



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

EFFECTO DE LA LECTINA DE FRIJOL TÉPARI (*Phaseolus acutifolius*) SOBRE LA PROLIFERACION Y SOBREVIVENCIA DE CÉLULAS CANCERÍGENAS DE COLON

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

FRANCISCO JOSUÉ LÓPEZ MARTÍNEZ

DIRIGIDA POR

DRA. TERESA GARCÍA GASCA

CENTRO UNIVERSITARIO
QUERÉTARO, QRO. 2007
MÉXICO

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

No. Add. 473348

No. Título _____

Clas TS

616.99449

L864e

**EL PRESENTE TRABAJO SE EFECTUÓ EN EL
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE
LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO, BAJO LA
DIRECCIÓN DE LA DRA. TERESA GARCÍA GASCA Y EN EL
LABORATORIO DE MECANISMOS DE DEFENSA DE
PLANTAS EN EL CINVESTAV UNIDAD IRAPUATO, A CARGO
DEL DR. ALEJANDRO BLANCO LABRA.**

RESUMEN.

Las lectinas han sido consideradas como factores antinutricionales presentes en alimentos como las leguminosas sin embargo, este tipo de proteínas presentan propiedades anticancerígenas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de una lectina semipura de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre la sobrevivencia y proliferación de células cancerígenas de colon humano CaCo2 y su contraparte normal. Se obtuvo una fracción rica en lectina de frijol tépari mediante cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico, con una actividad aglutinante específica de 1170 Unidades de aglutinación/mg de proteína. Las células se sembraron en placas de 24 pozos y a las 24 horas se cambiaron las condiciones agregando tratamientos con diferentes concentraciones de la fracción de lectina en medio DMEM con 0.5% de albúmina sérica de bovino (ASB). Posteriormente las células se incubaron a 37° C y 10% de CO₂ durante 24 o 72 horas, se cosecharon con tripsina y se contaron directamente al microscopio. La tasa de proliferación se calculó comparando la proliferación de células tratadas con la fracción de lectina y células cultivadas únicamente con DMEM 0.5% ASB. La fracción de lectina inhibió la proliferación de las células CaCo2 en función de la concentración. La concentración inhibitoria del 50% de la proliferación celular (CI₅₀) fue de 0.563 µg de proteína/mL a las 24 horas de tratamiento y de 0.119 µg de proteína/mL a las 72 horas. Lo anterior muestra que para tiempos largos de tratamiento se requiere menor cantidad de lectina. Para las células IEC-18, la CI₅₀ a las 24 horas de tratamiento fue de 1.9 µg de proteína/mL, 3.4 veces mayor que para las células CaCo-2. La tasa de muerte celular se calculó comparando el número de células al inicio del experimento con el número obtenido después de los tratamientos. La concentración letal media (CL₅₀) fue de 2.87 y 2.99 µg de proteína/mL para tratamientos de 24 y 72 horas, respectivamente, lo que muestra que el efecto citotóxico ocurre a tiempos cortos de exposición. La CL₅₀ para las células IEC-18 a 24 horas de tratamiento fue de 7.94 µg de proteína, casi 3 veces más que para CaCo-2. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la lectina de frijol tépari es capaz de provocar inhibición de la proliferación y muerte a células de cáncer de colon de manera diferencial, ya que se requirió aproximadamente 3 veces más lectina para afectar al mismo nivel a células intestinales normales. Estudios en curso se concentran en estudiar los mecanismos de acción y el efecto *in vivo* de dicha lectina para evaluar su potencial como agente terapéutico contra cáncer de colon.

Palabras clave: lectina, cáncer, proliferación, sobrevivencia.

DEDICATORIAS

A mis Padres; Martha y Manuel, porque sin su amor y ejemplo no hubiera llegado hasta donde estoy. Gracias por motivarme y enseñarme que la vida es hermosa y que está hecha de sueños, que sólo basta esforzarse y ponerle empeño. Me enorgullezco de ser su hijo, los quiero mucho.

A mis hermanos; Dieter, Tadeo y Emaús, porque he aprendido bastantes cosas de cada uno de ustedes, son los mejores hermanos que podría tener. Personalidades tan distintas que, cuando convivimos y tenemos nuestros momentos de aventura, se complementan y surge el mejor equipo para vencer cualquier obstáculo. Gracias por todos los buenos y malos momentos.

A mis familiares; A mi abuelita Polo, que es la primera bióloga-aventurera de la familia, a mi Abuelita Pachita que siempre nos consintió con tantos dulces, a mi tía Vivís, siempre fuimos sus reyes. A mis tíos Chava y Viky, a mis primos y tíos que nos juntamos en las fiestas navideñas y bodas, tienen tanta felicidad que contagia.

A mi novia Vero, porque has sido mi inspiración y me has demostrado un amor sincero, gracias por todo tu apoyo y comprensión, por tu forma de enseñarme que no me encuentro solo, que siempre está Dios ayudándonos, gracias por esperarme y tener fe en esta relación. Tantas cosas que decirte y agradecerte que sólo puedo decir: Te amo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Tere, por toda su paciencia y amabilidad, por su entrega como Maestra, siempre está ahí para ayudarnos, Por la amistad que me ha brindado, las palabras de aliento y su sonrisa, que demuestran su carisma y la calidad de persona que es, la admiro y la quiero mucho Maestra.

A mis sinodales; Dr. Blanco, a Marco, a Jheny y a la Dra. Carmen, gracias por su tiempo y por la amabilidad que me brindad.

A mis amigos de la generación: Paloma, Moy, Silvia, Luis, Abraham, Alina, Dalia, Gracias por todos los momentos que compartimos y por todas las cosas que me han enseñado.

A Ceci, Droll, Chío, los aprecio por estar siempre con nosotros. A mis amigos del laboratorio: Ana, Lore, Anita, Pablo, Gaby, Viky, Chío, Janet, Chela, Perla, Tania, Marco, les agradezco todo el apoyo y confianza que me tienen.

A todos los que han dejado huella en mi, con sus enseñanzas, críticas, consejos y su ejemplo, Muchas Gracias.

INDICE GENERAL.

Contenido	Página
RESUMEN	<i>i</i>
DEDICATORIAS	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>iii</i>
ÍNDICE GENERAL	<i>iv</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>vii</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Cáncer	3
II.1.1. Definición de cáncer	3
II.1.2. Características de las células cancerosas	6
II.1.3. Proceso de carcinogénesis	8
II.2. Cáncer de colon	10
II.2.1. Anatomía del colon	10
II.2.2. Fases del desarrollo del cáncer de colon	12
II.2.3. Factores de riesgo de cáncer de colon	12
II.3. Tratamientos contra el cáncer	14
II.4. Lectinas	15
II.4.1. Descripción e Historia	15
II.4.2. Clasificación	16
II.4.3. Toxicidad de las lectinas	19

VIII.1. Purificación de la Lectina	32
VIII.2. Efecto de la fracción semipura de Lectina sobre la proliferación y sobrevivencia de células de cáncer de colon y su contraparte normal.	35
IX. CONCLUSIONES	44
X. PERSPECTIVAS	45
XI. BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXO 1	52
1. Frijol Tépari	52
1.1. Características y descripción	52
1.2. Origen y distribución geográfica	53

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura	página.
1. Puntos de control en el ciclo celular	4
2. Proceso de carcinogénesis	9
3. Anatomía del colon	11
4. Fases del desarrollo del cáncer de colon.	13
5. Concanavalina A	18
6. Cromatografía de intercambio iónico	33
7. Perfil electroforético	34
8. Efecto de la fracción concentrada de lectina de frijol tépari sobre la proliferación y sobrevivencia de células CaCo-2 a 24 Horas de tratamiento.	36
9. Efecto de la fracción concentrada de lectina de frijol tépari sobre la proliferación y sobrevivencia de células CaCo-2 a 72 Horas de tratamiento	38
10. Efecto de la fracción concentrada de lectina de frijol tépari sobre la proliferación y sobrevivencia de células IEC-18 a 24 Horas de tratamiento.	40
11. Frijol tépari (<i>Phaseolus acutifolius</i>)	53

I. INTRODUCCIÓN.

Una de las principales causas de muerte a nivel mundial, según la Organización Mundial de la Salud, es el cáncer. Ésta es una enfermedad producida por cambios en los mecanismos que regulan la diferenciación, la proliferación y la muerte celular, por lo que las células cancerosas proliferan sin control (Flórez, 2000). En tanto el crecimiento del tumor permanezca localizado, la enfermedad se puede tratar y curar por extirpación quirúrgica del tumor y el tejido que lo rodea. Sin embargo, una de las características prominentes de los tumores malignos es su tendencia a formar metástasis, es decir, las células se desprenden de la masa original, entran a la circulación linfática o sanguínea y se propagan a sitios distantes en el cuerpo, donde establecen tumores secundarios que ya no son susceptibles de extirpación quirúrgica (Alberts *et al.*, 1999).

Existen diferentes estrategias para combatir el cáncer como la quimioterapia y la radioterapia, pero estos tipos de tratamientos son muy agresivos e inespecíficos, presentando gran cantidad de efectos secundarios adversos (American Cancer Society, 2007). Por lo anterior se ha intensificado la búsqueda de compuestos anticancerígenos más específicos y entre ellos se encuentran las lectinas. Se trata de glicoproteínas de origen no inmune capaces de reconocer selectivamente a oligosacáridos de membrana (González de Mejía y Prisecaru, 2005). Se ha observado que las lectinas son capaces de aglutinar selectivamente a células transformadas, pueden inducir apoptosis y disminuir el crecimiento de las células tumorales, características que brindan gran interés como potenciales armas terapéuticas en el tratamiento del cáncer humano (Hernández *et al.*, 1999).

Las semillas de las plantas, en especial de leguminosas, son ricas en lectinas (Scheerens *et al.*, 1983) y se ha demostrado que dichas lectinas poseen propiedades citostáticas y citotóxicas sobre células tumorales. El frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) es una leguminosa comestible adaptada a condiciones áridas y semiáridas. Este frijol contiene una lectina de 34 kDa y se ha observado que una fracción concentrada de dicha proteína es capaz de afectar

diferencialmente a fibroblastos de ratón 3T3 normales y cancerígenos ya que, para provocar la muerte de los últimos, se requiere aproximadamente 8 veces más proteína respecto a los normales (Hernández, 2005).

No se ha estudiado el efecto de la fracción concentrada de la lectina de frijol tépari sobre células de cáncer de colon. Este tipo de cáncer ha ido tomando importancia en los últimos años (OMS, 2006) y, debido a la localización anatómica de dicho órgano, es factible el contacto de lectinas con células cancerígenas. Por lo anterior, el presente trabajo pretende determinar si la lectina de frijol tépari es capaz de afectar diferencialmente el crecimiento de células de cáncer de colon humano CaCo2 respecto a su contraparte normal.

II. ANTECEDENTES.

II.1 Cáncer

II.1.1 Definición de Cáncer.

El cáncer se define como una enfermedad crónico-degenerativa producida por cambios en la información genética de las células. Éstas proliferan sin control llegando a formar tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva, destruyendo tejidos y órganos normales (Cox y Sinclear, 1998). La proliferación celular es la base del desarrollo del organismo y es también el primer proceso que origina un cáncer: el crecimiento descontrolado de un grupo de células (Muñoz, 1997).

El crecimiento y proliferación de las células está regulado por el ciclo celular. Es cuando las células aumentan su contenido de moléculas y orgánulos (crecimiento en masa o tamaño) y duplican y segregan sus cromosomas, para posteriormente dividirse en dos células hijas que son genéticamente iguales. El ciclo celular consta de cuatro fases: G1, S, G2 y M (Figura 1). La fase G1 (del inglés "Gap" o intervalo) es el período de 6-12 h que sigue a una división celular y es previo a la síntesis o replicación del ADN. Durante este tiempo, la célula dobla su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. Hay células que pueden parar su progresión hacia la división en este estadio y permanecer durante días, meses o años en estado de reposo sin aumento de masa, en lo que se ha denominado fase G0. En la fase G1 existe un punto de control llamado el punto de restricción R en el que la célula comprueba que ha generado la masa necesaria para seguir adelante y comenzar la síntesis de ADN (Muñoz, 1997).

