ambos extractos fueron sometidos a diálisis en una membrana de 3kDa. En la Tabla 4 se observa la concentración proteica que se obtuvo a partir de las hojas de *A. cornigera* en cada extracto, empleando cuantificación por método Biuret; así como la concentración de carbohidratos totales obtenida por método fenol-ácido sulfúrico (Flores, 2016).

Tabla 4. Concentración de proteínas y carbohidratos totales en los distintos extractos salinos de *A. cornigera* con los dos métodos de cuantificación empleados.

Extracto	Proteínas [mg/mL]	Carbohidratos [µg/mL]
NaCl al 10% (crudo)	3.328	87.7304
NaCl al 10% (Dializado)	0.660	0.2343
PBS sódico crudo (No desgrasado)	1.3563	12.8938
PBS sódico crudo (Desgrasado)	12	49.0007
PBS sódico precipitado con (NH ₄) ₂ SO ₄	2.895	36.894
PBS sódico precipitado con (NH ₄) ₂ SO ₄ (Dializado)	1.972	31.5668

7.3 Pruebas de hemaglutinación

Para elegir la concentración adecuada que permitiera observar el comportamiento de las células al ser probadas con los extractos, se llevaron a cabo diluciones seriadas de eritrocitos en suero fisiológico (Figura 7). De acuerdo con esto, se optó por trabajar con una dilución al 2.5% para la correcta observación del fenómeno de hemaglutinación.

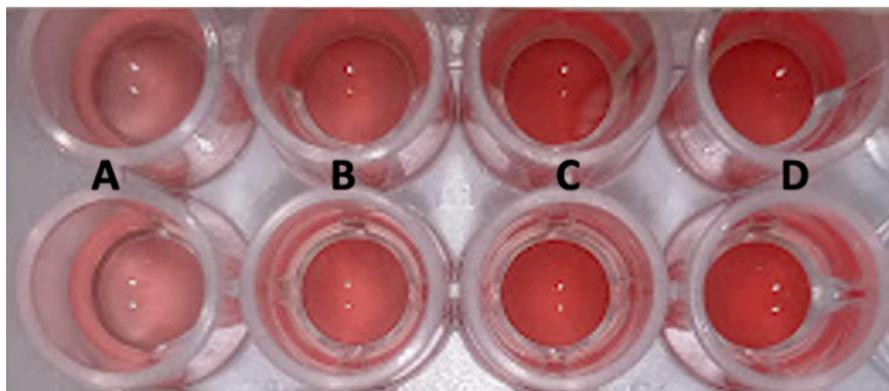


Figura 7. Diluciones de eritrocitos en suero fisiológico: A) 2%; B) 3%; C) 4%; D) 5%

El grado de hemaglutinación se asignó mediante la observación de las placas a simple vista, así como por observación directa en un Microscopio óptico (Leica), comparando con el control. El experimento se realizó 6 veces por triplicado.

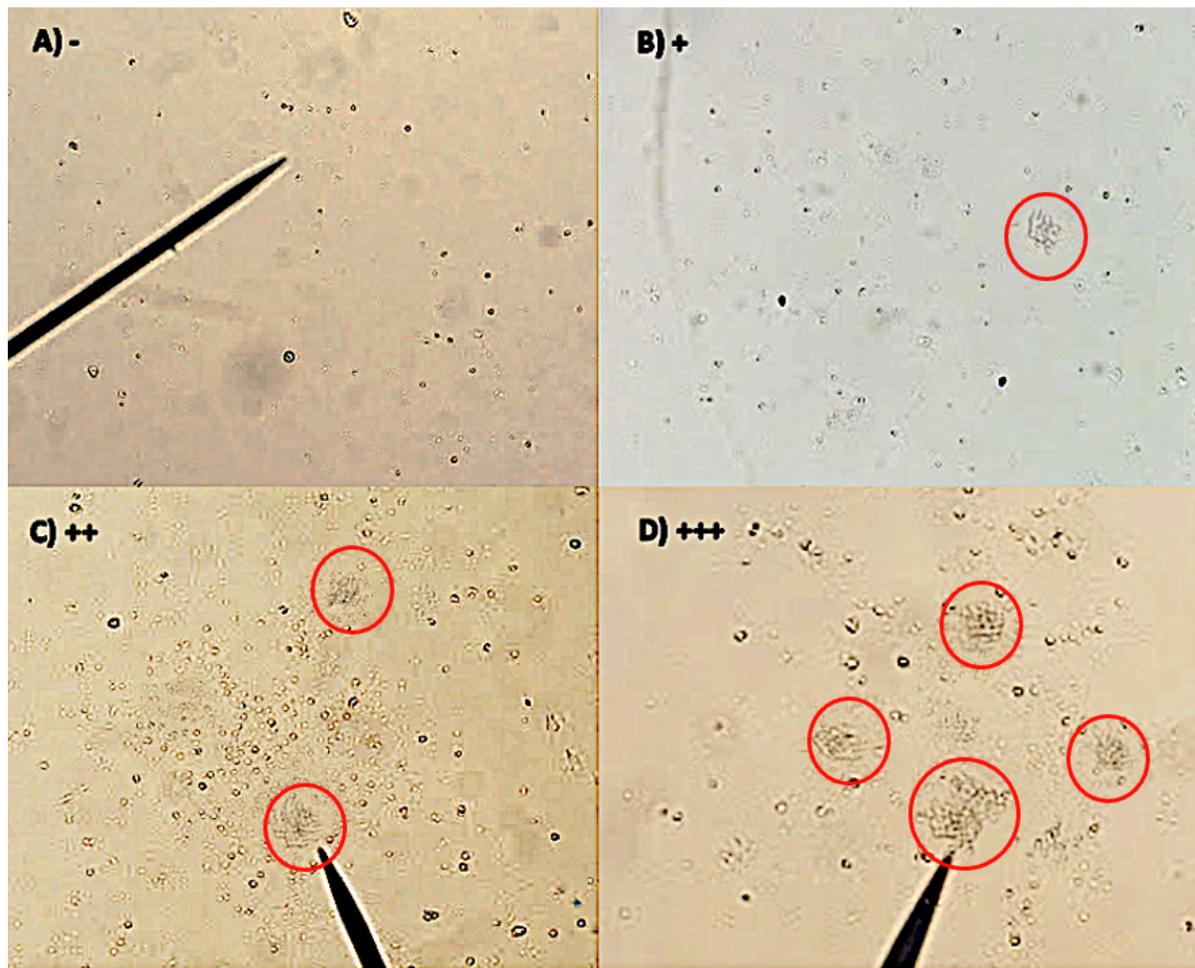


Figura 8. Asignación del grado de hemaglutinación en los extractos acorde a la cantidad de agregados eritrocitarios formados. A) Control; - Para actividad nula; B) + para un agregado formado; C) ++ para 2 agregados formados; D) +++ para más de 2 agregados formados.

El grupo sanguíneo A⁺ presnetó mayor grado de aglutinación con los extractos hechos a base de PBS.

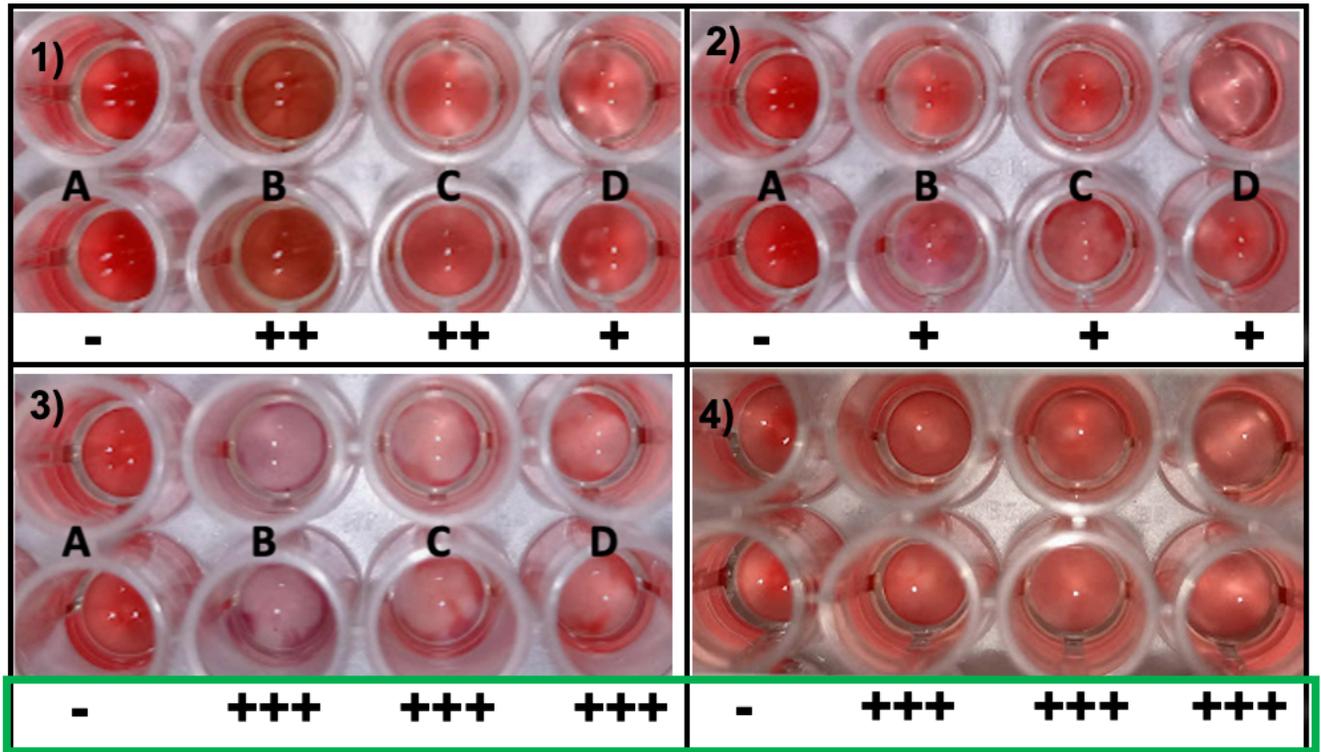


Figura 9. Pruebas de hemaglutinación en grupo sanguíneo A⁺ transcurridas tres horas. 1) Extracto NaCl 10% crudo; 2) Extracto NaCl 10% dializado; 3) Extracto PBS crudo; 4) Extracto PBS precipitado con (NH₄)₂SO₄. A) Control negativo; B) Extracto puro; C) Dilución 1:10; D) Dilución 1:100. Grado de hemaglutinación: +++ para la mayor actividad y - para el que no presenta actividad.

El grupo sanguíneo B⁺ presnetó el máximo grado de aglutinación con todos los extractos excepto en la dilución 1:100 del extracto hecho a base de NaCl 10% dializado.