La fase S (de "Síntesis" del ADN) corresponde al tiempo durante el cual se replica el ADN (6-8 h). Cada cromosoma pasa a tener dos cromátidas, es decir, dos moléculas de ADN de cadena doble, que son copia una de la otra. En esta fase

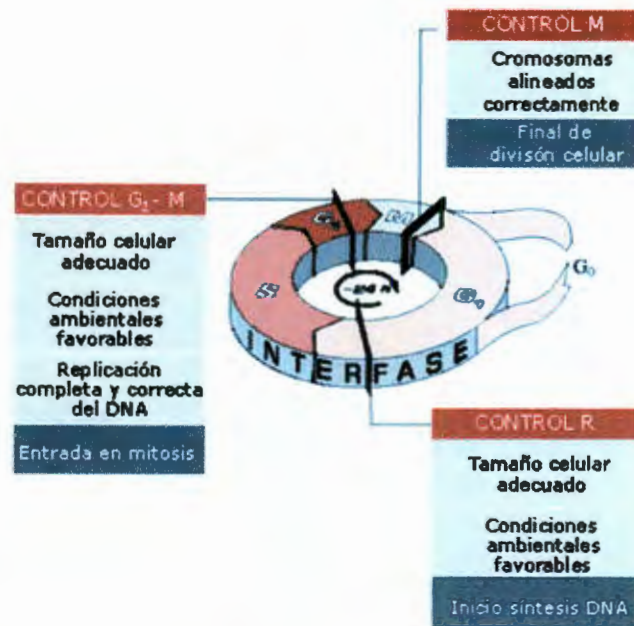


Figura 1. Puntos de control en el ciclo celular (www.bioteach.ubc.ca). El ciclo comienza con la Fase G₁ en la que existe un punto de restricción llamado R, en el que se comprueba que se ha generado la masa celular necesaria y las condiciones favorables para la síntesis de ADN. Después de la Fase de síntesis de ADN, se encuentra el punto de control G₂-M, en donde se comprueba la replicación del ADN y que se ha duplicado la masa celular de modo que pueda dar lugar a dos células hijas. Finalmente en la etapa de Mitosis existe un punto de control M, en donde sólo se permite seguir adelante si todos los cromosomas están alineados sobre el huso mitótico.

existe un segundo punto de control entre las fases G₂-M, en el que la célula debe comprobar dos condiciones antes de dividirse: que ha duplicado la masa de modo que puede dar lugar a dos células hijas, y que ha completado la replicación del ADN, y sólo lo ha hecho una vez. Finalmente, las células entran en la fase de mitosis M (1 h) propiamente dicha. Los cromosomas se condensan enormemente haciéndose visibles al microscopio óptico como entidades individuales, y los microtúbulos se organizan a partir de dos cuerpos polares que se sitúan en ambos extremos de la célula y forman el huso mitótico que va a servir como guía a los cromosomas. En este momento existe otro punto de control M, que sólo permite seguir adelante si todos los cromosomas están alineados sobre el huso. Si esto es así, las cromátidas hermanas se separan dirigiéndose cada una hacia un polo de la célula (anafase). Cuando llegan a los extremos (telofase), la célula comienza a

escindirse (citocinesis) por la zona media dando lugar a dos células hijas. La membrana nuclear vuelve a formarse y los cromosomas a descondensarse, originándose dos células hijas idénticas, en principio, a la progenitora (Muñoz, 1997).

La existencia de puntos de control del ciclo celular es clave. Permiten que todo el proceso tenga lugar cuando la célula está correctamente preparada mediante una triple comprobación de que las condiciones necesarias para iniciar una nueva fase se han dado. Existen controles negativos de la proliferación, potencialmente muy importantes para la prevención del cáncer, que se activan para detener el ciclo cuando se ha dañado la integridad del genoma y evitar así la aparición de células que puedan convertirse fácilmente en cancerosas. Muchos carcinógenos químicos y radiaciones actúan dañando el ADN o el sistema de microtúbulos necesario para la mitosis. Sin embargo, también causas internas pueden ocasionar alteraciones en el ADN, como los procesos de reordenamiento genético que tienen lugar durante el desarrollo.

Para que una mutación pueda dar lugar a una célula cancerígena debe ocurrir en genes específicos. Dichos genes son conocidos como protooncogenes, que se encargan de que la célula crezca y se multiplique de manera normal. Al sufrir mutaciones se altera por completo su función y se convierten en oncogenes, los cuales inducen serios trastornos en el patrón proliferativo de las células, y comienzan a reproducirse de manera desenfrenada, originando los tumores malignos (McCance y Huether, 1994). Desde 1938 se han aislado una gran cantidad de oncogenes retrovirales, entre los cuales destacan: src, jun y myc procedentes de pollo y el H-ras y abl, aislados de rata y ratón respectivamente (Torroella y Villa, 1998).

También existe otra clase de genes cuya expresión normal inhibe ésta transformación. Son genes que controlan negativamente la proliferación celular, se llaman genes supresores de tumores y determinan el orden de los eventos, así como la fidelidad e integridad de los sistemas de replicación y reparación del ADN.

Al mutar y no llevar a cabo correctamente su función se provoca un descontrol en la proliferación celular (Torroella y Villa, 1998). Entre los genes supresores de tumores se encuentran el p53 y el Rb. El primero tiene la función normal de capacitar a las células para reparar con éxito el ADN dañado, bloqueando el proceso de división celular hasta que haya reparado los daños y la célula pueda replicarse sin errores. El producto del gen Rb mantiene secuestrado el factor de la transcripción E2F y por tanto, arresta el ciclo celular en la fase G1. En el caso de que el daño no pueda ser reparado, entonces la célula activa el proceso de muerte celular programada denominado apoptosis y de esta forma evita que se transmitan los errores genéticos a su descendencia. El bloqueo de la apoptosis puede ser causado por mutación de genes supresores de tumores, dando como consecuencia la pérdida de este mecanismo y resultando en la inmortalización celular característica del proceso de carcinogénesis (Alberts *et al.*, 1999).

II.1.2 Características de las células cancerosas.

Entre las características que se observan en las células cancerosas destacan las siguientes:

- Las células cancerosas con frecuencia presentan una dotación cromosómica muy aberrante, alteración denominada aneuploidía (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).
- Ocurren cambios morfológicos notables en el citoplasma que casi siempre afectan al citoesqueleto. Mientras que célula normal por lo general contiene una red bien organizada de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, el citoesqueleto de las células cancerosas a menudo está reducido y/o desorganizado (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).
- Cambios en la superficie celular, incluyendo la alteración de las glicoproteínas (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).
- Algunas células cancerosas poseen nuevas proteínas en la superficie celular conocidas como antígenos asociados al tumor y pueden inducir la formación de anticuerpos dirigidos contra ellas (Karp, 1996).

-
- Típicamente las células cancerosas son menos adherentes, tanto entre sí como a los sustratos no celulares. Se cree que esta pérdida de adhesividad se correlaciona con la capacidad de las células cancerosas para abandonar una masa tumoral y emigrar a otros sitios dentro del cuerpo (Karp, 1996).
 - Independencia de las señales provenientes de otras células para crecer, sobrevivir y dividirse (Alberts *et al.*, 2006).
 - Tienen menos probabilidades de morir por apoptosis, esto se debe en parte a mutaciones en genes que regulan el programa de muerte celular (Alberts *et al.*, 2006).
 - Son genéticamente inestables, con una tasa de mutación más elevada que la de las células normales (Alberts *et al.*, 2006).
 - Promueven la producción de factores angiogénicos, generando la formación de vasos sanguíneos en su interior, llevando nutrientes para el desarrollo del cáncer (Alberts *et al.*, 2006).

Las células cancerosas se pueden distinguir de las normales por su movilidad en cultivo. Cuando una célula normal está en contacto con otra célula cesa su actividad y movimiento, ya que no pueden desplazarse unas sobre otras, y forman una capa en el fondo del plato de cultivo. Las células cancerosas, por lo general, ignoran las señales transmitidas por células vecinas y continúan sus actividades locomotoras acostumbradas; proliferan en cultivo hasta alcanzar una densidad celular muy alta en comparación con sus contrapartes normales (Avers, 1986).

Las células cancerosas también dependen mucho menos de la presencia de suero, el cual les suministra factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico o la insulina. Además, a diferencia de las células normales que requieren un sustrato sólido sobre el cual crecer, las células cancerosas generalmente pueden crecer suspendidas en un medio formado por agar suave o metilcelulosa viscosa. Por esta característica, se dice que las células cancerosas han perdido su dependencia a la fijación, indispensable para el crecimiento de células normales. Más importante aún, las células normales en cultivo muestran capacidad limitada para la división celular; luego de un número finito de divisiones

mitóticas sufren un proceso de envejecimiento que las incapacita para continuar creciendo y dividiéndose. Las células cancerosas aparentemente son inmortales en el sentido de que continúan dividiéndose de manera indefinida (Avers, 1986).

II.1.3 Proceso de Carcinogénesis.

Durante el proceso cancerígeno se pueden observar una serie de pasos que llevan a las células cancerosas a proliferar, sobrevivir e invadir otros órganos y ocurre en tres fases: Iniciación, promoción y progresión (Figura 2) (Geoffrey, 2000).

La primera etapa del proceso de carcinogénesis, es la iniciación y es cuando ocurre un daño permanente y transmisible en el ADN de una célula que, si no se repara, se fija como mutación, quedando la célula "iniciada". A los compuestos capaces de interaccionar con el ADN y dañarlo se les denomina genotóxicos, que pueden ser la radiación y diferentes compuestos químicos naturales o sintéticos. Después continúa la etapa de promoción, aquí ocurre una expansión clonal, que puede ser reversible, es donde se forma propiamente la neoplasia, las células promovidas que constituyen el clon tumoral siguen siendo todavía células benignas. Entre los agentes promotores se encuentran los esteroides y los lípidos de la dieta. Finalmente la etapa de progresión tumoral, es donde adquiere la neoplasia el carácter maligno, el clon neoplásico presenta cambios genéticos progresivos y acumulativos como aneuploidía, pérdida de alelos y amplificación génica. El rasgo distintivo de esta etapa terminal es la capacidad de escapar, invadir y colonizar órganos distantes (Torroella y Villa, 1998)

Para que las células malignizadas sigan creciendo es necesaria la formación de vasos sanguíneos que son inducidos por moléculas liberadas por las células tumorales en un proceso llamado angiogénesis. La irrigación por estos pequeños vasos pasa de una red de canales entrelazados que se extienden hasta los grandes vasos, manteniendo así el riego sanguíneo adecuado para las masas tumorales (Nagy *et al.*, 1995).

Agente carcinogénico
(químicos, radiación o
virus)

Activación de oncogenes
por el agente promotor

Tumor maligno

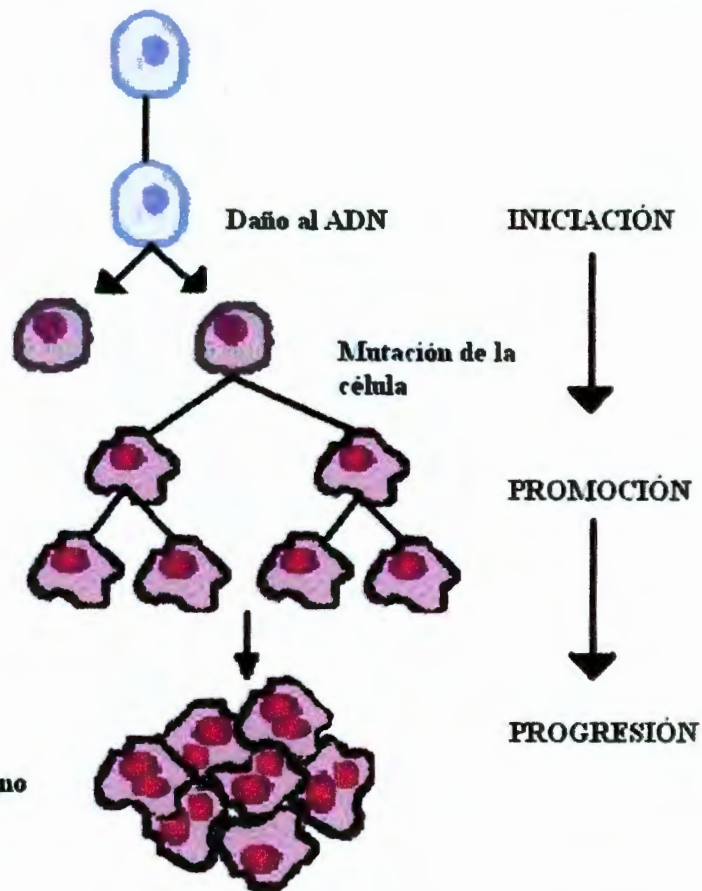


Figura 2. Proceso de Carcinogénesis. En la etapa de iniciación se presenta un daño permanente en el ADN, produciendo una mutación. En la segunda etapa (promoción), se forma el tumor y continúa la acumulación de daños que llevan a la etapa de progresión en la que las células adquieren la capacidad de invadir y colonizar órganos distantes (Geoffrey, 2000).

En el proceso de angiogénesis se incluyen (Bussolino *et al.*, 1997):

1. Degradación de la membrana basal por proteasas.
2. Migración de las células endoteliales.
3. Proliferación de células endoteliales y migración a la superficie.
4. Formación del lumen, generación de nuevas membranas basales, formación de anastomosis y circulación sanguínea.

Una de las características principales de las células cancerosas es la capacidad de migrar e invadir nuevos tejidos, ya que han perdido su adherencia y su posición localizada dentro del tejido organizado, a este proceso se le denomina invasión

(Nicolson, 1994). Al perder su adherencia, las células cancerosas pueden pasar a la circulación sanguínea o linfática del organismo y establecerse en zonas de proliferación alejadas de su sitio de aparición original, a estas zonas de crecimiento secundario se le denomina metástasis (Lodish *et al.*, 2002). En esta etapa, la actividad proteolítica, que ocurre en cascada, dentro y fuera del tumor provocan la degradación de la matriz extracelular favoreciendo la movilidad de las células tumorales hacia el torrente sanguíneo para después invadir los tejidos cercanos (Koblinski *et al.*, 2000)

II.2 Cáncer de colon.

El cáncer representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial según la Organización Mundial de la Salud, en donde se reporta que para el año 2005 los cánceres de pulmón, mama, próstata y colon fueron los de mayor incidencia, mientras que los principales causantes de muerte fueron: los de pulmón, estómago, colon y mama (OMS, 2006). Para el año 2005, el cáncer de colon representó la tercer neoplasia en orden de frecuencia y se reportó como la cuarta causa principal de muerte por cáncer en la población mundial, tanto en hombres como en mujeres (OMS, 2006). Datos reportados para el año 2004 indican que, en México, el porcentaje de defunciones por cáncer de colon fue de 4.1 en hombres y de 4.2 en mujeres, representando así la séptima y novena causa de muerte por cáncer respectivamente (INEGI, 2006).

II.2.1 Anatomía del Colon.

El colon y el recto forman parte del sistema digestivo. El colon es la primera sección del intestino grueso, que se extiende desde el yeyuno e íleon hasta el ano. El yeyuno no desemboca en la extremidad del intestino grueso, sino ligeramente encima de ésta, formando un fondo de saco llamado ciego (Rouvière y Delmas, 2001). El ciego es seguido por el colon, un tubo muscular que, en humanos, mide aproximadamente metro y medio de largo; cuyas funciones son absorber nutrientes y agua de los alimentos como ocurre en el intestino delgado (pero con una mayor cantidad de absorción de esta última) y servir de contenedor para el

material de desecho. Este material avanza hasta la última parte del intestino grueso llamado recto y es expulsado al exterior por el ano (Moffett *et al.*, 1993). El colon se divide en cuatro secciones (Figura 3); la primera es llamada ascendente o colon derecho y comienza en el área de unión con el intestino delgado. Le sigue la sección que se extiende a través del abdomen del lado derecho hacia el izquierdo, denominado colon transverso que continúa con el colon descendente o colon izquierdo. Éste va hacia abajo por el lado izquierdo del abdomen y llega hasta el colon sigmoides, que termina uniéndose al recto (Quiroz, 1975).

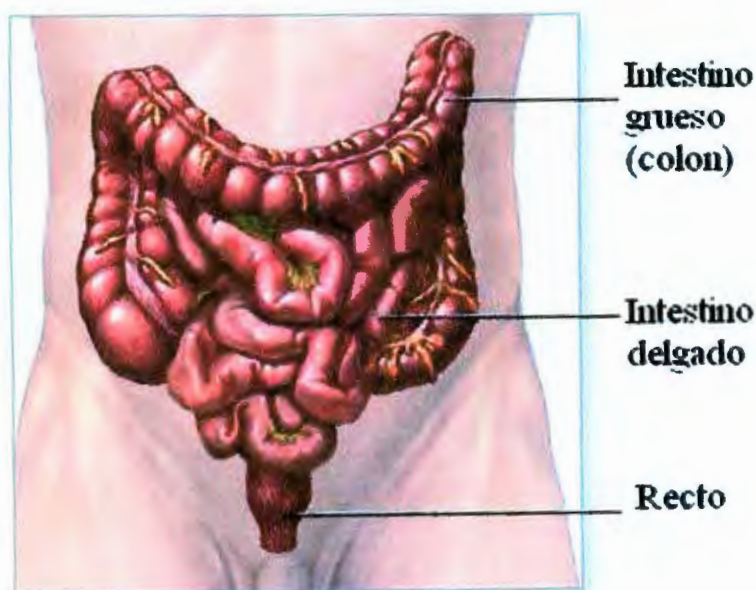


Figura 3. Anatomía del Colon. El colon se divide en tres secciones ascendente o derecho, transversa y descendente o izquierdo terminando en el recto (MedlinePlus, www.nlm.nih.gov/medlineplus).

La superficie del colon es lisa a simple vista llegándose a ver irregularidades en los cortes de perfil, debido a la contracción muscular. A un pequeño aumento se puede observar la abertura de las criptas o glándulas de Lieberkutin, que llevan la función de aumentar la superficie de absorción del intestino. En los cortes histológicos, éstas son glándulas tubulares rectas de unos 0.5 mm de longitud (Fawcett, 1995).

II.2.2 Fases del desarrollo del cáncer de colon.

El cáncer de colon se lleva a cabo como una serie de pasos complejos que involucran una alteración progresiva del control de la proliferación celular, la diferenciación y la muerte celular programada (apoptosis) en el epitelio intestinal. Estos cambios pueden estar dados por la dieta y los factores ambientales, modulando las vías de señalización del epitelio celular intestinal, tales como las mutaciones genéticas que transforman oncogenes, las delecciones o mutaciones de las enzimas que reparan ADN y genes supresores de tumores. El inicio del cáncer de colon, produce un número excesivo de células que se acumulan bajo la forma de pólipos. Los pólipos se transforman luego en tumores cancerígenos (Murray *et al.*, 1999).

Las diferentes etapas de la progresión del cáncer de colon comienzan con la etapa 0, en donde el proceso de proliferación descontrolada ocurre en las criptas. La etapa I se caracteriza porque la zona proliferativa se expande hacia la parte superior de la cripta colónica, sin un aumento neto del número de células, lo cual implica una pérdida del estado de diferenciación del epitelio. En la siguiente fase, llamada etapa II, la velocidad de proliferación excede la muerte celular y como resultado se tiene una acumulación de células epiteliales en la mucosa. En la fase III el tejido comienza a extenderse hacia el lumen y como resultado se forman los pólipos adenomatosos aún benignos. En la etapa IV se producen nuevas transformaciones: las células adquieren un carácter patológico y los pólipos se transforman en tumores cancerosos (Figura 4) (Lipkin, 1974).

II.2.3 Factores de riesgo de cáncer de colon.

En el desarrollo de esta patología la edad es un factor importante, tiene más probabilidades de aparecer después de los 60 años. El riesgo de desarrollar cáncer se duplica cada 5 años después de los 25 años de edad (Willett; 1995). El aumento del porcentaje de cáncer en la población es probable debido a la combinación de una creciente y prolongada exposición a carcinógenos, asociado a un sistema inmunológico debilitado. También existen factores dietéticos que predisponen a una mayor incidencia del cáncer de colon como son; alto contenido

en grasas, alto contenido de carbohidratos refinados y bajo contenido de fibra vegetal. Se ha demostrado que la reducción del contenido de fibra en la dieta disminuye el volumen de las heces, aumenta el tiempo de tránsito en el intestino y altera la flora natural de la luz intestinal, lo que provoca que los productos de degradación de los carbohidratos refinados permanezcan en contacto con la mucosa durante periodos prolongados (Willett; 1995). Fumar es otro factor de riesgo ya que el humo del cigarro produce sustancias químicas que pueden deteriorar el ADN y hacer que el cáncer tenga más posibilidades de originarse. Otro factor importante es el consumo de alcohol que puede acelerar el proceso en la promoción del tumor (Tanaka, 1995).



Figura 4. Fases del desarrollo del cáncer de colon. El cáncer de colon se forma a través de 4 etapas y se presenta con mayor frecuencia en personas mayores de 60 años (MedlinePlus, www.nlm.nih.gov/medlineplus).

II.3 Tratamientos contra el cáncer

Actualmente los tratamientos más utilizados contra el cáncer son la quimioterapia y la radioterapia. Los medicamentos quimioterapéuticos pueden destruir las

células cancerosas que han hecho metástasis o se han propagado a otras partes del cuerpo alejadas del tumor primario. Se utilizan más de 100 medicamentos quimioterapéuticos en varias combinaciones. Aún cuando puede utilizarse un solo medicamento para tratar el cáncer, por lo general los medicamentos son más eficaces si se utilizan en combinación con otros por vía oral o intravenosa (American Cancer Society, 2000). El tratamiento quimioterapéutico en el cáncer de colon se realiza como terapia adyuvante, es decir, sumada a la cirugía, la cual consiste en una resección segmentaria, en donde se extirpa el tumor y un segmento de tejido normal a cada lado del cáncer. Se suele extirpar un tercio del colon, y la cantidad de tejido variará en función del tamaño y la situación. Se presentan efectos secundarios adversos como la caída del cabello, náuseas y debilidad general (Tratamiento del cáncer de colon, 2006).

La radioterapia utiliza partículas u ondas de alta energía, tales como los *rayos X*, *rayos gamma*, electrones o protones, para eliminar o dañar las células cancerosas. Es uno de los tratamientos más comunes contra el cáncer en el que se utiliza un equipo especial que administra dosis altas de radiación a las células cancerosas, destruyéndolas o dañándolas de tal manera que no puedan crecer, multiplicarse o propagarse (American Cancer Society, 2007). El tratamiento con radioterapia contra el cáncer de colon, se desarrolla a lo largo de cinco días a la semana durante varias semanas (las que el oncólogo y el radiólogo hayan creído convenientes). El tratamiento es ambulatorio y los efectos secundarios inmediatos son: irritación de la piel, náuseas, diarrea, irritación rectal, irritación de la vejiga o cansancio (Tratamiento del cáncer de colon, 2006).