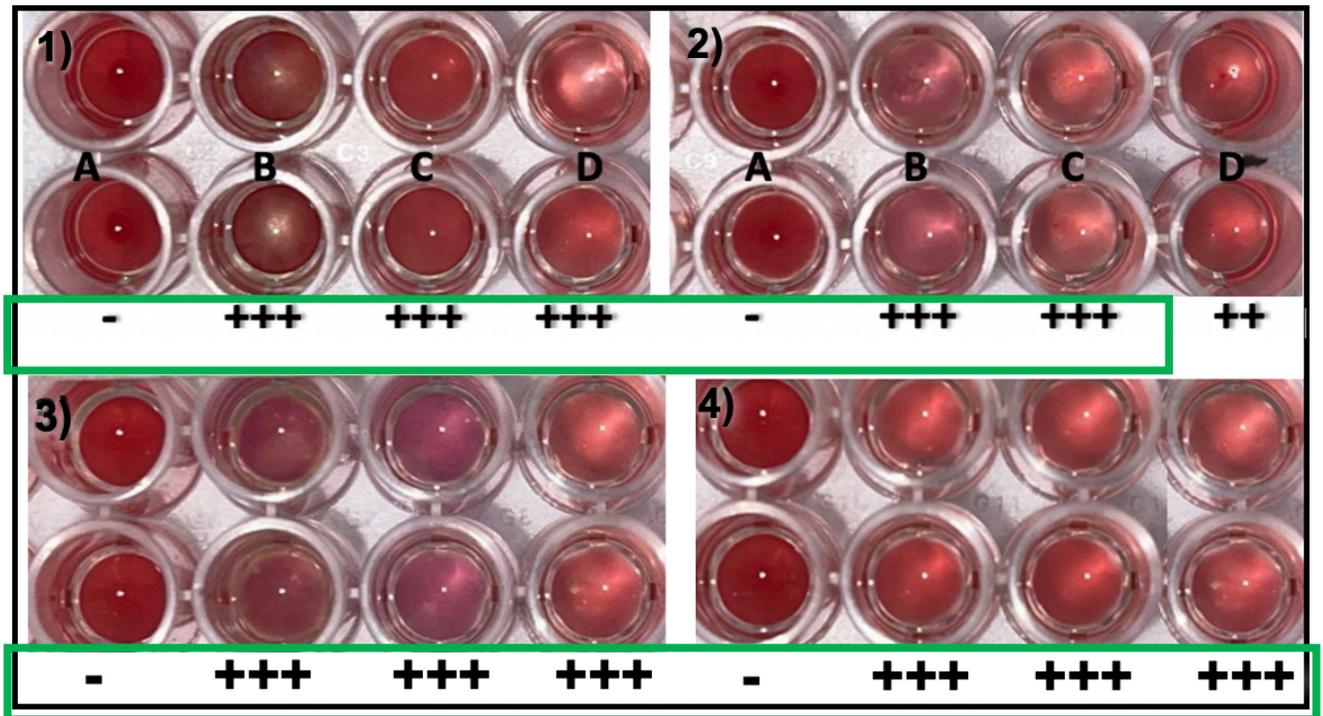


Figura 10. Pruebas de hemaglutinación en grupo sanguíneo B⁺ transcurridas tres horas. 1) Extracto NaCl 10% crudo; 2) Extracto NaCl 10% dializado; 3) Extracto PBS crudo; 4) Extracto PBS precipitado con (NH₄)₂SO₄. A) Control negativo; B) Extracto puro; C) Dilución 1:10; D) Dilución 1:100. Grado de hemaglutinación: +++ para la mayor actividad y – para el que no presenta actividad.

El grupo sanguíneo O⁺ presentó el mayor grado de aglutinación con el extracto hecho a base de PBS sin precipitar.

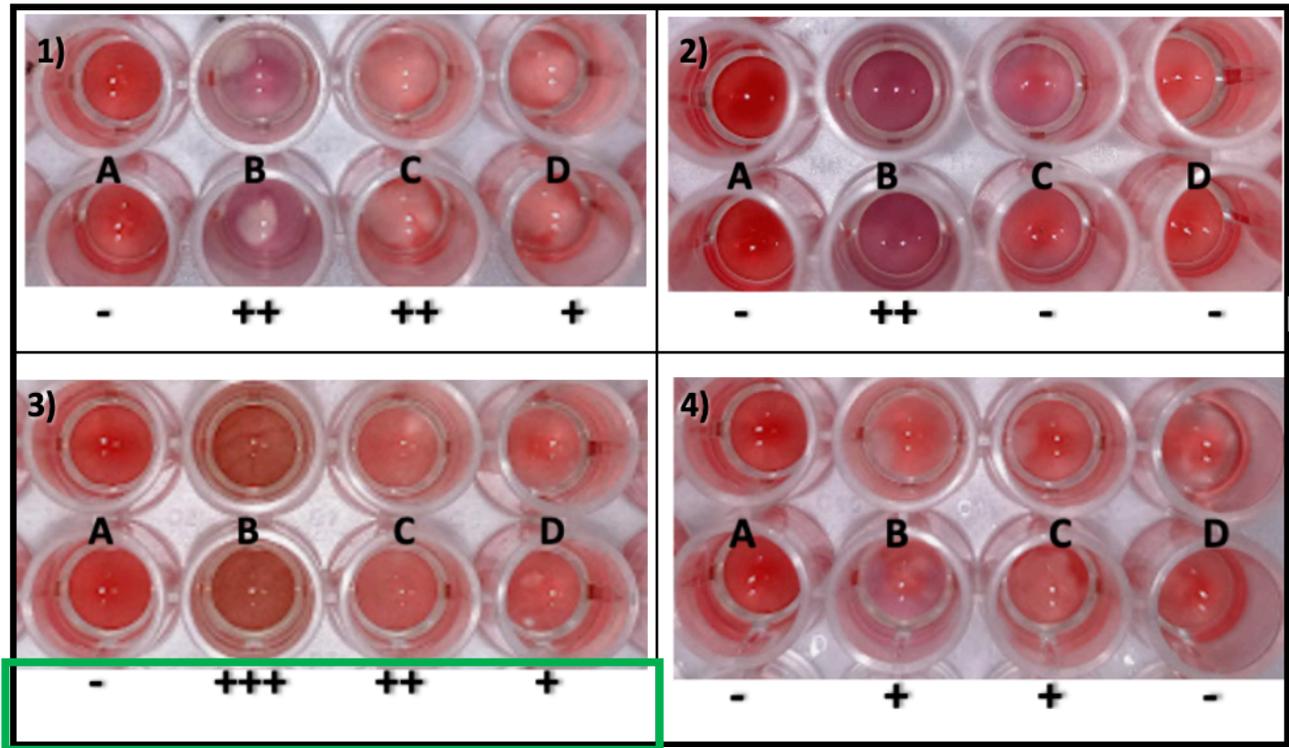


Figura 11. Pruebas de hemaglutinación en grupo sanguíneo O⁺ transcurridas tres horas. 1) Extracto NaCl 10% crudo; 2) Extracto NaCl 10% dializado; 3) Extracto PBS crudo; 4) Extracto PBS precipitado con (NH₄)₂SO₄. A) Control negativo; B) Extracto puro; C) Dilución 1:10; D) Dilución 1:100. Grado de hemaglutinación: +++ para la mayor actividad y – para el que no presenta actividad.

7.4 Cromatografía de Afinidad

Tras realizar las primeras pruebas con los extractos, se optó por seguir trabajando únicamente con el extracto obtenido con PBS. Se llevó a cabo la purificación del extracto mediante cromatografía de afinidad en columna. Una vez purificado, se cuantificaron nuevamente proteínas totales, por método Lowry, así como de carbohidratos totales (Tabla 5). Posteriormente se realizaron pruebas de hemaglutinación con cada una de las fracciones de azúcares obtenidas.

Tabla 5. Relación proteína-carbohidrato en las fracciones del extracto obtenidas por cromatografía en columna

Extracto (fracción)	Concentración de proteínas (mg/mL)	Concentración de carbohidratos (mg/mL)
Lactosa	0.064	0.096
Lactosa-Manitol	0.174	0.088
Manitol	0.486	0.498
Manitol-Maltosa	0.331	0.3
Maltosa	0.427	12.078
Maltosa-Galactosa	0.874	9.862
Galactosa	0.642	9.666
Galactosa-Sacarosa	0.076	2.392
Sacarosa	0.203	3.882
Sacarosa-Glucosa	0.732	21.705
Glucosa	0.701	5.98

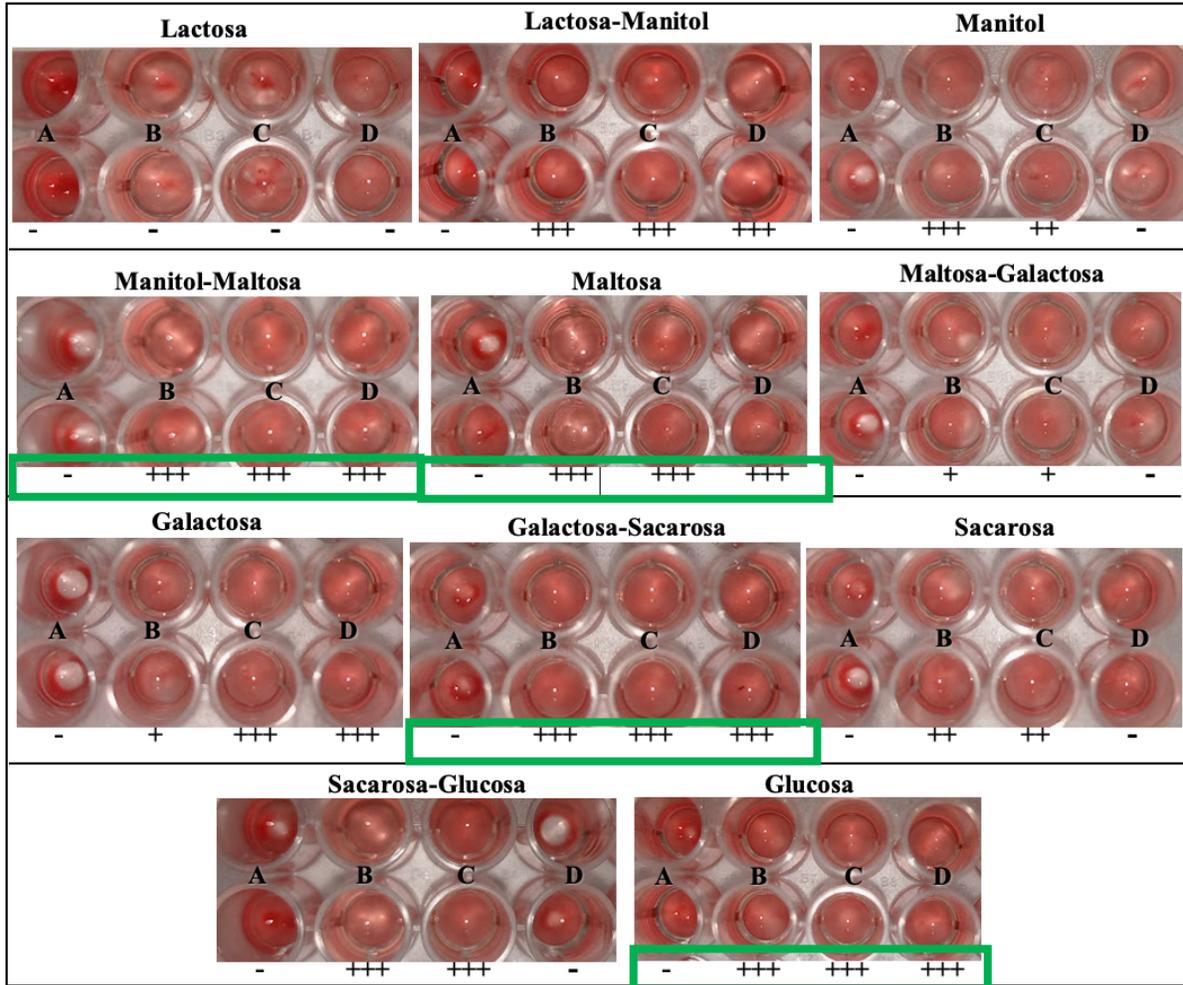


Figura 12. Pruebas de hemaglutinación en grupo sanguíneo A⁺ transcurridas tres horas. A) Control negativo; B) Extracto puro; C) Dilución 1:10; D) Dilución 1:100. Grado de hemaglutinación: +++ para la mayor actividad y – para el que no presenta actividad.