II.4 Lectinas

Debido a que la quimioterapia y la radioterapia son tratamientos invasivos, y a que en el proceso de destruir las células cancerosas dañan a las células normales y

deprimen el sistema inmune, se han buscado terapias alternativas como el uso de lectinas. Se ha confirmado la actividad antitumoral de las lectinas de plantas, tanto para el diagnóstico como para la terapia en la medicina moderna (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005). Las lectinas son un grupo de proteínas de origen no inmune, en su mayoría glicoproteínas, que están presentes en la mayoría de los seres vivos, tanto en el reino animal, vegetal y en microorganismos. Son capaces de un reconocimiento específico para un determinado carbohidrato uniéndose reversiblemente, sin alterar la estructura covalente de los ligandos glicosídicos reconocidos (Goldstein *et al*, 1980).

II.4.1 Descripción e Historia.

El primer estudio sobre lectinas lo reportó Stillmark en 1888, al observar el fenómeno de hemaglutinación con extractos de semilla de *Ricinus communis*, cuya proteína llamada ricina aglutina a eritrocitos. Posteriormente Hellín (1895), estudiando semillas de *Abrus precatorius*, encontró otra proteína que también producía aglutinación de eritrocitos llamada abrina. Fue hasta el año de 1919 que se obtuvo la primera lectina en forma cristalina, descubierta por James B. Summer a partir del frijol *Canavalia ensiformes* llamada concanavalina A (Hernández *et al.*, 1999). En la década de los 40, dos investigadores, Rose M. Reguera y William C. Boyd (1954) reportaron que ciertas semillas contenían aglutininas específicas para antígenos de los grupos sanguíneos humanos. El primero en plantear el término lectina fue Boyd en 1954, al observar que algunas aglutininas obtenidas de semillas de plantas podían reconocer a un grupo sanguíneo específico y aglutinarlo (Van Damme *et al.*, 1998).

Las lectinas han sido estudiadas ampliamente, su importancia principal radica en sus propiedades biológicas tales como la aglutinación de eritrocitos y otras células, en la inducción de mitosis y efectos citotóxicos sobre linfocitos y aglutinación de virus. Además tienen diversos usos como (Zarkovic *et al.*, 1998):

- a. Estudios químicos de estructuras de sustratos de la superficie celular de grupos sanguíneos y en la tipificación de los mismos.

-
-
- b. Para probar azúcares en la superficie celular y en otros procesos de reconocimiento mediados por interacciones específicas de carbohidratos con receptores.
 - c. Para determinar la patogenicidad de los microorganismos en sus relaciones de adhesión a la célula.

II.4.2 Clasificación.

Las lectinas están compuestas por una cadena polipeptídica en la cual pueden estar unidos uno o más residuos de carbohidratos, normalmente de 2 a 15 monosacáridos residuales. Éstos son principalmente D-Manosa, D-galactosa, D-Glucosa, L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido salicílico, glucosamina y galactosamina (Peumans y Van Damme, 2002).

Con base en su estructura, las lectinas se pueden clasificar en: a) simples, b) mosaico y c) macromoléculas. Cada clase se puede subdividir en diferentes familias con secuencias y propiedades estructurales similares. Las lectinas simples comprenden prácticamente todas las lectinas de las plantas conocidas. En las del grupo de forma de mosaico hay una diversidad de proteínas de diferentes orígenes, por un lado las lectinas de origen animal y las denominadas de tipo I. Las lectinas del grupo de macromoléculas están formada por las de bacterias, especialmente en la forma de fimbrias o pilis (organelos filamentosos de superficie) (Lis y Sharon, 1998).

Las lectinas se encuentran en gran diversidad de seres vivos y de acuerdo a esto existen diferentes tipos (Ganem y Martín, 2000):

a) Lectinas vegetales; se encuentran específicamente en los cotiledones y endospermos de las semillas de algunos vegetales como el trigo, frijol y soya. Entre las más conocidas se encuentran:

- La Concanavalina A, se obtiene de la planta *Cannavalia enzyformis* y actúa específicamente uniéndose a restos de α -D-glucosa y α -D-manosa.

-
- La aglutinina de germen de trigo, también llamada fitohemaglutinina, cuyo sitio de unión es con el ácido β -N-acetilneuramínico y con el ácido α -N-acetilneuramínico.
 - Del frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*) se obtiene una lectina muy importante con acción mitogénica (estimuladoras del ciclo celular). Tiene la capacidad de aglutinar específicamente células malignas, lo cual ha desarrollado un gran interés en investigación para utilizarlas como tratamiento para el control de crecimiento de tumores.

Las lectinas de leguminosas son el único grupo de lectinas que contienen cationes divalentes con un sitio específico para ligar el metal. Cada subunidad contiene iones calcio o magnesio, los cuales son esenciales para la unión de carbohidratos. Básicamente, los promotores de las lectinas de leguminosas, consisten de una o dos cadenas. Están constituidas de una hoja β de 7 curvas (parte frontal) y una hoja β plana de seis (parte trasera), interconectadas por vueltas y lazos para formar una estructura tridimensional. La orientación de las líneas antiparalelas de las hojas β le proporciona una estructura rígida y fuerte que puede explicar la extrema resistencia de las lectinas de leguminosas al ataque proteolítico enzimático (Lis y Sharon, 1998). En la Figura 5 se muestra el esquema de la concanavalina A.

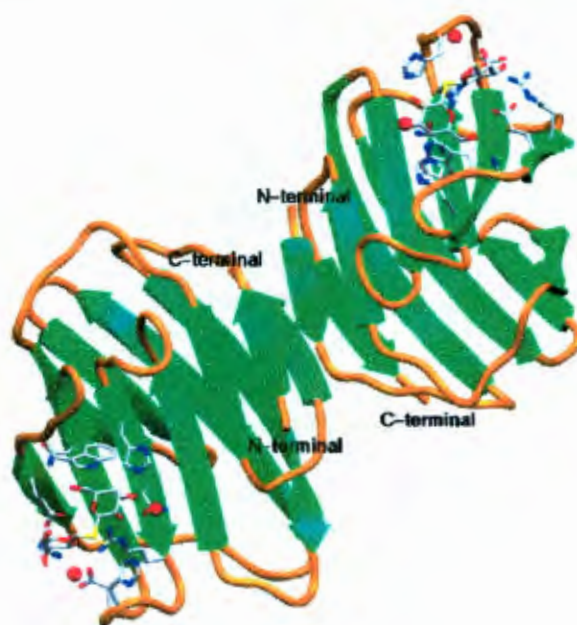


Figura 5. Estructura tridimensional de la Concanavalina A. La Concanavalina A es una lectina obtenida de *Cannavalia enzyformis*, se presenta como un dímero con dos regiones opuestas para el sitio de unión a carbohidratos. (http://www.juliet.med.jhmi.edu/~bianchet/lectin_dimer.jpg).

b) Lectinas animales; se han encontrado en invertebrados como: caracoles, cangrejos, camarones, moluscos, peces y lombrices, y están contenidas en la hemolinfa y órganos sexuales. También se han encontrado en vertebrados como el cerdo. Las más conocidas son las galectinas que tienen función en la adhesión celular. Estas se encuentran dentro del citoplasma y en el núcleo de las células y ocasionalmente en la superficie y fuera de la célula. Son esenciales para el desarrollo normal y la diferenciación de todas las células del animal (Riaño-Sánchez, 1997).

c) Lectinas microbianas; las más importantes son las adhesinas, que se localizan en la superficie de microorganismos tales como bacterias, virus, hongos y parásitos. Juegan un papel importante en el mecanismo de acción patológico al colonizar mucosas produciendo lesiones titulares. Existe otro tipo de lectinas microbianas, las proteínas Gac-p, que se unen específicamente con los sialoglicoconjugados de *Bordetella*, y otros microorganismos. Estas proteínas Gac-p tienen la capacidad de ligarse a glicosaminoglicanos sulfatados (heparan

sulfatos) presentes en la superficie de células eucariotas facilitando la adherencia del agente patógeno a dichas células (Lis y Sharon, 1998).

d) Lectinas de virus; capaces de crear puentes entre eritrocitos de varias especies. Las hemaglutininas virales, pueden ser divididas en tres grandes grupos (Liener, 1997):

- Las de Ortomixos (Influenza A, B y C) y Paramixovirus (PIV, VRS) en la cual la partícula viral y la hemaglutinina no pueden ser separadas porque tiene actividad enzimática que causa destrucción de receptores de glóbulos rojos, (enzima destructora de los receptores) que ahora se sabe corresponde a una sialidasa.
- La de los Reovirus (Rotavirus y similares) y Arbovirus (fiebre amarilla, dengue, equinas y similares), en los cuales la partícula viral sólo contiene la hemaglutinina pero no contiene la sialidasa.
- La de los Poxvirus (viruela y otros virus similares) en los cuales la hemaglutinina se produce durante la replicación del virus y es diferenciable de la partícula viral. La hemaglutinación es inhibida específicamente por anticuerpos que se conocen como inhibidores de hemaglutinación (HI), que permiten distinguir diferentes virus como los de influenza, se sabe que es específica de cepa y se puede utilizar con fines de clasificación.

II.4.3 Toxicidad de las lectinas.

Las lectinas dietéticas se han considerado como factores antinutricios. Estos efectos son causados por el hecho de que algunas lectinas deterioran la integridad del epitelio intestinal y también afectan la absorción y la utilización de alimentos (González de Mejía y Prisecaru, 2005). La toxicidad de las lectinas se caracteriza por la capacidad de inactivar los ribosomas y se clasifican como proteínas RIP II. Dentro de las lesiones patológicas que se describen con la ingestión o administración de lectinas en animales o humanos, se observa la presencia de parenquimatositis, degeneración grasa y edema en varios tejidos. También se observa que las lectinas se unen a los grupos glicosilados de las membranas de

las células epiteliales del tracto digestivo, impidiendo así la absorción de nutrientes (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).

Las lectinas son resistentes a la digestión, se han reportado estudios en donde estas proteínas son recuperadas con sus propiedades sin alterar después de pasar por el tracto digestivo de ratones en un periodo de 24 horas (Nakata y Kimura, 1985). Aunque las lectinas son termolábiles, no siempre son destruidas durante la cocción, debido a que los métodos de cocción no son tan agresivos y los tiempos en los que se someten se mantienen cantidades considerables de las mismas. El uso del autoclave o agua hirviendo es necesaria para causar la desnaturalización de las lectinas, para que la actividad de la hemaglutinación sea eliminada se necesitan 5 min a 92° C (González de Mejía y Prisecaru, 2005).

II.4.4 Efectos biológicos de las lectinas.

La propiedad que tienen las lectinas de enlazarse a los carbohidratos sugiere que cumplen con una función fisiológica en la naturaleza. Entre las funciones fisiológicas atribuidas a las lectinas en leguminosas se encuentra el reconocimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno en la superficie de las raíces antes de la nodulación (Janzen *et al.*, 1976). Chrispeels y Raikhel (1991) sugieren que la función más importante de las lectinas es la defensa de la planta contra sus depredadores. La interacción de las lectinas presentes en las vacuolas con otras sustancias dentro y fuera de las células se debe a que, cuando las semillas secas absorben agua, las proteínas presentes en las vacuolas, especialmente las lectinas, son liberadas y forman una solución con el agua adsorbida. Esto trae como consecuencia la presencia de las lectinas en las cercanías de la semilla en germinación, donde pueden interaccionar con los patógenos y las plagas. Por otra parte, cuando la semilla u otros órganos de la planta son consumidos por los fitófagos, las lectinas pueden salir de las estructuras celulares dañadas y entrar en contacto con las glicoproteínas que se encuentran en el tracto intestinal de los fitófagos inhibiendo la absorción de nutrientes (Chrispeels y Raikhel, 1991).

El estudio de las lectinas ha llevado a la conclusión de que su importancia principal radica en sus propiedades biológicas, en la aglutinación de eritrocitos, linfocitos, plaquetas, espermatozoides, bacterias, células tumorales y virus (Riaño-Sánchez, 1997; Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005). La lectina que se encuentra en el frijol común *Phaseolus vulgaris* tiene acción mitogénica en células del sistema inmune y además tiene la capacidad de aglutinar específicamente células malignas. Lo anterior ha desarrollado un gran interés en investigación para utilizarlas como tratamiento para el control de crecimiento de tumores (Riaño-Sánchez, 1997). Los estudios de lectinas se han enfocado a su capacidad de selectividad en donde muestran aglutinación preferencial sobre células cancerígenas (Hernández, 2005).

Las lectinas se utilizan como herramientas en los campos de la bioquímica, biología celular e inmunología, así como para el diagnóstico y propósitos terapéuticos en la investigación de cáncer (González de Mejía y Prisecaru, 2005). Un área importante en donde se emplean las lectinas es la detección de transformaciones malignas en células, a través de la aglutinación preferencial que muestran las lectinas con células transformadas. Este proceso de selectividad está dado por una alteración en la superficie de las células cancerosas la cual genera un aumento en los patrones de glicosilación. Debido a esto, las lectinas tienen una alta afinidad para reconocer y unirse reversiblemente a residuos glicosídicos y aglutinarlos (Nishimura *et al*, 2004; Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005). Se ha observado que, lectinas de diferentes fuentes inhiben el crecimiento de células cancerosas en función de la concentración y de manera diferencial. Son capaces de inducir apoptosis y activar el sistema inmune mediante la estimulación de la proliferación de linfocitos T (Lyu *et al.*, 2002). Se han utilizado las lectinas y polímeros sintéticos enlazados a ellas como agentes anticancerígenos *in vivo* e *in vitro*, ya que se ha visto que disminuyen el crecimiento de las células tumorales. Se utilizan también para la inmunización contra virus productores de inmunodeficiencia y algunos tumores y como medicamentos para prevenir metástasis. Se han estudiado las propiedades citotóxicas de algunas lectinas como la ricina y abrina como potenciales armas terapéuticas en el tratamiento del

cáncer humano (Hernández *et al.*, 1999). Por otro lado las lectinas son una herramienta importante para la investigación estructural y funcional de carbohidratos complejos, para la evaluación de cambios que ocurren en la superficie celular durante los procesos fisiológicos y patológicos y para la identificación de células cancerosas (Van Damme *et al.*, 1998).

La presencia de lectinas se ha identificado como el principal activo en extractos de muérdago *Viscum album* (VCA), que es ampliamente utilizado como tratamiento complementario contra el cáncer en Europa. Se investigó la proliferación celular de 16 líneas celulares con extractos acuosos del muérdago, reportándose que en los extractos con altas cantidades de lectina (VCA) se mostró actividad antitumoral en líneas celulares de cáncer de mama (Maier y Fiebig, 2002). En el 2001 se publicaron estudios de VCA en células de leucemia promieloide aguda HL-60 demostrando que la viabilidad es dosis-dependiente y su CI_{50} fue de 5 ng/mL, el VCA indujo la muerte celular a través de apoptosis. Las actividades anticancerígenas y antimetastásicas del VCA fueron investigadas utilizando la línea celular de melanoma B16-BL6, y se demostró que el VCA causa una reducción del crecimiento celular dosis-dependiente (CI_{50} de 25 ng/mL) e induce apoptosis (Lyu *et al.*, 2001). En el 2002 se demostró que el VCA indujo apoptosis en células de hepatocarcinoma humano SK-Hep-1 y Hep3B. Esta inducción fue a través de la activación de Bax (acelerador de la apoptosis) y la inhibición de Bcl-2 (supresor de apoptosis) (Lyu *et al.*, 2002). En el estudio de cáncer de colon humano se han analizado cinco diferentes lectinas: PHA (*Phaseolus vulgaris*), GSA (*Griffonia simplicifolia*), Con-A (Concavalina A), WGA (*Triticum vulgare*) y PNA (*Arachis hypogea*), sobre tres líneas de cáncer colorectal (LoVo, HCT-15 y SW837), en donde el crecimiento se ve afectado de manera diferente dependiendo de la concentración y el tipo de lectina, concluyendo que éstas lectinas tienen un potencial para afectar el crecimiento de las colonias cancerígenas *in vitro* (Kiss *et al.*, 1997).

Estudios realizados en nuestro laboratorio han mostrado que una fracción concentrada de lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) es capaz de afectar

negativamente la sobrevivencia de células cancerígenas de forma diferencial respecto a su contraparte normal (Hernández, 2005). También fue posible observar el efecto sobre la proliferación y sobrevivencia de células de cáncer de cuello uterino y de cáncer de mama, en función de la concentración y de forma diferencial respecto al tipo celular (Yllescas, 2006, Castañeda, 2007).

III. JUSTIFICACIÓN.

El cáncer de colon se encuentra dentro de las principales causas de muerte a nivel mundial y en México se reporta como la séptima causa de muerte por cáncer. Esta enfermedad avanza rápidamente tanto en hombres como en mujeres, debido a la combinación y prolongada exposición a carcinógenos, así como un ritmo de vida muy estresante en donde no se presta atención al cuidado de la dieta, lo que lleva a factores que predisponen al aumento de ésta enfermedad. Dentro de las terapias eficaces para combatir el cáncer se encuentran la quimioterapia y la radioterapia, pero son muy agresivas e inespecíficas dañando así las células sanas. En estudios recientes en nuestro laboratorio se ha comprobado el efecto citotóxico de una fracción semipura de lectinas de frijol tépari sobre células cancerígenas humanas de cuello uterino y mama.

El colon es una de las principales vías de absorción de nutrientes y es posible un contacto directo de las lectinas con el epitelio. Se desconoce la capacidad de la lectina de frijol tépari para provocar la muerte de células cancerígenas en este tejido, por lo que en el siguiente trabajo se determinó el efecto de la lectina de frijol tépari sobre la sobrevivencia y proliferación de células de cáncer de colon (CaCo 2) y la capacidad de distinguir a células normales del mismo epitelio (IEC-18). Lo anterior permitirá determinar el potencial citotóxico de la lectina de frijol tépari sobre el cáncer de colon y encontrar evidencia que apunte a su potencial como agente terapéutico.

IV. HIPÓTESIS.

Si la lectina de frijol tépari reconoce de forma selectiva a células normales y cancerígenas y a células de diferentes tipos de cáncer, entonces podrá afectar de una manera diferencial la sobrevivencia y proliferación de las células cancerígenas de colon respecto a su contraparte normal.

V. OBJETIVO GENERAL.

- Evaluar el efecto de la lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre la proliferación y sobrevivencia de células cancerígenas de colon humano.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Obtener una fracción proteínica concentrada de la lectina de frijol tépari
- Cuantificar la actividad específica de la lectina en la fracción obtenida.
- Evaluar el efecto de la lectina semipura sobre la proliferación de células cancerígenas de colon humano y su contraparte normal.
- Evaluar el efecto de la lectina semipura sobre la sobrevivencia de células cancerígenas de colon humano y su contraparte normal.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1 MATERIALES.

VII.1.1 MATERIAL VEGETAL.

La purificación de la lectina se realizó en el CINVESTAV Irapuato, en el Laboratorio de Mecanismos de Defensa de Plantas a cargo del Dr. Alejandro Blanco Labra a partir de semillas limpias de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) de la línea PI-170.

VII.1.2 LÍNEAS CELULARES.

Línea celular CaCo-2, del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, a cargo de la Dra. Teresa García Gasca.

- Organismo: *Homo sapiens* (Humano).
- Género: Masculino, caucásico de 72 años de edad.
- Órgano: colon.
- Enfermedad: Adenocarcinoma colorectal.
- Tiempo de duplicación: 62 horas.

La línea celular CaCo-2 en cultivo forma monocapas y se adhiere mediante uniones fuertes que se forman en el lado baso-lateral de la monocapa. Estas células se diferencian espontáneamente después de alcanzar la confluencia y adquieren propiedades bioquímicas y estructurales de enterocitos pequeños (Pageot *et al.*, 2000; American Type of Culture Collection, 2005).

Línea celular IEC-18, donada por la Dra. Martha Robles, UNAM.

- Organismo: *Rattus norvegicus* (Rata).
- Órgano: íleon.
- Tipo de célula: Epitelial normal.

La línea IEC-18 es un modelo útil de epitelio intestinal de una línea celular inmortal, no transformada, derivada de íleon de rata joven. Uno de los aspectos más importantes de ésta línea celular es la capacidad de mantener su fenotipo de criptas intestinales, así como el potencial de lograr la diferenciación a enterocitos. Así mismo la línea IEC-18 es considerada adecuada para correlacionarla con la fisiología de enterocitos de células derivadas de tumores colónicos como las CaCo-2, que presentan similitud en morfología y crecimiento (Gordon *et al.*, 2005; American Type of Culture Collection, 2005).

VII.1.3 REACTIVOS.

El sulfato de amonio es de J-T. Baker . Los reactivos para electroforesis se adquirieron en Bio- Rad (Hércules, Ca, EUA). Las matrices para cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico se adquirieron de Pharmacia (Pharmacia Biotech; Uppsala, Suiza). El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO, 12100-038.), alto en glucosa, y los suplementos de cultivo se obtuvieron de GIBCO BRL (Grand Island, NY, EUA), los sueros de HyClone (Logan UT, EUA). Las cajas de cultivo y las placas de 24 pozos de Corning (Corning Costar; Corning, NY, EUA). Las células se mantuvieron en nitrógeno líquido a -190° C hasta su uso, una vez descongeladas se sembraron en cajas de cultivo de 60 mm a 37° C en atmósfera húmeda al 10% CO₂.

VII.2 MÉTODOS.

VII.2.1 PURIFICACIÓN DE LA LECTINA.

VII.2.1.1 PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO.

Las semillas se molieron en un molino Tekmar A-10, se pesaron 100 g de la harina obtenida y se obtuvo el extracto crudo de proteína en 500 mL de agua desionizada agitando durante 12 hrs a 4° C, después se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min. Se llevó a cabo una precipitación con 40% de saturación de sulfato de amonio sólido con agitación magnética lenta (Murray, 1990). Esta suspensión se

dejó equilibrar por 30 min a 4°C y después de centrifugar se descartó el precipitado obtenido. El sobrenadante fue llevado a 65% de saturación con sulfato de amonio; en este caso después de centrifugar se recuperó el precipitado (P-65) y se descartó el sobrenadante. La fracción P-65 finalmente fue redisuelta en un volumen mínimo de agua desionizada, dializada hasta la eliminación total de sales presentes.

VII.2.1.2 CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL.

Del dializado se obtuvo una cantidad de 8 mL que se llevaron a un concentrador de muestra Amicon por medio de gas helio a presión, en donde se obtuvieron 4 mL. La fracción P-65 concentrada se cargó en una columna de 167 x 1.7 cm para filtración en gel con Sephadex G-75 (Pharmacia Biotech; Uppsala, Suiza), la cual fue equilibrada con buffer de bicarbonato de amonio 0.02 M (pH 7.8). El experimento se realizó a 4° C y las fracciones fueron recolectadas a una velocidad de 0.3 mL/min, eludías con la misma solución amortiguadora. El volumen colectado en cada fracción fue de 5 mL y se determinó la concentración de proteína a 220 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-65. Las fracciones que indicaban presencia de proteínas se sometieron a un análisis de actividad aglutinante para coleccionar sólo las fracciones con actividad de lectina.

VII.2.1.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD AGLUTINANTE.