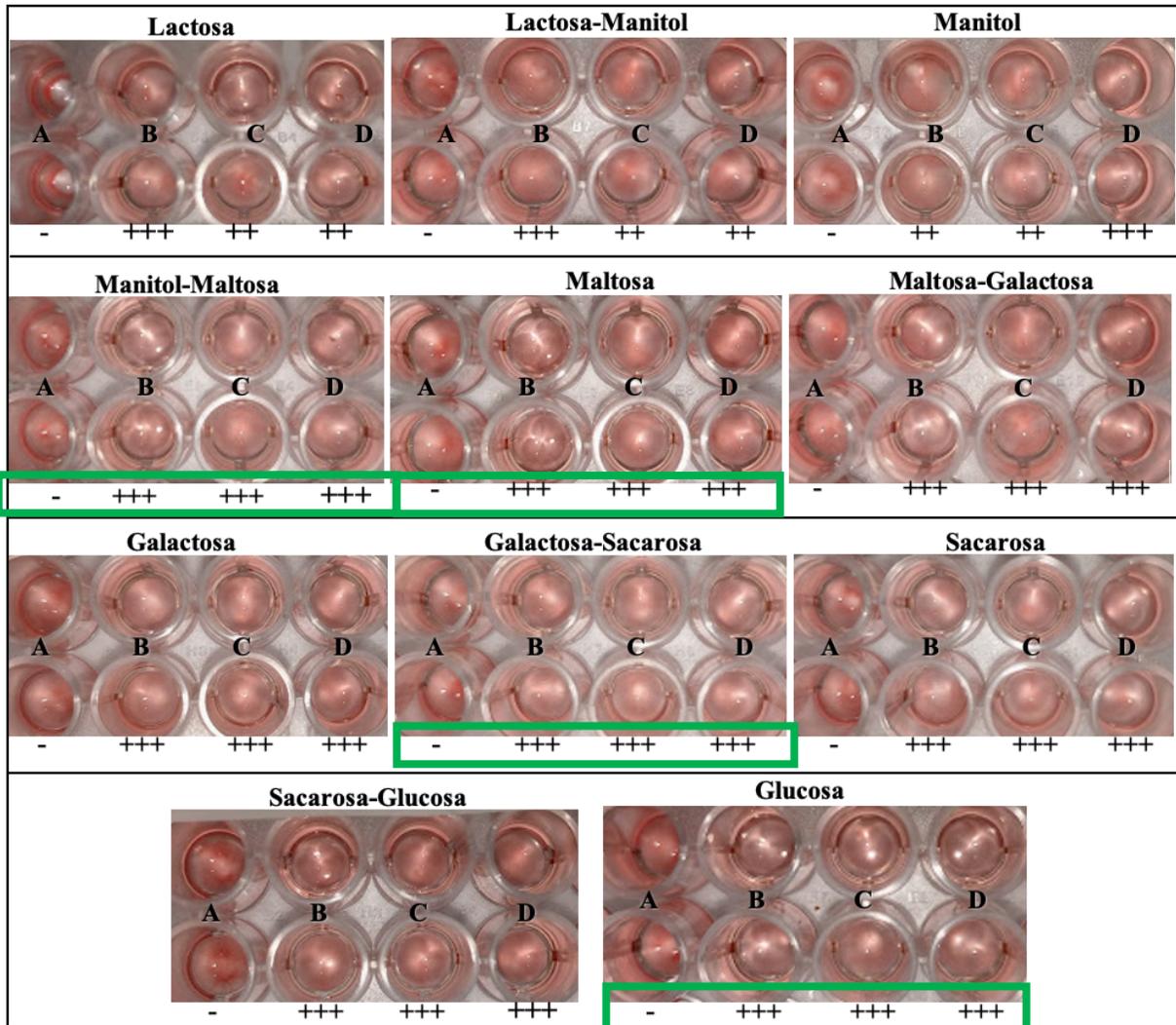


Figura 13. Pruebas de hemaglutinación en grupo sanguíneo B⁺ transcurridas tres horas. A) Control negativo; B) Extracto puro; C) Dilución 1:10; D) Dilución 1:100. Grado de hemaglutinación: +++ para la mayor actividad y – para el que no presenta actividad.

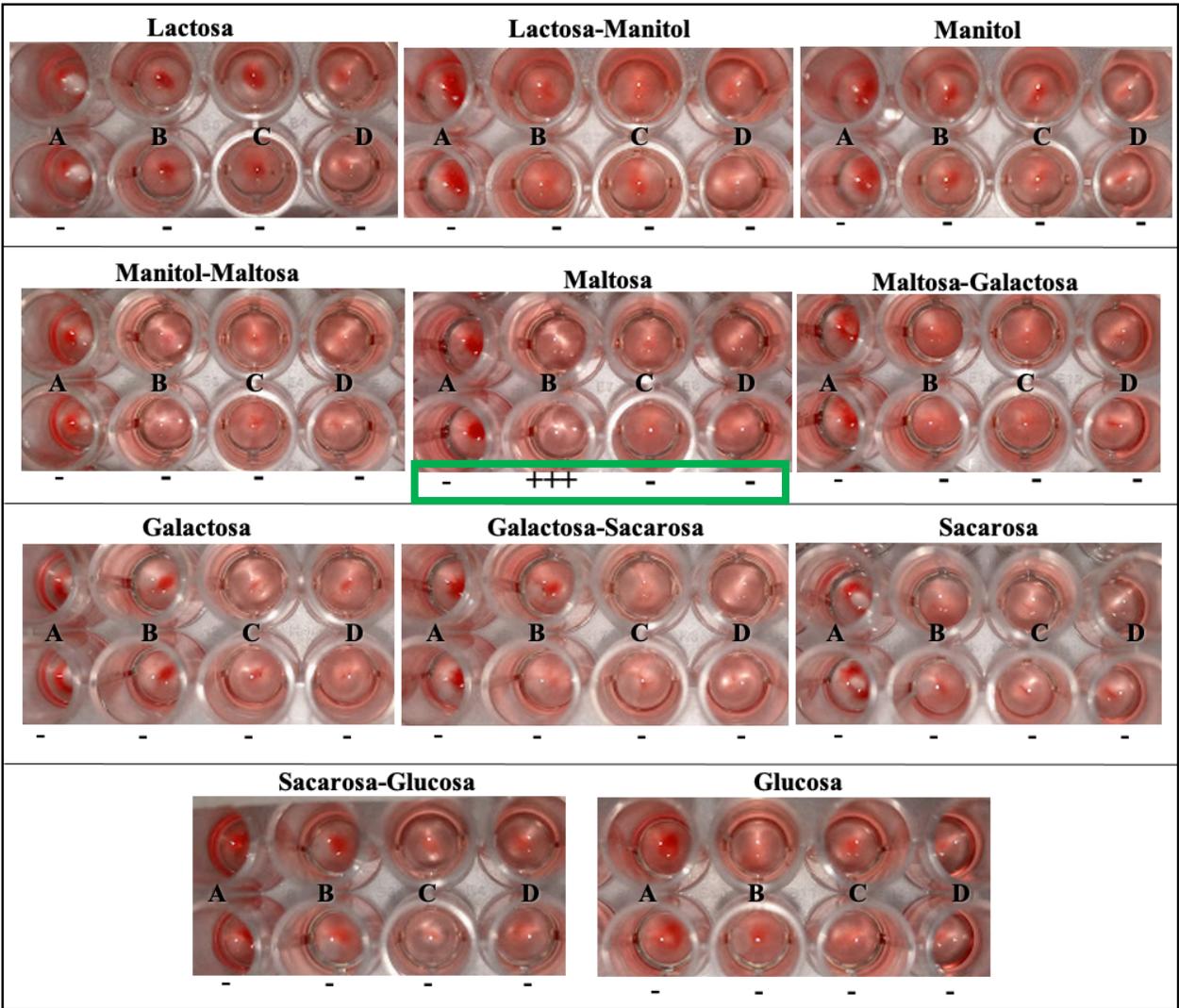


Figura 14. Pruebas de hemaglutinación en grupo sanguíneo O⁺ transcurridas tres horas. A) Control negativo; B) Extracto puro; C) Dilución 1:10; D) Dilución 1:100. Grado de hemaglutinación: +++ para la mayor actividad y – para el que no presenta actividad.

7.5 Diseño Experimental

La elección de los extractos a trabajar con los sistemas *in vivo*, se llevó a cabo basado en la actividad biológica, es decir, el grado de hemaglutinación que presentó cada fracción (Tabla 6).

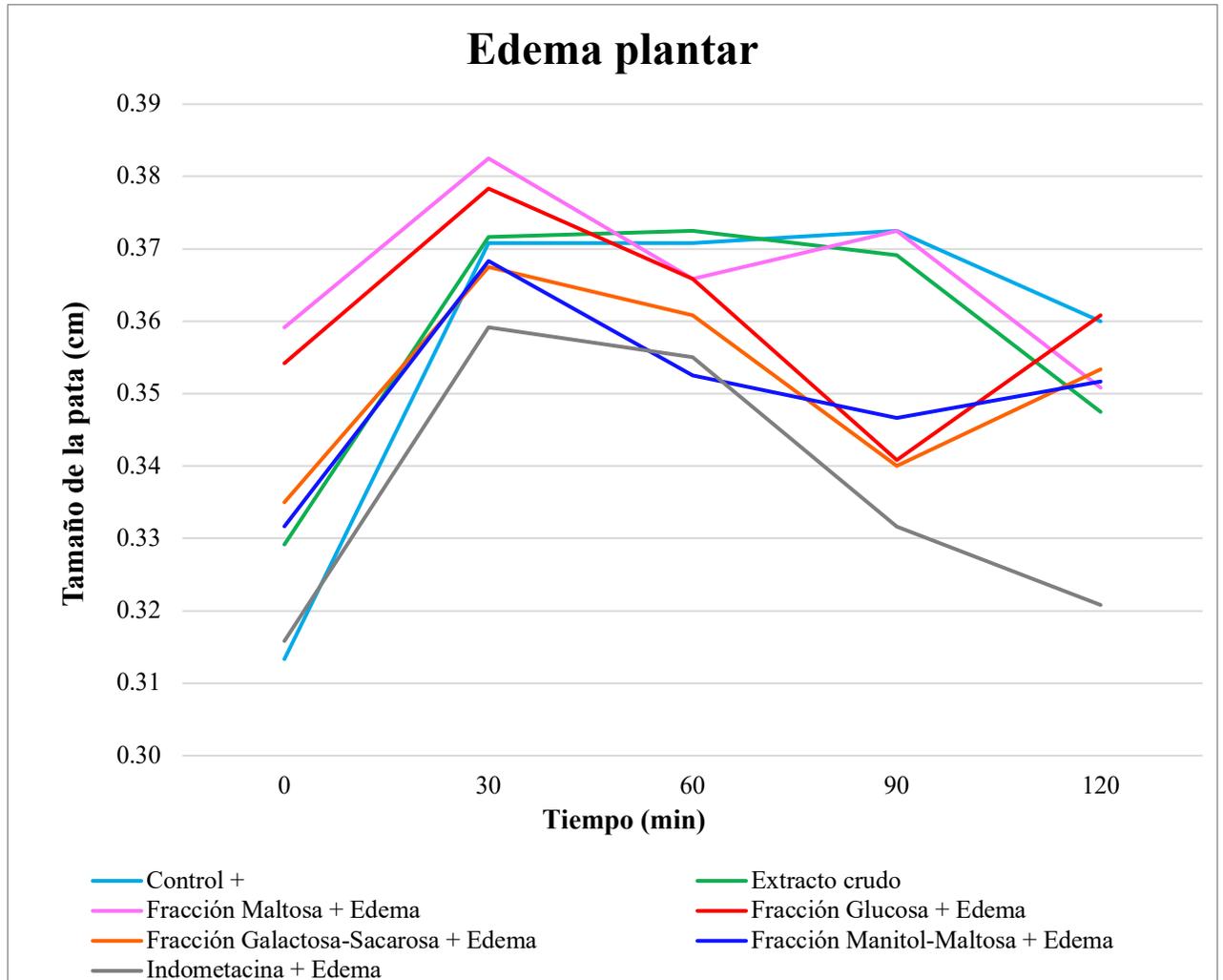
Tabla 6. Relación proteína-carbohidrato con el grado de hemaglutinación de las fracciones del extracto de *A. cornigera*

Extracto (fracción)	Concentración de proteínas (mg/mL)	Grado de hemaglutinación								
		A ⁺			B ⁺			O ⁺		
Lactosa	0.064	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lactosa-Manitol	0.174	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-	-
Manitol	0.486	+++	++	-	++	++	+++	-	-	-
Manitol-Maltosa	0.331	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Maltosa	0.427	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
Maltosa-Galactosa	0.874	+	+	-	+++	+++	+++	-	-	-
Galactosa	0.642	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Galactosa-Sacarosa	0.076	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Sacarosa	0.203	++	++	+	++	++	+	-	-	-
Sacarosa-Glucosa	0.732	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	-	-
Glucosa	0.701	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-