Para determinar la actividad aglutinante se utilizaron placas de ELISA de 96 pozos, en donde se colocaran 50 µL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) en cada pozo de la placa. En los primeros pozos de cada línea (1A, 2A, 3A,..., 8A) se agregaron, por duplicado, 50 µL de la fracción a probar en una concentración de 1 mg/mL de proteína. A partir de los pozos iniciales se realizaron diluciones dobles seriadas en los pozos siguientes (1A, 1B, 1C,...,1L). Se incluyó un control positivo utilizando Concanavalina A (1 mg/mL) y un control negativo con PBS. Finalmente, a cada pozo se le agregaron 50 µL de suspensión de eritrocitos de conejo al 2% previamente fijados con glutaraldehído (Turner y Liener, 1975) y se incubó a 37° C durante 3 hrs. La placa se leyó en un microscopio invertido y la

actividad aglutinante se determinó utilizando una escala arbitraria y apreciativa: alta actividad (+++), media (++), baja (+) y nula (-). La actividad específica se cuantificó mediante la ecuación:

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

Donde AE es la actividad específica aglutinante expresada en unidades por mg de proteína (U/mg), n es la última dilución con aglutinación apreciable al microscopio y mg es la cantidad de proteína inicial cuantificada por el método de Bradford (1976).

VII.2.1.4 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IONICO

Se seleccionaron las fracciones que presentaron mayor actividad y se juntaron en una sola para ingresarla a una cromatografía de intercambio iónico. Para ésta técnica se empleó un equipo colector de fracciones ECONO SYSTEM de Biorad con una resina de Q Sepharosa Hight Q. 5 x 1 cm (Pharmacia Biotech; Uppsala, Suiza). La proteína retenida por la resina fue eluída con un gradiente de NaCl de 0 a 0.4 M de Tris pH 8 que inició a partir del minuto 140 en un tiempo total de corrida de 170 min a velocidad de 1 mL/min en fracciones de 2 mL.

VII.2.1.5 PERFIL ELECTROFORÉTICO.

El perfil electroforético de la fracción se obtuvo mediante electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), en geles de 0.75mm al 10% de poliacrilamida. Para correr el sistema se utilizó la cámara de electroforesis Mini-Protean III de Biorad, se utilizaron marcadores de bajo peso molecular y el gel se tiñó con azul de Coomassie durante 4 horas (Laemmli, 1979).

VII.2.2 CULTIVO CELULAR.

VII.2.2.1 EFECTO DE LA FRACCIÓN DE LECTINA SEMIPURA SOBRE LA SOBREVIVENCIA Y PROLIFERACIÓN CELULAR.

Las células CaCo-2 se sembraron (3×10^4 células por pozo) en placas de 24 pozos con DMEM y suero fetal bovino (SFB) al 10%, 0.57 g. de HEPES/100mL (Promega, H5302) y 100 mL de piruvato de sodio 1mM (GIBCO, 11360). Las células IEC-18 se sembraron a la misma densidad en placas de 24 pozos con DMEM y SFB al 5%, 100 mL de L-glutamina/ 1 mM (GIBCO, 25030), 100 mL de piruvato de sodio 1 mM y 100 mL de insulina 1 mM (GIBCO, 12585). Después de 48 h, el medio de cultivo se cambió por DMEM adicionado con 0.5% de albúmina sérica de bovino (ASB, Serologicals 810664) y diferentes concentraciones de la fracción semipura de lectina. Las tasas de proliferación mínima y máxima se calcularon mediante la comparación con dos tratamientos control: DMEM adicionado con 0.5% de ASB y DMEM al 10% SFB, respectivamente. Después de 24 ó 72 horas el número celular se determinó cosechando las células con tripsina al 0.15% y contándolas con un hemocitómetro (García-Gasca *et al.*, 2002).

El número de células se determinó con base en los siguientes cálculos:

$$\frac{\text{Número de células total}}{\text{Pozo}} = \frac{N (1 \times 10^4) (V)}{C}$$

En donde:

N Es el número de células contadas

C Número de campos contados en el hemocitómetro

1×10^4 Factor de volumen del hemocitómetro

V Volumen en mL de la suspensión celular

El índice de proliferación se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%P = \frac{\text{Número de células en el tratamiento}}{\text{Número de células del control en 0.5\% ASB}} \times 100$$

El índice de sobrevivencia se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%S = \frac{\text{Número de células en el tratamiento}}{\text{Número de células del control inicial}} \times 100$$

El índice de proliferación se calculó respecto a las células mantenidas con ASB al 0.5% y el índice de sobrevivencia respecto a las células contadas al inicio del experimento (control inicial al cambio de condiciones). Se determinaron las concentraciones inhibitoria media (CI₅₀) y letal media (CL₅₀) en cada caso. Todos los experimentos se realizaron por duplicado en por lo menos dos experimentos independientes (García-Gasca *et al.*, 2002).

VII.2.2.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para calcular las CI₅₀ y CL₅₀ se realizaron regresiones lineares del porcentaje de proliferación o sobrevivencia contra el logaritmo de la concentración, respectivamente. Las ecuaciones se obtuvieron utilizando el programa JMP versión 5.0. Para determinar las diferencias entre tratamientos para cada línea celular, se realizaron ANOVA para la comparación de medias entre tratamientos (Tuckey ($p \leq 0.05$)) o para cada tratamiento respecto a su control (Dunnett ($p \leq 0.05$)) utilizando los programas Statgraphics versión 5.1 y SPSS versión 12.0

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.1 PURIFICACIÓN DE LA LECTINA.

De la fracción de exclusión molecular G-75 (actividad específica de 5020 UA/mg de proteína) se recuperaron las fracciones que presentaron actividad aglutinante y se recolectaron en una sola fracción que se ingresó a la cromatografía de intercambio iónico. Mediante este tipo de cromatografía se logró una adecuada separación de las fracciones que presentaron actividad aglutinante del resto de las proteínas, leídas a 220 nm (Figura 6). Después de ser sometidas a intercambio iónico se obtuvieron tres muestras A, B y C, cada una con diferente tiempo de corrida y velocidad de gradiente. Las tres muestras presentaron la misma actividad específica de lectina (1170 UA/mg de proteína) pero los contenidos de proteína fueron de 833 µg/mL, 788 µg/ y 176 µg/mL para las muestras A, B y C, respectivamente. Lo anterior sugiere que el procedimiento llevado a cabo para obtener la muestra C (iniciando el gradiente a los 140 min y colectando fracciones de 2 mL a velocidad de 1 mL/min.) permitió obtener la lectina parcialmente pura, ya que con 4.7 veces menor concentración de proteína se mantiene la actividad específica de las muestras anteriores. Se observa pérdida de actividad aglutinante de la fracción concentrada de lectina utilizada ya que al salir de la cromatografía de exclusión molecular se tenía 4.3 veces más actividad específica que al salir de la cromatografía de intercambio iónico. Este mismo resultado lo obtuvo Hernández (2005), lo cual sugiere que el proceso de intercambio iónico disminuye la forma activa de la lectina, posiblemente secuestrando metales ya que las lectinas de leguminosas requieren metales divalentes en su estructura (Lis y Sharon, 1998).

Para visualizar la pureza de la muestra final se corrió un gel de poliacrilamida comparando las tres muestras, en donde se puede apreciar la pureza de la muestra C (Figura 7). La muestra C presenta una banda definida con un peso molecular aparente de 34 kDa en base a los marcadores de bajo peso molecular, lo cual coincide con los datos obtenidos por González de Mejía *et al* (1990).

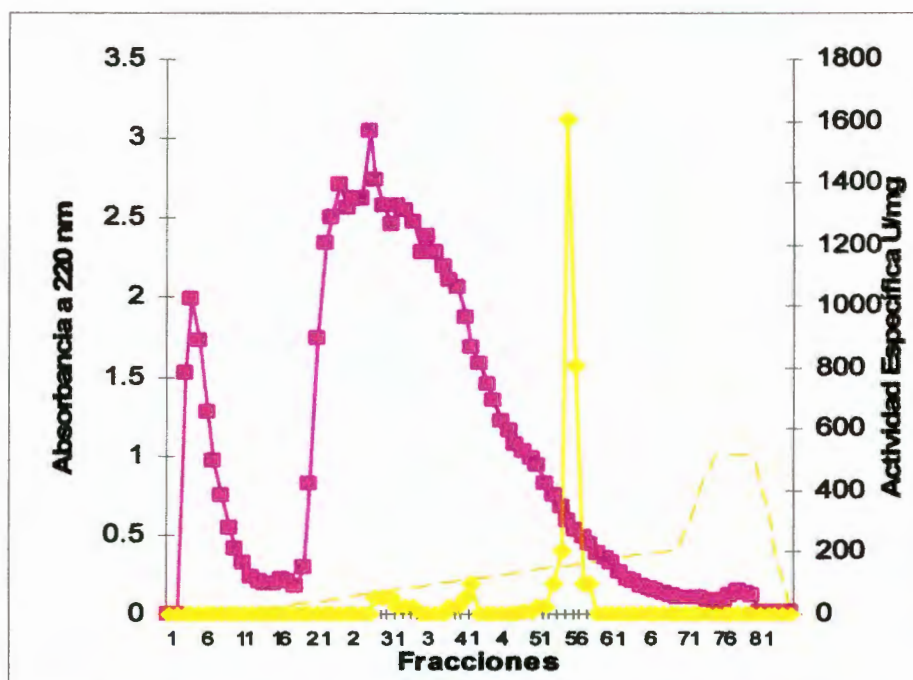


Figura 6. Cromatografía de Intercambio Iónico. Las fracciones con actividad aglutinante, obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular, se sometieron a cromatografía de intercambio iónico. Se aplicó un gradiente de NaCl de 0 a 0.4 M de Tris pH 8 iniciando al minuto 140 (marcado en línea punteada) en un tiempo total de corrida de 170 min. La actividad específica resultante fue de 1170 UA/mL. El perfil de proteína se leyó a 220 nm (■) y se determinó la actividad aglutinante de las fracciones (◆).

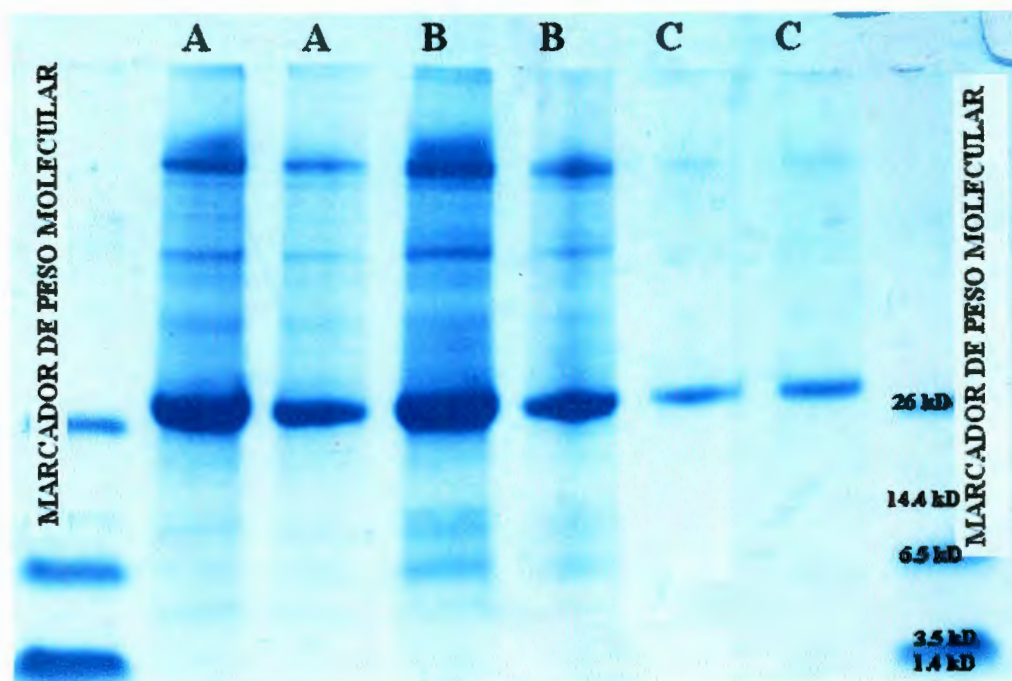


Figura 7. Perfil electroforético. Se realizó una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), en geles de 0.75mm al 10% de poliacrilamida. En el primer y último carril se muestran los marcadores de peso molecular, en los carriles A, B y C se muestran tres muestras de fracción concentrada en lectina con diferente grado de pureza.