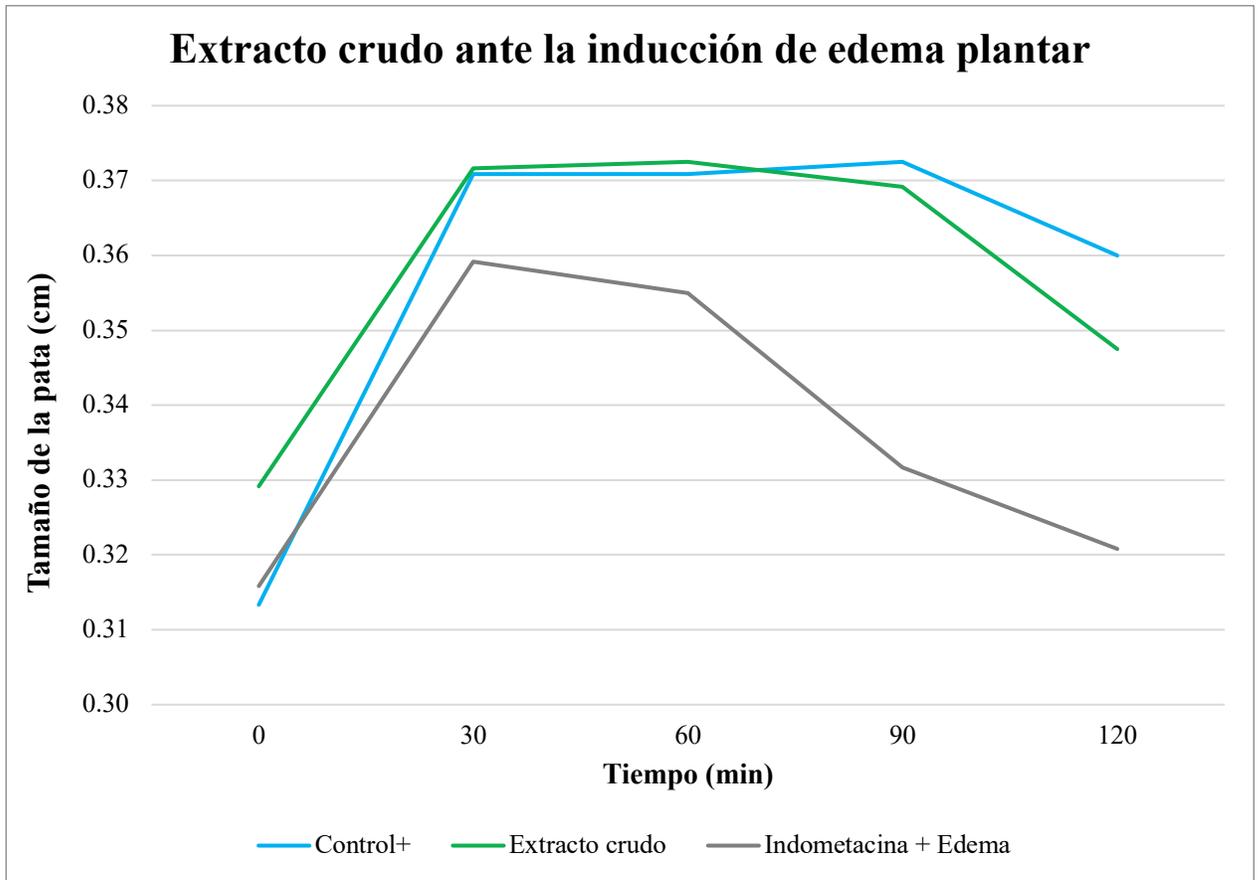
7.6 Evaluación del efecto antiinflamatorio

7.6.1 Inducción de Edema Plantar

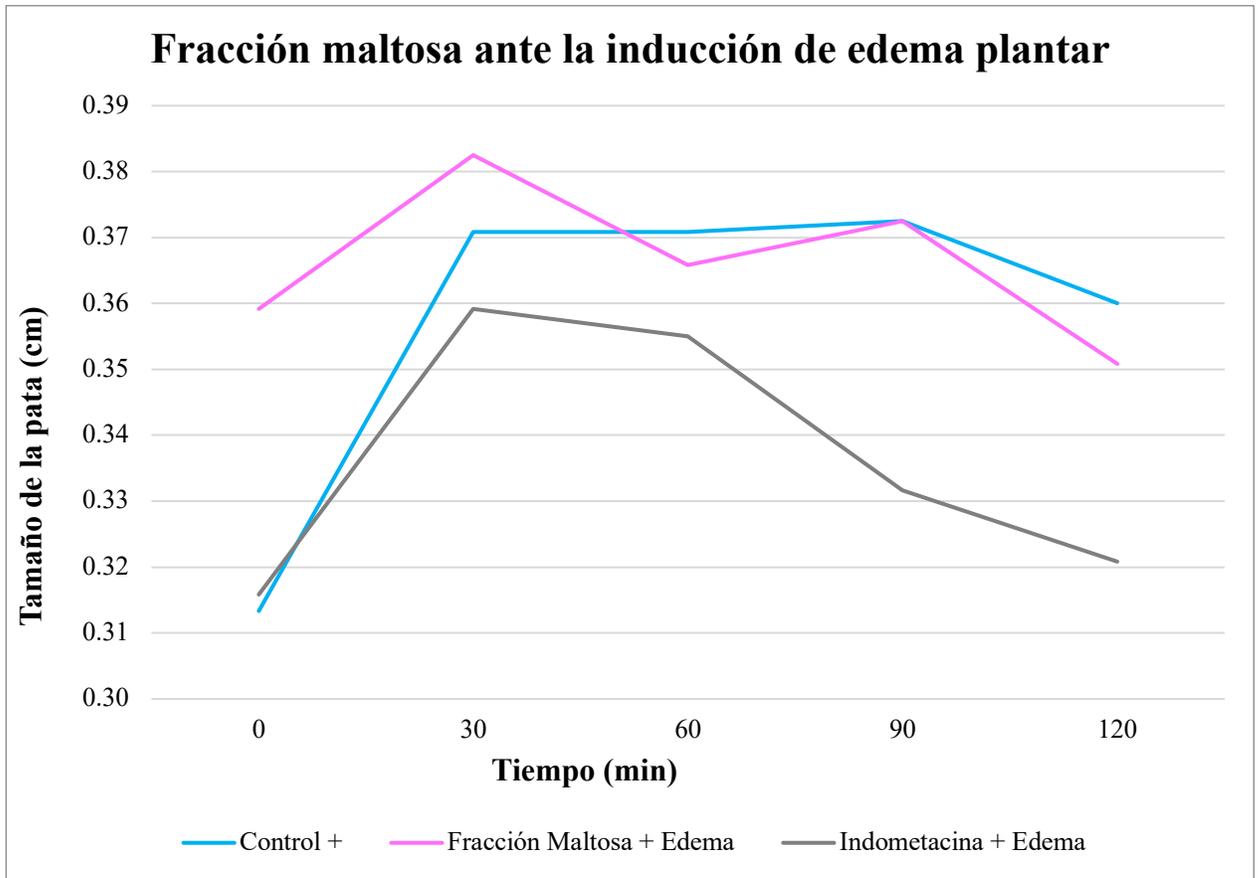
En la inducción de edema plantar en pata trasera derecha, todos los grupos presentaron la máxima inflamación a los 30 minutos de la inducción (Gráfica 1).



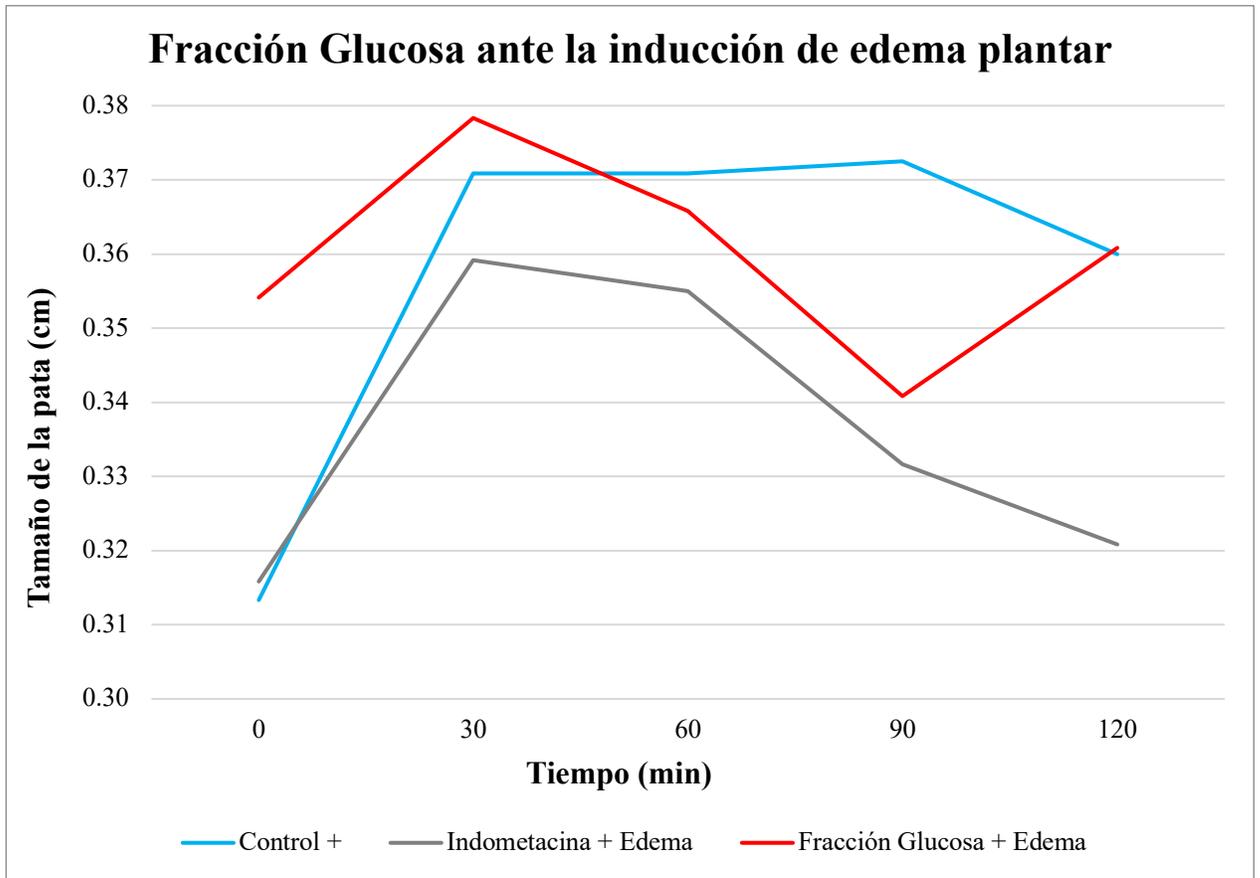
Gráfica 1. Efecto inflamatorio por inducción de edema con albúmina en la pata trasera derecha en ratones CD1



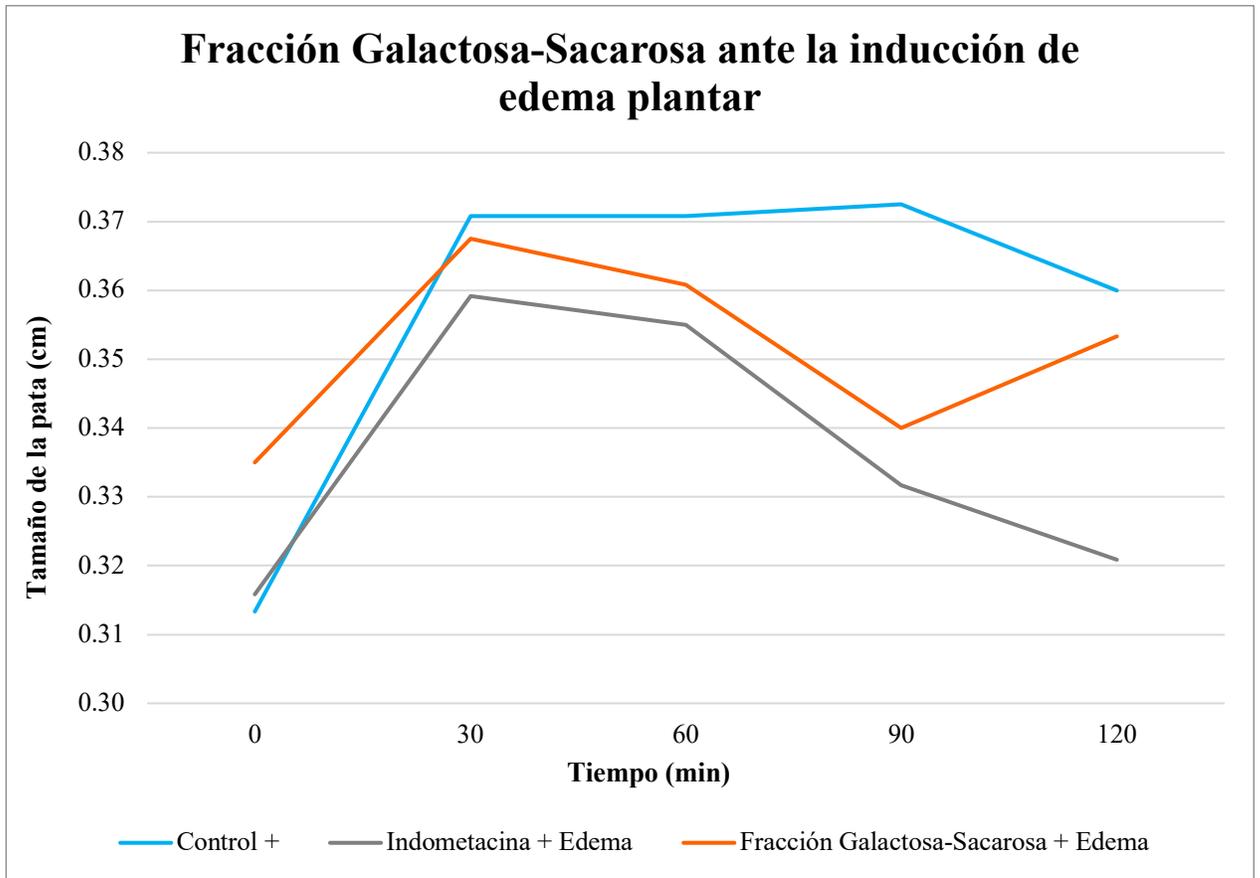
Gráfica 2. Efecto inflamatorio del extracto crudo de *A. cornigera* en la inducción de edema con albúmina en la pata trasera derecha en ratones CD-1



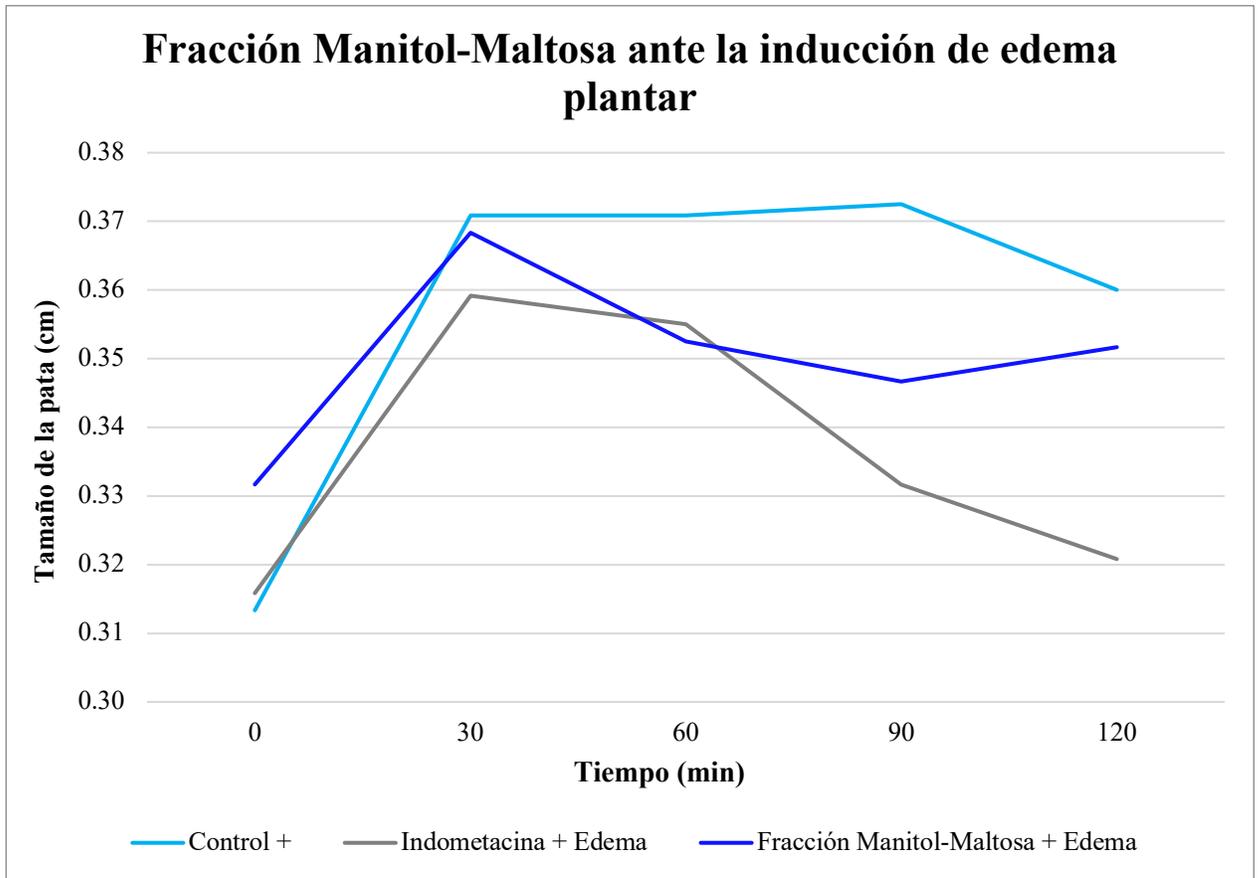
Gráfica 3. Efecto inflamatorio de la fracción obtenida de Maltosa de *A. cornigera* en la inducción de edema con albúmina en la pata trasera derecha en ratones CD-1



Gráfica 4. Efecto inflamatorio de la fracción de Glucosa de *A. cornigera* en la inducción de edema con albúmina en la pata trasera derecha en ratones CD-1



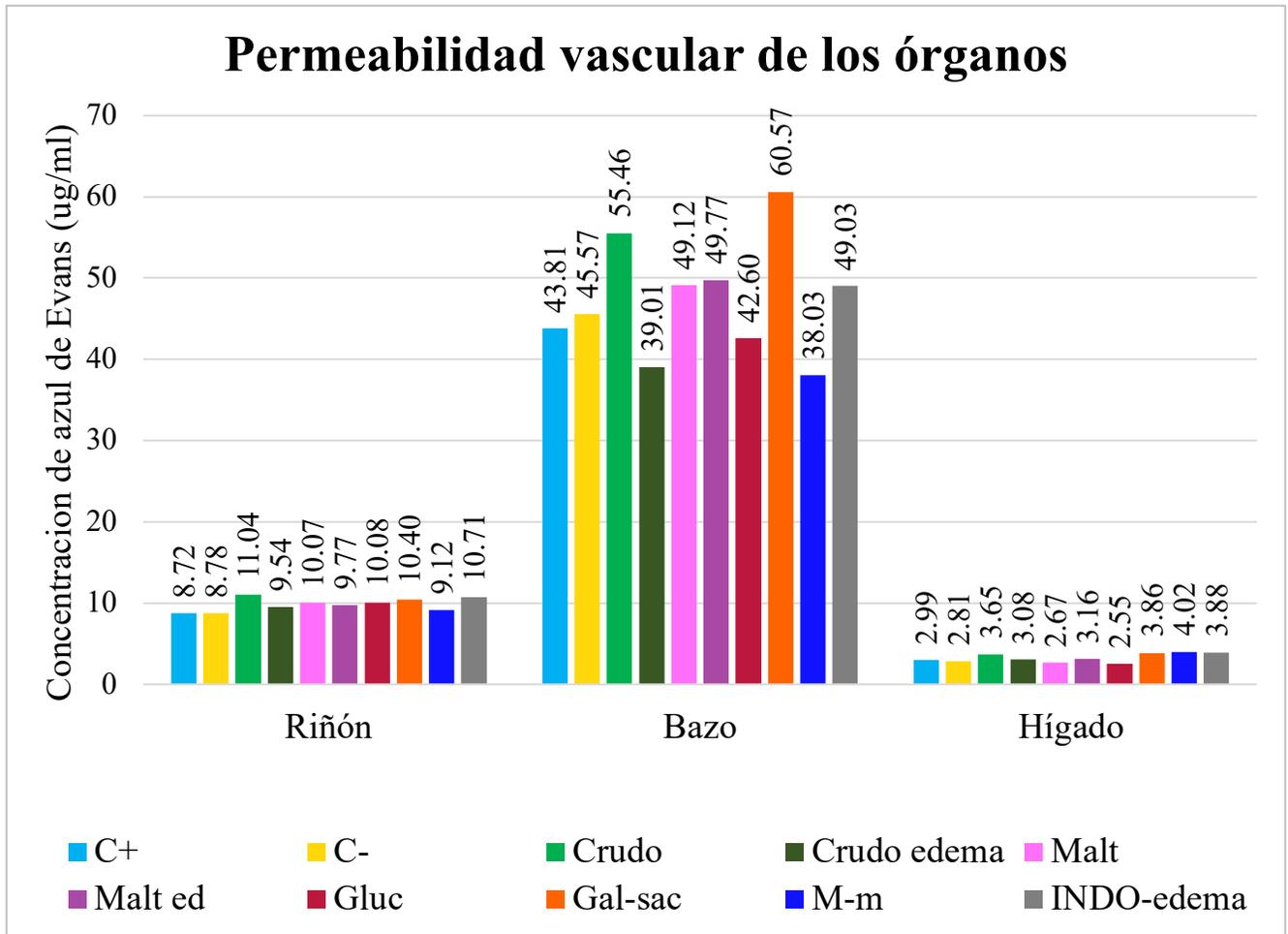
Gráfica 5. Efecto inflamatorio de la fracción de Galactosa-Sacarosa de *A. cornigera* en la inducción de edema con albúmina en la pata trasera derecha en ratones CD-1



Gráfica 6. Efecto inflamatorio de la fracción de Manitol-Maltosa de *A. cornigera* en la inducción de edema con albúmina en la pata trasera derecha en ratones CD-1