VIII.2 EFECTO DE LA FRACCIÓN SEMIPURA DE LECTINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y SOBREVIVENCIA DE CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON Y SU CONTRAPARTE NORMAL.

Se realizaron curvas dosis-respuesta del efecto de la fracción de lectina sobre el crecimiento de las líneas celulares de cáncer de colon CaCo-2 y su contraparte normal IEC-18. Las células fueron sembradas a razón de 3×10^4 células por pozo, en placas de 24 pozos en DMEM 10% Suero Fetal Bovino (SFB), a las 24 horas se les retiró el medio y fueron tratadas durante 24 y 72 horas en el caso de la línea CaCo-2, y 24 horas para la línea IEC-18, utilizando diferentes concentraciones de lectina partiendo de 0.0128 UA/mL hasta 100 UA/mL.

El efecto de la fracción concentrada de lectina de frijol tépari sobre las células CaCo-2 a 24 horas de tratamiento se muestra en la Figura 8. La curva dosis respuesta (Figura 8A) muestra que la fracción de lectina presentó un efecto citotóxico en función de la concentración. Ninguna concentración estudiada mostró un efecto estimulador sobre el crecimiento de las células. El tratamiento con ASB y con 0.0128 UA/mL resultaron citostáticos. Al calcular la proliferación celular (respecto al control tratado con 0.5% de ASB) (Figura 8B) se observó que las concentraciones 1.28, 12.8 y 100 UA/mL presentaron efecto negativo sobre la proliferación celular en un 40, 70 y 85%, respectivamente respecto al control (Tukey, Dunnett, $p \leq 0.05$). También se observó diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) es decir, de las tres concentraciones inhibitorias de la proiferación hay diferencia entre la más alta (1.28 UA/mL) y la más baja probadas (100 UA/mL). La concentración inhibitoria media (CI_{50}) para 24 horas de tratamiento fue de 0.563 μ g de proteína/mL (correspondiente a 0.66 UA/mL). Respecto a la sobrevivencia celular (Figura 8C), las concentraciones más altas estudiadas (1.28, 12.8 y 100 UA/mL) resultaron citotóxicas ya que provocaron aproximadamente el 47, 72 y 86% de muerte celular, respectivamente y presentaron diferencia estadística (Tukey, Dunnett, $p \leq 0.05$) respecto al control inicial (Co, control al cambio de condiciones). Las concentraciones de 0.0128 y 0.128 UA/mL no presentaron diferencia estadística respecto al control.

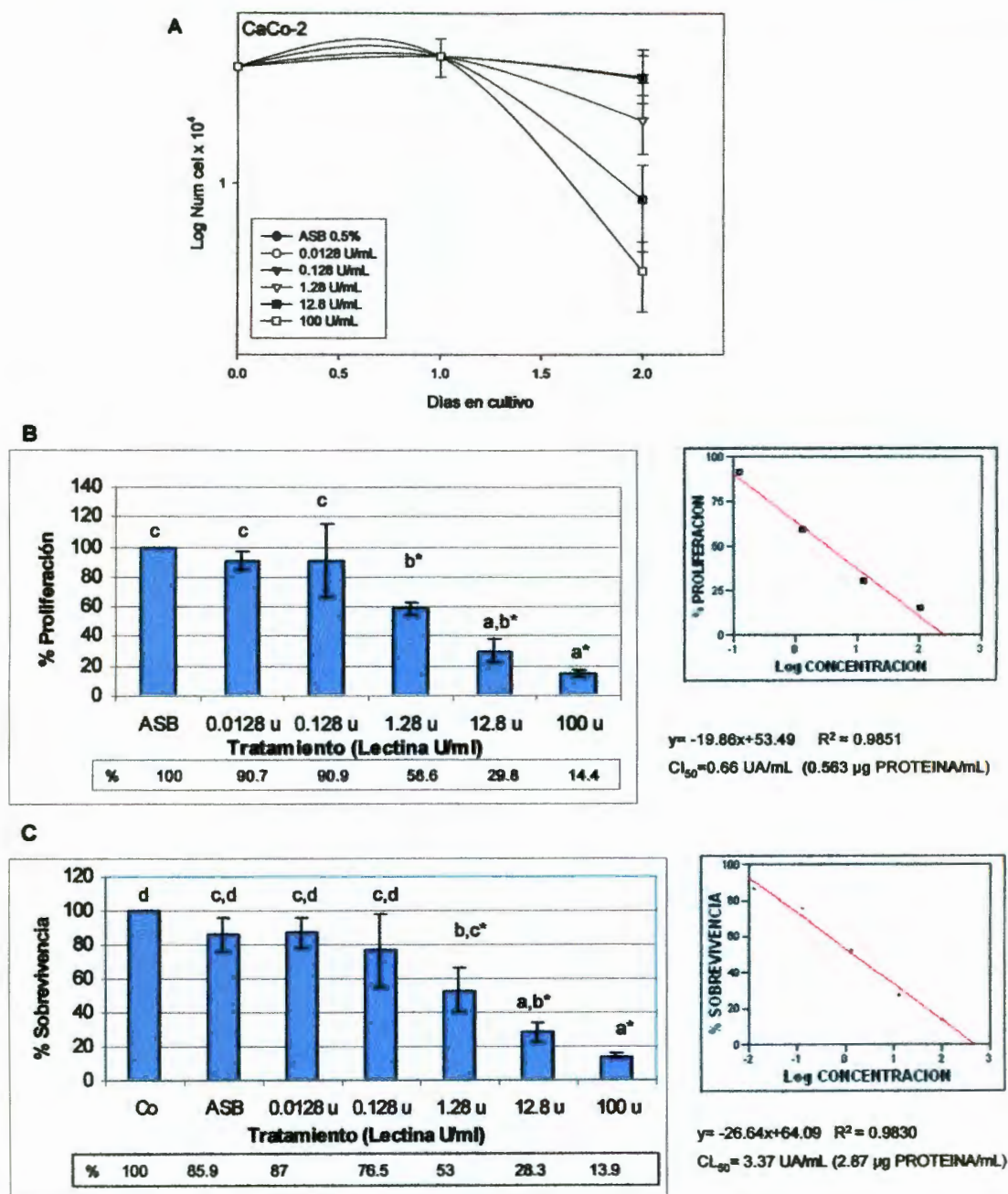


Figura 8. Efecto de la fracción concentrada en lectina de frijol tépari sobre la proliferación y sobrevivencia de células CaCo-2 a 24 horas de tratamiento. Se sembraron 3×10^4 células/pozo en placas de 24 pozos y a las 24 horas se cambiaron condiciones agregando diferentes concentraciones de la fracción concentrada de lectina. Después de 24 horas las células fueron contadas con ayuda de un hemocitómetro. El porcentaje de proliferación (B) y de sobrevivencia (C) se obtuvo a partir de los resultados de la curva dosis-respuesta (A). Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y el control (Dunnett, $p \leq 0.05$). La CL_{50} y la CL_{50} se calcularon mediante regresión lineal simple. Se muestra el promedio de al menos dos experimentos independientes.

La concentración letal media (CL_{50}) a 24 horas de tratamiento fue de 2.87 μ g de proteína/mL (3.37 UA/mL), lo cual indica que se requiere una concentración 5 veces mayor de la inhibitoria para provocar la muerte celular.

Con la finalidad de observar el efecto a mayor tiempo, se repitió el experimento anterior cambiando el tiempo de exposición (Figura 9). A las 72 horas de tratamiento, la curva dosis-respuesta para las células CaCo-2 muestra efecto citotóxico en función de la concentración (Figura 9A). Las concentraciones más altas probadas (1.28, 12.8 y 100 UA/mL), resultaron citotóxicas, 0.128 UA/mL fue citostática y la concentración más baja probada (0.0128 UA/mL) así como las células mantenidas con 0.5% ASB tuvieron un ligero efecto estimulador. La proliferación celular disminuyó en todo los casos (Tukey, Dunnett, $p \leq 0.05$) en un 30, 50, 67, 86 y 97% con las concentraciones de 0.0128, 0.128, 1.28, 12.8 y 100 UA/mL, respectivamente (Figura 9B). La CI_{50} fue de 0.119 μ g de proteína/mL (0.14 UA/mL) bajo estas condiciones, lo anterior corresponde aproximadamente al 20% de la CI_{50} a las 24 horas de tratamiento es decir, a mayores tiempos de exposición se requiere menor concentración de lectina para inhibir la proliferación celular, lo que sugeriría una ventaja en tratamientos con bajas concentraciones de lectina a largo plazo.

Respecto a la sobrevivencia celular (Figura 9C), todas las concentraciones probadas, excepto la menor, provocaron muerte celular en función de la concentración respecto al control inicial (Dunnett, $p \leq 0.05$). La concentración más alta probada provocó el 93% de muerte celular y fue la única concentración que presentó diferencia mediante los dos métodos estadísticos utilizados. La CL_{50} para 72 horas de tratamiento fue de 2.99 μ g de proteína/mL (3.52 UA/mL). Lo anterior indica que se requiere 25 veces más lectina para provocar la muerte celular que para inhibir la proliferación. Como ya se mostró, el tratamiento a 24 horas permitió una diferencia de 5 veces entre las CI_{50} y CL_{50} . Este resultado sugiere que el tratamiento a 72 horas permite diferenciar mejor los dos efectos. Además es posible observar que las CL_{50} fueron iguales a 24 y 72 horas, lo que sugiere son suficientes tiempos cortos de exposición para provocar la muerte celular.