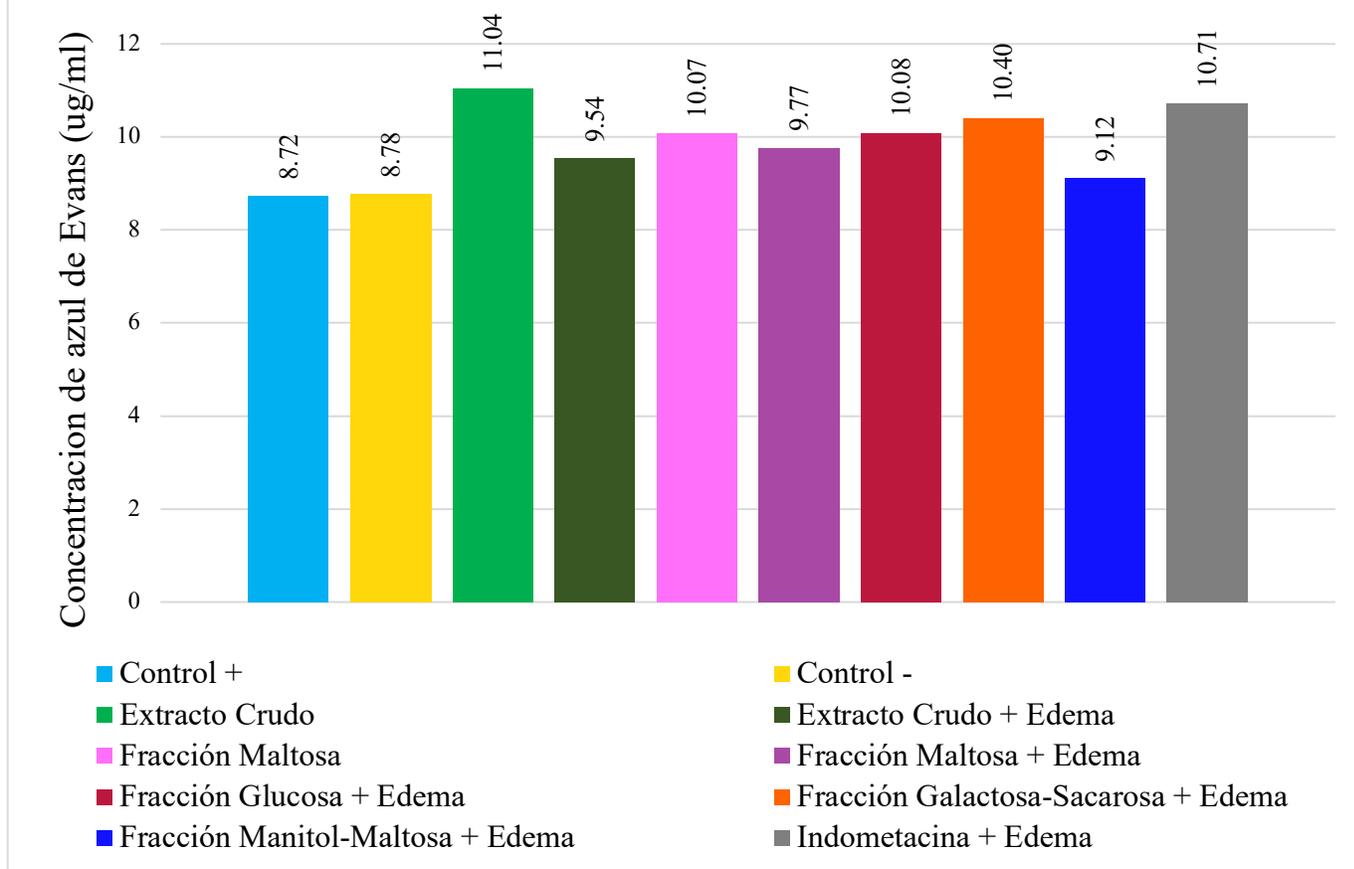
7.6.2 Ensayo Permeabilidad vascular

En la gráfica 7 se observa que el órgano con mayor permeabilidad fue el bazo, en este tuvo mayor impacto la fracción Galactosa-Sacarosa en presencia de edema (gráfica 9). En el caso de los riñones, se presentó mayor extravasación de Azul de Evans con el extracto crudo (gráfica 8), y en el hígado la fracción con mayor impacto fue Manitol-Maltosa en presencia de edema (gráfica 10).



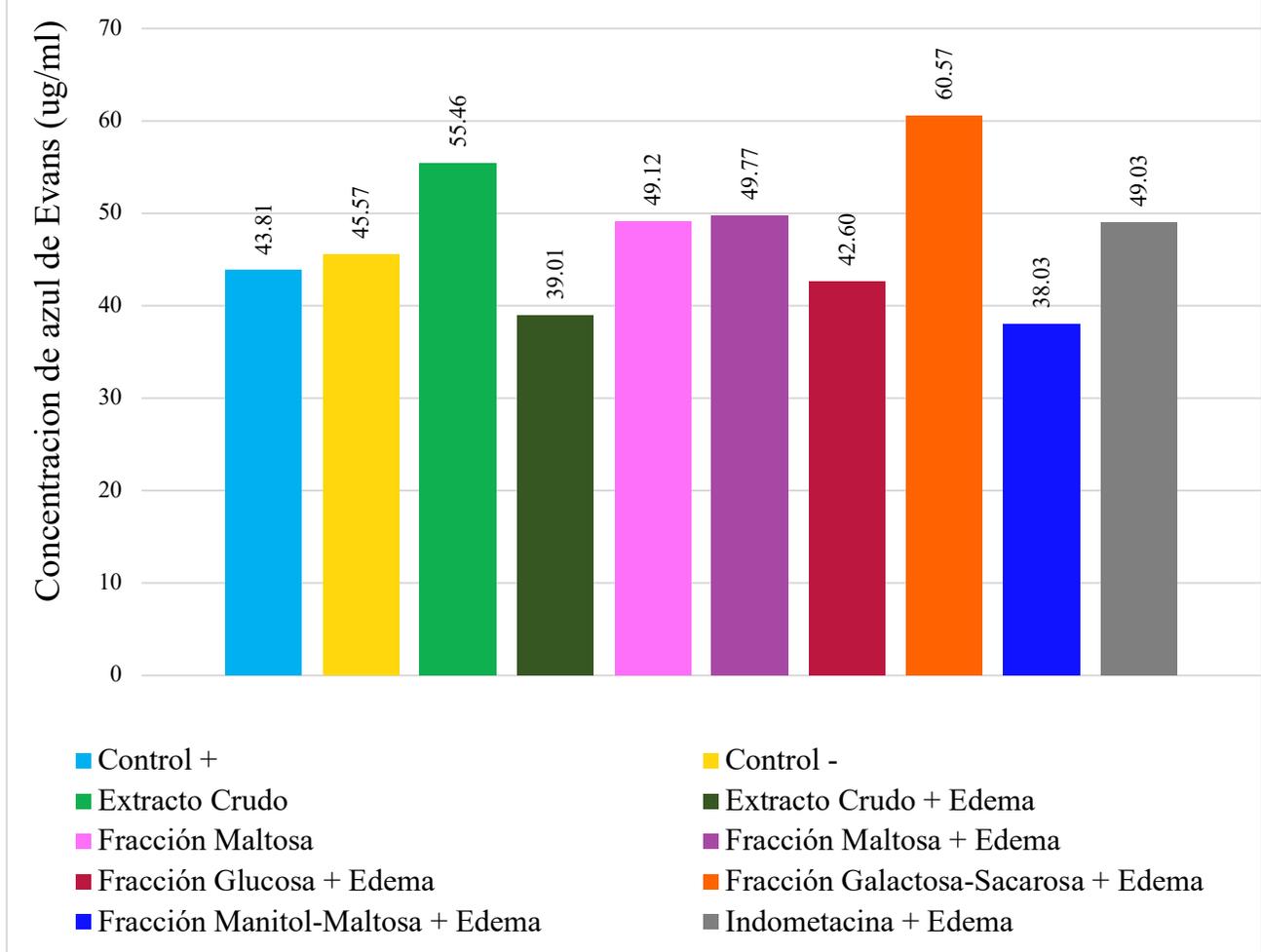
Gráfica 7. Permeabilidad vascular de los órganos en presencia de los distintos extractos representada en concentración (ug/mL) de Azul de Evans

Permeabilidad vascular de los riñones



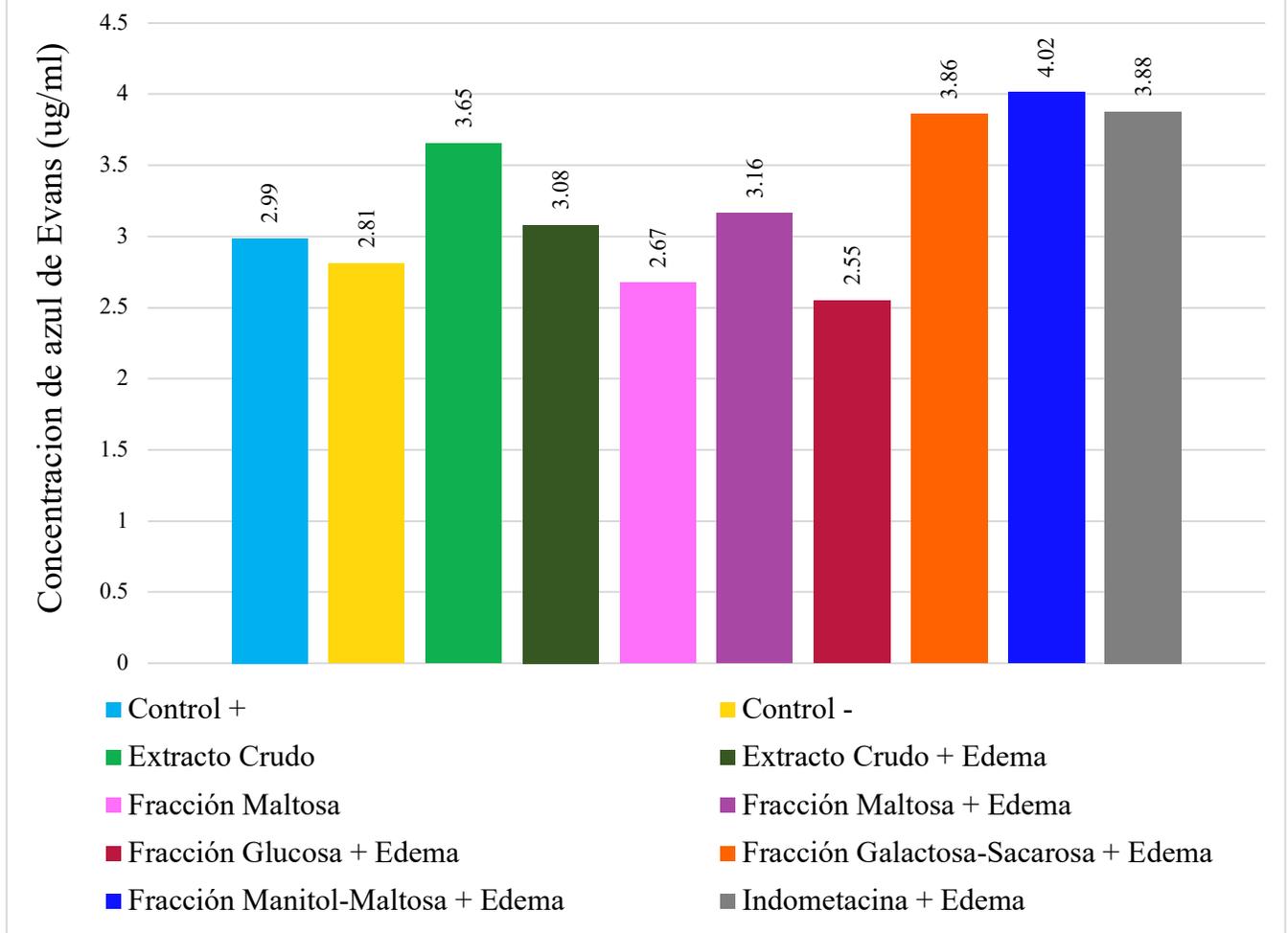
Gráfica 8. Concentración de Azul de Evans (ug/mL) en los riñones de ratones CD1. Permeabilidad vascular del riñón en presencia de los distintos extractos.

Permeabilidad vascular del bazo



Gráfica 9. Concentración de Azul de Evans (ug/mL) en los riñones de ratones CD1. Permeabilidad vascular del bazo en presencia de los distintos extractos.

Permeabilidad vascular del hígado



Gráfica 10. Concentración de Azul de Evans (ug/mL) en los riñones de ratones CD1. Permeabilidad vascular del hígado en presencia de los distintos extractos.

8. Discusión

Los métodos empleados para la extracción de este tipo de proteínas se basan en la solubilización de las proteínas por aumento de la fuerza iónica en el medio debido a la presencia de sales de sodio (Flores, 2016), sin embargo, en este estudio se observó mayor efectividad con el uso del método PBS sódico desgrasado con hexano y precipitado con sulfato de amonio al 80%. Lo anterior se atribuye al uso de una solución de alta fuerza iónica que solo permite la elución de las proteínas por el intercambio de biomoléculas por iones Cl^- y Na^+ (Duong-Ly y Gabelli, 2014), mientras que con PBS, las moléculas de agua presentes, se adhieren alrededor de la proteína, permitiendo inmovilizarla y evitar su desnaturalización o cambios conformacionales, en posteriores procesos (Laboratorio de Genómica Viral y Humana, 2008).

En las leguminosas el contenido total de lípidos corresponde a menos del 8%, donde se presentan ácidos grasos (Quintero *et al.*, 2022). Si bien desgrasar las hojas reduce la cantidad de material del cual extraer proteínas de tipo lectina (Tabla 2), resulta conveniente este paso, ya que además de reducir más de la mitad el porcentaje de ácidos grasos, la cantidad de proteínas totales extraídas es mayor en el extracto de PBS previamente desgrasado con hexano (Tabla 3). En el caso de las lectinas, estas interactúan con glicolípidos en las membranas celulares (Carrillo, 2013), por lo que desgrasar ayuda a liberar estas moléculas de su unión a glicolípidos; además de la precipitación de proteína soluble utilizando sulfato de amonio al 80%, que estabiliza la estructura de las proteínas al incrementar la tensión superficial de la solución debido al uso de sales, incrementando el efecto hidrofóbico (Hernández, 2016).

Si bien, no existe evidencia de que la actividad biológica de las lectinas esté relacionada con la concentración de estas proteínas, en este caso es importante obtener una cantidad suficiente de proteína con la cual trabajar todos los ensayos biológicos, aún después de los procesos de purificación, puesto que no hay reportes previos sobre la presencia de estas moléculas en *A. cornigera*. Aunado a esto, es preferible contar con extractos que contengan la menor cantidad posible de carbohidratos, ya que estos pueden interferir en los ensayos de hemaglutinación, resultando en una unión parcial a los carbohidratos de las membranas de los eritrocitos de las proteínas en el extracto, que no permitiría analizar el efecto real de las proteínas de esta planta.

La principal característica de las lectinas, es la aglutinación de células, especialmente eritrocitos (Rodríguez *et al.*, 2004), lo cual resulta el fenómeno de hemaglutinación. Aunque *A. cornigera* no cuenta con estudios acerca de estas moléculas, ambos extractos, tanto en su forma cruda como semipurificada, mostraron cierto grado de hemaglutinación en al menos una dilución, lo cual indica la presencia de proteínas con actividad de lectinas. Esto puede atribuirse en primer lugar, a que es una planta de la familia de las leguminosas, la cual cuenta con varios estudios sobre lectinas; en segundo lugar, otras plantas del mismo género como *A. constricta* (Lagarda, 2017) y *A. farnesiana* (Ferreira *et al.*, 2013) presentan actividad hemaglutinante por proteínas tipo lectina. No obstante, si nos basamos en el grado de hemaglutinación, es claro que la afinidad de los extractos por el grupo B⁺ (Figura 9) es mayor en contraste con el grupo A⁺ (Figura 10) y en especial con el grupo O⁺ (Figura 11).

De acuerdo con la cuantificación de proteínas posterior a la purificación por cromatografía de afinidad, podemos decir que las proteínas de tipo lectina poseen mayor afinidad por galactosa, glucosa y las combinaciones maltosa-galactosa y sacarosa-glucosa (Tabla 5), puesto que estas son las fracciones con mayor concentración de proteínas totales. Aunque *A. cornigera* no cuenta con reportes al respecto, existen plantas del género *Acacia* que presentan afinidad por D-galactosa y glucosa (Naik y Kumar, 2022). Cabe recalcar que la función biológica no está relacionada con dicha concentración, sino con la afinidad por los azúcares de la membrana celular, lo cual se comprueba al realizar las pruebas de hemaglutinación, donde las fracciones que mostraron mayor actividad hemaglutinante fueron Manitol-Maltosa, Maltosa, Galactosa-Sacarosa y Glucosa (Tabla 6).

Las pruebas de hemaglutinación posteriores a la cromatografía de afinidad volvieron más evidente la poca afinidad por el grupo sanguíneo O⁺, pues solo la fracción “Maltosa” aglutina eritrocitos de este grupo (Figura 14); reafirmando que el grupo hacia el cual presenta mayor afinidad es B⁺ (Figura 13), seguido del grupo A⁺. Esto probablemente está relacionado con la estructura de la membrana celular de cada grupo sanguíneo, puesto que cada uno cuenta con una secuencia de carbohidratos terminales que los distingue. Pese a que el grupo O presenta la estructura base común para todos los grupos (L-Fucosa-(α 1-2) D-Galactosa- β 1) (Khan, *et al.*, 2002), las proteínas tipo lectina de *A. cornigera* tienen mayor afinidad por las estructuras de A, con grupo terminal L-fucosa + N-acetilgalactosamina, y en especial por B, con grupo terminal L-fucosa + α -D-Galactosa

(Arbeláez García, 2009). Se deberán realizar estudios posteriores donde se evalúen azúcares diferentes a las utilizadas en este estudio, donde se incluya especialmente fucosa; o bien, distintas concentraciones de proteínas de una misma fracción.

La actividad hemaglutinante se relaciona con la capacidad de unirse a los carbohidratos de las membranas celulares debido a mayor especificidad de unión a ciertos carbohidratos. Una de las actividades biológicas altamente estudiada de las lectinas, es la capacidad de reducir los efectos inflamatorios producidos por ciertos agentes flogísticos, como carragenina (Ferreira *et al.*, 2013). Aunque existe un antecedente de que los extractos de *A. cornigera* pueden disminuir la inflamación (Maldini, *et al.*, 2009), no existe evidencia de que sean proteínas tipo lectina las que participen en dicho proceso. Para analizar el papel de las proteínas tipo lectina de *A. cornigera*, se probó el extracto crudo y las fracciones con mayor actividad hemaglutinante en un modelo *in vivo*, donde todos los grupos alcanzaron la máxima inflamación a los 30 minutos (Gráfica 1). La fase aguda de la inflamación ocurre en los primeros minutos hasta unas horas enseguida de un estímulo dañino. Es importante prevenir la progresión de la inflamación hasta la fase crónica, que conduce a daño tisular y posteriormente necrosis (Coico y Sunshine, 2015). Existen casos donde se requiere la reducción rápida de la inflamación, para este efecto (aunque se presenta un repunte después de 90 minutos) tres fracciones redujeron rápidamente el edema: Glucosa, mostró una disminución más rápida (Gráfica 4), Galactosa-Sacarosa (gráfica 5) y en especial Manitol-Maltosa (gráfica 6), que controla el repunte después de los 90 minutos, además de ser lo más cercano al comportamiento de la Indometacina, no permitiendo el incremento de la inflamación. Un purificado de lectina específica de galactosa aislada de *Bauhinia monandra* (de la familia Fabácea) provocó la reducción de edema, inducido por carragenina, a una concentración de 60 mg/kg de peso en ratones (Konozy *et al.*, 2022). Se cree que este efecto se deba a la inhibición de moléculas como prostaglandinas, citocinas como IL1 β y TNF α , que promueven la inflamación (Oliveira *et al.*, 2010). Además, una de las vías que activa al sistema del complemento es iniciada por la Lectina de Unión a Manosa (MBL), esta lectina también se puede unir a maltosa y glucosa en en la superficie celular (Berrón *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que el aumento de permeabilidad vascular puede originarse a partir de la respuesta inflamatoria (Wick *et al.*, 2018). En este proceso se ven involucrados los órganos altamente vascularizados: bazo, hígado y riñones. En condiciones fisiológicas el endotelio de los

vasos sanguíneos es impermeable a las proteínas, como la albúmina, por tanto, la albúmina queda restringida al flujo sanguíneo y no pasa al líquido extracelular. El Azul de Evans es un tinte que se une a la albúmina, por lo que resulta útil para cuantificar el grado de extravasación de proteínas que se da ante un proceso inflamatorio. El incremento de permeabilidad vascular se asocia con el daño al endotelio; de acuerdo con esto el extracto crudo fue el que generó mayor daño en este órgano (gráfica 8) (Radu y Chernoff, 2013). En la gráfica 7 es evidente que el órgano con mayor permeabilidad fue el bazo, en este tuvo mayor impacto la fracción Galactosa-Sacarosa en presencia de edema, seguido del extracto crudo (Gráfica 9). En el hígado la fracción con mayor impacto fue Manitol-Maltosa en presencia de edema (gráfica 10). El bazo contiene macrófagos fagocíticos (Fernández et al., 2005); así mismo el hígado participa en la RI con la fagocitosis de macrófagos, estos últimos tienen participación en la vía de las lectinas del sistema del complemento (Berrón *et al.*, 2003).

9. Conclusiones

Se logró extraer proteínas tipo lectina de las hojas de *Acacia cornigera*, una planta de la familia de las leguminosas mediante el uso de dos métodos salinos distintos, de los cuales el más eficiente resultó ser PBS sódico 0.1 M pH=7.4, previamente desgrasado con hexano, precipitado con sulfato de amonio al 80%.

La purificación de los extractos favoreció la actividad biológica de las proteínas obtenidas, de manera que estas mostraron alta afinidad por las combinaciones de azúcares Maltosa-Galactosa y Sacaros-Glucosa, seguidos de Glucosa. Dicha afinidad mostró tener relación con su afinidad por ciertos grupos sanguíneos, aunque estas proteínas no resultaron ser exclusivamente específicas para un grupo, sí revelaron mayor afinidad al grupo sanguíneo B⁺, en especial ante la presencia de azúcares.

Las proteínas tipo lectina enlazadas a Manitol-Maltosa tienen un comportamiento similar a un fármaco comercial (Indometacina) ante la inducción de un proceso inflamatorio en un modelo *in vivo*. Dicho efecto, en conjunto con el incremento de la permeabilidad en el bazo y en el hígado, nos indican una posible relación con la activación del sistema del complemento mediante la vía de las lectinas, sin embargo se requieren estudios más profundos acerca de estos mecanismos.

10. Referencias

- Abdullaev, F. y Castillo Villanueva, A. (2005). Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista Investigación Clínica*, 57 (1), 55-64. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revinvcli/nn-2005/nn051g.pdf>
- Aguilar Vázquez, J., Pina Canseco, M., Gochi Ponce, Y. y Pérez Santiago, A. D. (2021). Efecto antiproliferativo en líneas celulares de cáncer de mama y cérvico-uterino causado por nanotubos de carbono multipared - lectina de *Phaseolus lunatus* var. *silvester* Baudet. *Revista biomédica*, 32 (2), 87-97. Doi: <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v32i2.863>
- Arbeláez García, C. A. (2009). Sistema de Grupo Sanguíneo ABO. *Medicina & Laboratorio*, 15 (7), 329-347. <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2009/myl097-8c.pdf>
- Assreuy, A. M., Shibuya, M. D., Martins, G. J., De Souza, M. L., Cavada, B. S., Moreira, R. A., Oliveira, J. T., Ribeiro, R. A. y Flores, C. A. (1997). Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators of inflammation*, 6(3), 201-210. <https://doi.org/10.1080/09629359791695>
- Barret, K., Barman, S., Boitano, S. y Brooks, H. (2010). *Ganong, Fisiología Médica*. McGraw Hill.
- Berrón Pérez, R., Penagos Paniagua, M. J., Zaragoza-Benítez, J. M., Rodríguez Álvarez, J. y Blancas Galicia, L. (2003). El sistema del complemento. Vías clásica y de la lectina que se une a la manosa. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátrica*, 12 (2), 46-52. <https://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2003/al032b.pdf>
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). *Cornezuelo*. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=acacia-cornigera>
- Carrillo Lamus, M. P. (2013). Utilización de lectinas en la inhibición de la adhesión de *Pasteurella multocida*. *Revista de medicina veterinaria*, (25), 93-107. <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n25/n25a09.pdf>
- Casas Corredor, Z. Y., Reyes Montaña, E. A. y Vega Castro, N. A. (2016). Lectinas con dominio de leguminosa: características estructurales y utilidad como agentes insectistáticos e insecticidas. *Chilean journal of agricultural and animal science*, 32 (2), 157-169. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902016000200009>.

- Cervantes Villagrana, R. D., Cervantes Villagrana, A. R. y Presno Bernal, J. M. (2014). Mecanismos de señalización involucrados en la resolución de la inflamación. *Gaceta Médica de México*, 150 (9), 440-449. https://www.anmm.org.mx/GMM/2014/n5/GMM_150_2014_5_440-449.pdf
- Clavijo Romero, F. (2018). *Producción de lectinas de origen vegetal y fúngico y evaluación de su potencial antimicrobiano*. [Tesis de licenciatura]. Universidad de la República Uruguay.
- Coico, R. y Sunshine, G. (2015). *Immunology. A short course*. Wiley Blackwell.
- Cosío, B. G., Torrego, A. y Adcock, I. M. (2005). Mecanismos moleculares de los glucocorticoides. *Archivos de bronconeumología*, 41 (1), 34-41. <https://doi.org/10.1157/13070282>
- Cuello, H. (2018). *Caracterización del perfil de glicosilación de proteínas con un rol clave en glioma*. Fundación Bunge y Burn. <https://www.fundacionbyb.org/Subsidios/Oncologia/Caracterizaci%C3%B3n-del-perfil-de-glicosilaci%C3%B3n-de-prote%C3%ADnas-con-un-rol-clave-en-glioma>
- Divins, M. J. (2014). Información de Mercado. *Farmacia profesional*, 28 (5), 19-25. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-X0213932414516582>
- Drugbank. (2024). *Indomethacin*. Drugbank online. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00328>
- Duong-Ly, K. C. y Gabelli, S. B. (2014). Chapter Eight - Using Ion Exchange Chromatography to Purify a Recombinantly Expressed Protein. *Methods in Enzymology*, 5041, 95-103. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00008-2>
- Eaton, D. C. y Pooler, J. P. (2006). *Fisiología renal de Vander*. McGraw Hill.
- Feria, M. (2014). Fármacos analgésicos-antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos. En Flórez, J. (Ed.), *Farmacología Humana*, (901-915). Masson. <https://clea.edu.mx/biblioteca/files/original/3233e9fb8d4c9c4419774a62e7d587c6.pdf>
- Fernández Tresguerres, J. A., Ruiz, C., Cachofeiro, V., Cardinali, D. P., Escriche, E., Gil Loyzaga, P. E., Juliá, V., Teruel, F., Pardo, M. y Menendez, J. (2005), *Fisiología humana*. McGraw Hill.
- Ferreira Abrantes, V. E., Matias da Rocha, B. A., Batista da Nórbea, R., Silva Filho, J. C., Souza Teixeira, C., Sousa Cavada, B., Alemeida Gadelha, C. A., Ferreira, S. H., Godoy Figueiredo, J., Santi Gadelha, T. y Delatorre Plinio. (2013). Molecular modeling of lectin-like protein from

Acacia farnesiana reveals a possible anti-inflammatory mechanism in carrageenan-induced inflammation. *BioMed Research International*, 2013, 1-9.

- Flores García, L.C. (2016). *Identificación de lectinas de *Ruta graveolens* con actividad citotóxica en células de cáncer de mama MCF-7*. [Tesis de maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://132.248.9.195/ptd2016/enero/0739619/0739619.pdf>
- Flórez, J. y Amado, J. A. (2014). Esteroides corticales y antiinflamatorios esteroideos. En Flórez, J. (Ed.), *Farmacología Humana*, (901-915). Masson. <https://clea.edu.mx/biblioteca/files/original/3233e9fb8d4c9c4419774a62e7d587c6.pdf>
- Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226 (1), 497-509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
- Freitas, F. P., Porto, M. L., Tranhago, C. P., Piontkowski, R., Miguel, E. C., Miguel, T. B., Martins, J. L., Nascimento, K. S., Balarini, C. M., Cavada, B. S., Meyrelles, S. S., Vasquez, E. C., & Gava, A. L. (2015). *Dioclea violacea* lectin ameliorates oxidative stress and renal dysfunction in an experimental model of acute kidney injury. *American journal of translational research*, 7(12), 2573–2588. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26885258/>
- Gallegos Torres, R.T. y Reyes Rocha, B.L. (2011). Lectinas vegetales: una alternativa terapéutica para el cáncer. *Desarrollo científico de enfermedades*, 19(5), 179-182.
- Gallegos Velasco, I. B., Fernández Rojas, B., Vázquez Aguilar, V., Sánchez Caballero, D., López Castellanos, M. S., García Cruz, L. M., Santiago Olivera, B. L. y Hernández Cruz, P. A. (2022). Las lectinas como herramientas en biomedicina. *Revista de educación bioquímica*, 41 (1), 28-40. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2022/reb221d.pdf>
- Gálvez, E. (2022). Anatomía y fisiología hepática. Atenea- Centro de educación profesional continua. <https://educacionateneacr.com/wp-content/uploads/2022/09/Anatomi%CC%81a-y-fisiologi%CC%81a-hepa%CC%81tica.pdf>
- García Barreno, P. (2008). Inflamación. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 102 (1), 91-159. <https://rac.es/ficheros/doc/00681.pdf>
- Gimeno, E. y Barbeito, C. (2004). Glicobiología, una nueva dimensión para el estudio de la biología y la patología. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/29379/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Gong, T., Wang, X., Yang, Y., Yan, Y., Yu, C., Zhou, R. y Jiang, W. (2017). Plant Lectins Activate the NLRP3 Inflammasome to Promote Inflammatory Disorders. *Journal of Immunology*, 198 (5), 2082–2092. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600145>
- González Costa, M. y Padrón González, A. A. (2019). La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. *Revista Habanera de ciencias médicas*, 18 (1), 30-44. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2019000100030
- Hernández Díaz, P., Martín González, O., Rodríguez de Pablos Vélez, Y. y Ganem Báez, F. A. (1999). *Aplicaciones de las lectinas*. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 15 (2), 91-95.
- Hernández Hernández, J. M. (2016). Formulación de una emulsión estabilizada por proteína de suero de leche con aplicación en suplementos para formación de masa muscular. Tesis. Universidad de los Andes. Departamento de Ingeniería Química Bogotá. <https://repositorio.uniandes.edu.co/server/api/core/bitstreams/5f0c6230-1564-411f-aaf9-31ac480b72f4/content>
- INIFAP. (2021). *Cornezuelo*. CONAFOR. https://www.conafor.gob.mx/catalogo_veg_tormento/especies/detalles/100
- Khan, F., Khan, R. H., Sherwani, A., Mohmood, S. y Azfer, A. (2002). Lectins as markers for blood grouping. *Medical Science Monitor*, 8(12), 293-300. <https://medscimonit.com/abstract/index/idArt/4798>
- Konozy, E., Osman, M. y Dirar, A. (2022). Plant lectins as potent Anti-coronaviruses, Anti-inflammatory, antinociceptive and antiulcer agents. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103301>
- Laboratorio de Genómica Viral y Humana. (2008). *Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS)*. Facultad de Medicina UASLP. Standard Operating Procedures (SOP's). https://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_PBS_SPA.pdf
- Ladrón de Guevara, V. (2015). Anatomía y fisiología del bazo. En Torres, E., Francis, J., Sahagún, F. y Stalnikowitz, D. (Eds.), *Gastroenterología*. McGraw Hill.
- Lagarda Díaz, I., Guzmán Partida, A. M. y Vázquez Moreno, L. (2017). Legume lectins: proteins with diverse applications. *International journal of molecular sciences*, 18, 1242, 1-18. [DOI: 10.3390/ijms18061242](https://doi.org/10.3390/ijms18061242)

- León Regal, M., Alvarado Borges, A., de Armas García, J., Miranda Alvarado, L., Varens Cedeño, J. y Cuesta del Sol, J. (2014). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares: cifras alarmantes. *Revista Finlay*, 5(1), 47-62. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24342015000100006
- Maldini, M., Sosa, S., Montoro, P., Giangaspero, A., Balick, M. J., Pizza, C., y Della Loggia, R. (2009). Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. *Journal of ethnopharmacology*, 122(3), 430–433. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.02.002>
- Mishra, A., Behura, A., Mawatwal, S., Kumar, A., Naik, L., Mohanty, S., Manna, D., Dokania, P., Mishra, A., Patra, S. y Dhiman, R. (2019). Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food and chemical toxicology*, 134, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110827>
- Molist García, P., Megías Pacheco, M y Pombal Diego, M.A. (2017). Técnicas histológicas. Lectinas en *Atlas de histología vegetal y animal*. <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-lectinas.php?tema=b>
- Oliveira Vanderlei, E. S., Nobre Rabelo Patoilo, K. K., Alcântara Lima, N., Souza Lima, A. P., Gurgel Rodrigues, J. A., Castelo Melo Silva, L. M., Pereira Lima, M. E., Lima, V. y Barros Benevides, N. M. (2010). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. *International Immunopharmacology*, 10 (9), 1113-1118. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.06.014>
- Palomares, L.A. (2005). *La N-glicosilación: una modificación postraduccional altamente sensible a las condiciones de bioproceso*. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://smbb.mx/congresos%20smbb/merida05/TRABAJOS/magistrales/M-7.pdf>
- Pedone, F. (2013). Hepatopatías crónicas y soporte nutricional. Tesis de licenciatura. Universidad FASTA Facultad de Ciencias Médicas. http://redi.ufasta.edu.ar:8082/jspui/bitstream/123456789/3080/2/2013_n_303_L.pdf
- Pozo, M., Camello Almaraz, C., y Camello, P. J. (2016). Fisiología hepática. En Fernández Tresguerres, J. A., Ruiz, C., Cachofeiro, V., Cardinali, D. P., Escriche, E., Gil Loyzaga, P. E., Juliá, V., Teruel, F., Pardo, M. y Menendez, J. (Eds.), *Fisiología humana*. McGraw Hill.

- Quintero Fernández, M. G., Alanís García, E., Ortega Ariza, J.A y Ramírez Moreno, E. (2022). El consumo de leguminosas y su efecto sobre la prevalencia del síndrome meabólico. *Educación y Salud Boletín Científico Instituto de Ciencias de la Salud*, 11 (21), 139-149.
- Rodríguez, M. V., Riquelme, B., Valverde, J. y Gattuso, S. (2004). Caracterización del efecto aglutinante de las lectinas de la familia de las fabáceas sobre los eritrocitos humanos mediante el análisis de imágenes. *Anales de física*, 16 (1), 247-248.
- Rosas Gómez de Salazar, J., Santos Soler, G., Martín Doménech, R., Costés Verdú, R. y Álvarez Cienfuegos, A. (2013). Antiinflamatorios no esteroideos. En Belmonte, M. A., Castellano, J. A., Román, J. A. y Rosas J.C., *Enfermedades reumáticas: Actualización SVR*, (923-934). Sociedad Valenciana Reumatología.
- Rosenfeld, R., Bangio, H., Gerwig, G. J., Rosenberg R., Aloni, R., Cohen, Y. Amor, Y., Plaschkes, I., Kamerling, J. P. y Yakar Maya, R. B. (2007). A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation. *Biochemical and biophysical methods*, 70, 415-426. DOI: [10.1016/j.jbbm.2006.09.008](https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.09.008)
- Salgado Tepalo, J. D. (2006). Purificación y caracterización bioquímica y fisicoquímica de lectinas de frijol y amaranto cultivados en el Estado de Hidalgo. [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Santos, A., da Silva, M., Napoleão, T., Paiva, P., Correia, M. y Cohelo, L. (2014). Lectins: functions, structure, biological properties, and potential applications. *Current topics in peptide & protein research*, 15, 41-62.
- Serra, H. A., Roganovich, J. M. y Rizzo, F. L. L. (2012). Glucocorticoides: paradigma de medicina traslacional. De lo molecular al uso clínico. *Medicina (Buenos Aires)*, 72 (2), 158-170. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802012000200015
- Van Damme, E. J. M. (2011). Lectins as tools to select for glycosylated proteins. En *Methods in Molecular Biology*, 753, 289-297. DOI [10.1007/978-1-61779-148-2_19](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-148-2_19)
- Vázquez Luna, A., Rivadeneyra Domínguez, E. y Díaz Sobad, R. (2012). Lectinas en frutas y plantas comestibles: nuevas posibilidades de interacción entre la ciencia de los alimentos y la biomedicina. *CienciaUAT*, 6(3), 60-66. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=441942927008>