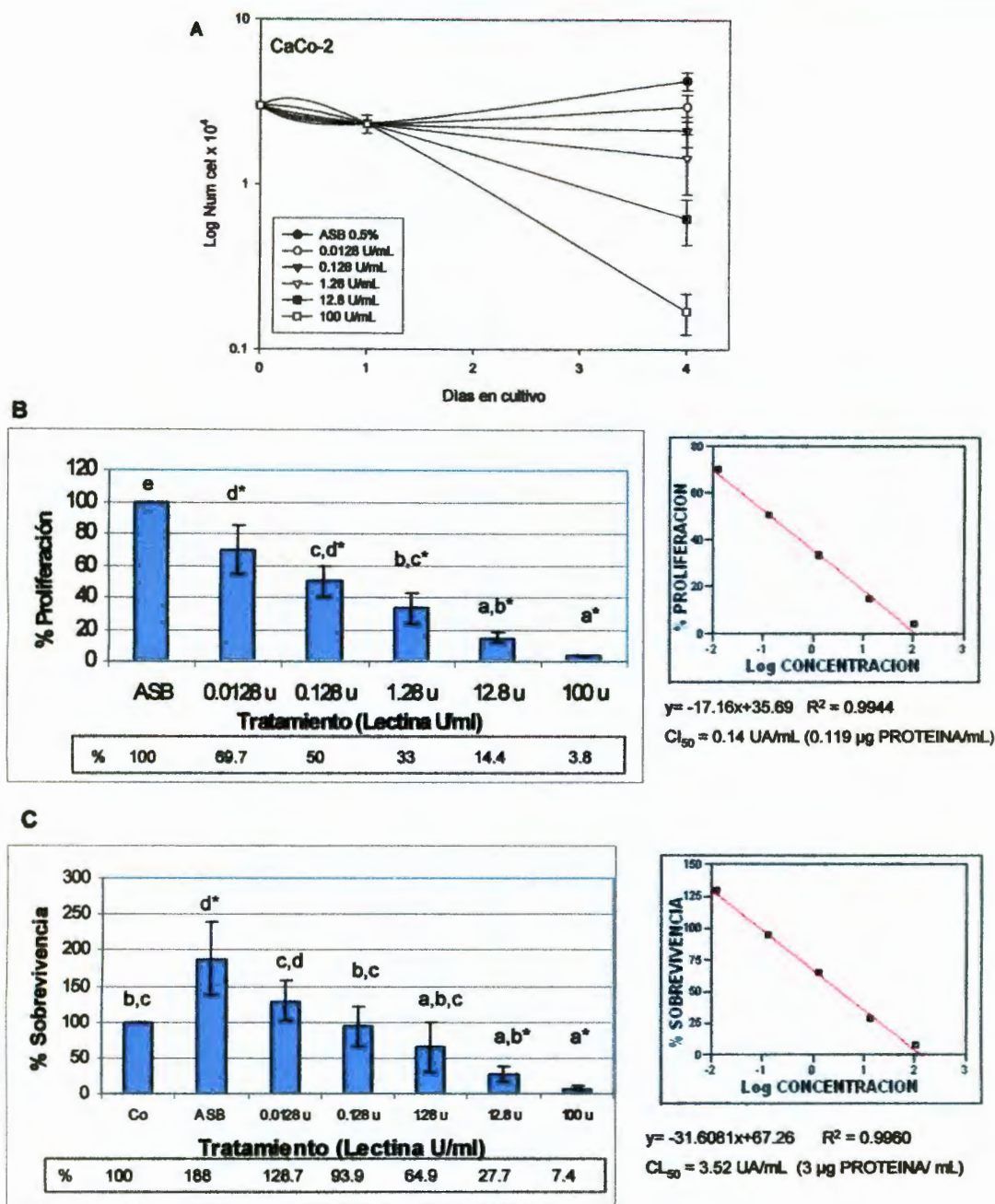


Figura 9. Efecto de la fracción rica en lectina de frijol tépari sobre la proliferación y sobrevivencia de células CaCo-2 a 72 horas de tratamiento. Se sembraron 3×10^4 células/pozo en placas de 24 pozos y a las 24 horas se cambiaron condiciones agregando diferentes concentraciones de la fracción concentrada de lectina. Después de 72 horas las células fueron contadas con ayuda de un hemocitómetro. El porcentaje de proliferación (B) y de sobrevivencia (C) se obtuvo a partir de los resultados de la curva dosis-respuesta (A). Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y el control (Dunnett, $p \leq 0.05$). La CL_{50} y la CL_{50} se calcularon mediante regresión lineal simple. Se muestra el promedio de al menos dos experimentos independientes.

En el caso de las células IEC-18 (epitelio intestinal normal), se determinó el efecto de la fracción concentrada de lectina únicamente a 24 horas de tratamiento (Figura 10). La curva dosis-respuesta (Figura 10A) muestra un efecto similar al tratamiento sobre CaCo-2 a 72 horas de exposición. Las tres concentraciones más altas probadas resultaron citotóxicas, la concentración de 0.128 UA/mL resultó citostática y la concentración más baja probada, así como el tratamiento con 0.5% ASB, tuvieron un ligero efecto estimulador. Al determinar el efecto sobre la proliferación celular (Figura 10B), se observó un efecto estimulante de la proliferación en el control con ASB y en las dos concentraciones más bajas probadas (0.0128 y 0.128 UA/mL). Las concentraciones de 1.28, 12.8 y 100 UA/mL provocaron inhibición de la proliferación en 49, 65 y 84%, respectivamente y mostraron diferencias estadísticas respecto al control (Tukey, Dunnett $p \leq 0.05$), la CI_{50} a las 24 horas de tratamiento fue de 1.9 μ g de proteína/mL (2.23 UA/mL). En el caso de la sobrevivencia celular (Figura 10C) las concentraciones de 12.8 y 100 UA/mL resultaron ser citotóxicas ya que provocaron un 53 y 88% de muerte celular, respectivamente presentando diferencia estadística respecto al control inicial (Tukey, Dunnett $p \leq 0.05$). La CL_{50} fue de 7.94 μ g de proteína (9.32 UA/mL), lo cual indica que se requieren 4.2 veces más lectina provocar la muerte que para inhibir al proliferación celular.

La selectividad de la fracción de la lectina estudiada se pudo observar comparando con la línea celular IEC-18 (epitelio de íleon de rata) que, aunque no se trata de epitelio colónico humano, presentan características similares con las del epitelio intestinal humano en crecimiento y morfología, por lo que se considera adecuada para correlacionarlas con la fisiología de enterocitos de células derivadas de tumores colónicos como las CaCo-2 (Gordon *et al.*, 2005). La comparación del efecto antiproliferativo se demuestra en el tratamiento a 24 horas, en donde las células CaCo-2 presentan una CI_{50} de 0.563 μ g de proteína/mL respecto a las IEC-18 que requieren una CI_{50} de 1.902 μ g de proteína/mL (3.4 veces más). En el caso del efecto citotóxico a 24 horas, la CL_{50} para las células CaCo-2 fue de 2.87 y para las células IEC-18 de 7.94 μ g de proteína/mL. Lo anterior indica que, para provocar la muerte de las células normales, se requieren

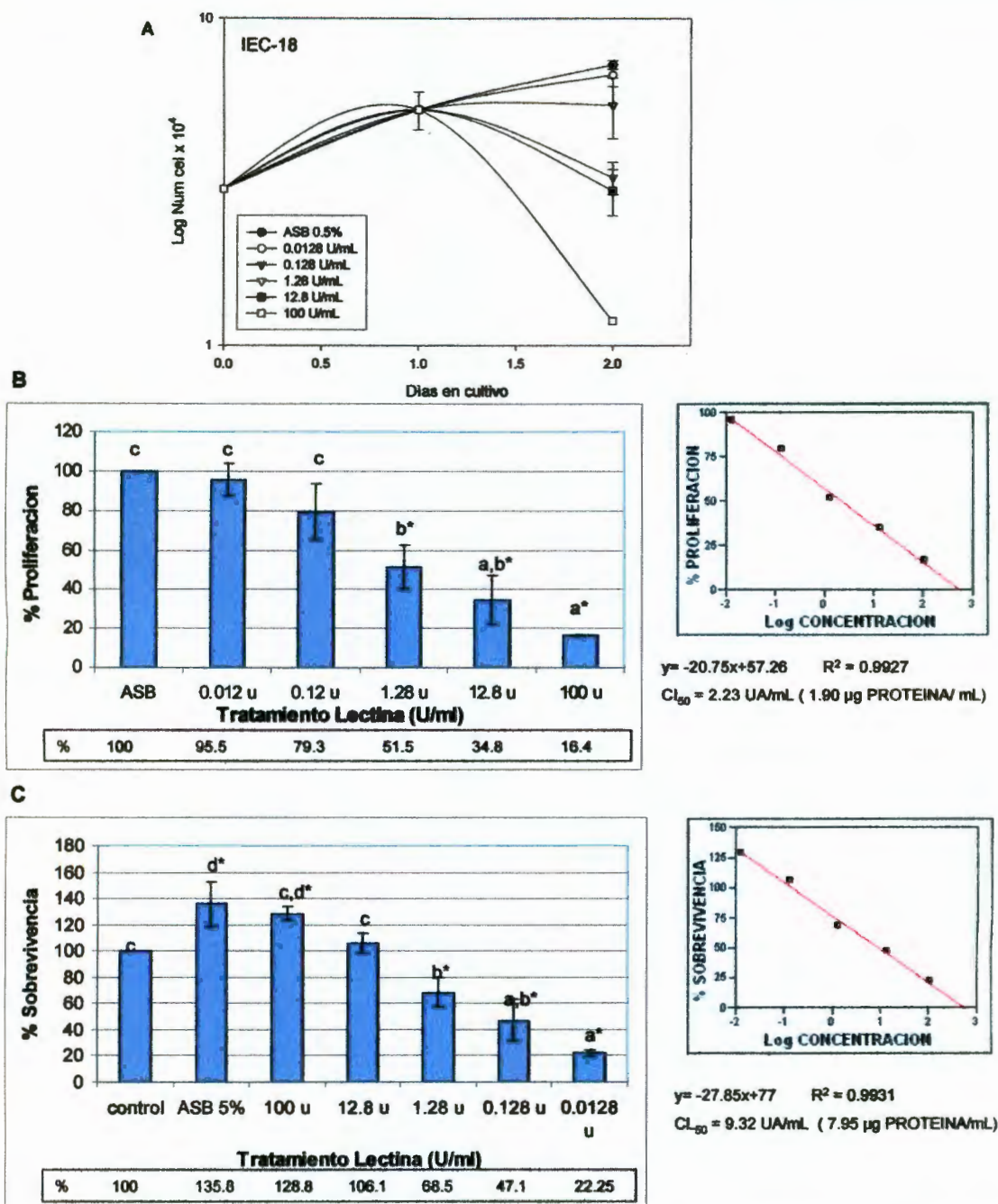


Figura 10. Efecto de la fracción rica en lectina de frijol tépari sobre la proliferación y sobrevivencia de células IEC-18 a 24 horas de tratamiento. Se sembraron 3×10^4 células/pozo en placas de 24 pozos y a las 24 horas se cambiaron condiciones agregando diferentes concentraciones de la fracción concentrada de lectina. Después de 24 horas las células fueron contadas con ayuda de un hemocitómetro. El porcentaje de proliferación (B) y de sobrevivencia (C) se obtuvo a partir de los resultados de la curva dosis-respuesta (A). Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y el control (Dunnett, $p \leq 0.05$). La CL_{50} y la CL_{50} se calcularon mediante regresión lineal simple. Se muestra el promedio de al menos dos experimentos independientes.

2.8 veces más fracción concentrada de lectina. Esta selectividad se debe principalmente a las diferencias en los patrones de glicosilación, ya que están generalmente alterados en células tumorales en comparación con su contraparte normal, lo que permite una mayor afinidad de la lectina por las células cancerígenas (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).

En diversos estudios sobre la actividad biológica de lectinas vegetales de diferentes fuentes se ha reportado su capacidad citostática y citotóxica sobre células cancerígenas (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005). Esta misma fracción de lectina se ha estudiado sobre otras líneas celulares de cáncer humano. Yllescas (2006) mostró que esta fracción presentó una CI_{50} de 6.83 μg de proteína/mL y una CL_{50} de 27.90 μg de proteína/mL para la línea celular de cáncer cérvico uterino VPH negativo (C33A); CI_{50} de 9.39 μg de proteína/mL y CL_{50} de 13.80 μg de proteína/mL para células de cáncer cérvico uterino VPH 16 (SiHa) y para células de cáncer cérvico uterino VPH 18 (HeLa), CI_{50} de 12.5 μg de proteína/mL y CL_{50} de 36 μg de proteína/mL en tratamientos a 72 horas. Lo anterior muestra que, para este mismo tiempo de exposición, las células CaCo-2 fueron más sensibles que cualquiera de las líneas de cáncer cérvico-uterino estudiadas (hasta 105 veces más sensibles que la línea celular HeLa).

De igual forma, un estudio con la misma fracción de lectina sobre células de cáncer de mama realizado por Castañeda (2007) demostró que, para la línea celular MCF-7 (cáncer de mama glandular) las CI_{50} y CL_{50} fueron de; 9.14 y 13.8 μg de proteína/mL, respectivamente en tratamientos a 24 horas. En tratamientos de 72 horas la CI_{50} fue de 4.27 y la CL_{50} de 3.53 μg de proteína/mL. En éste mismo estudio se analizaron también las células de cáncer de mama ductal (ZR-75), obteniendo una CI_{50} de 48.9 y una CL_{50} de 62 μg de proteína/mL en tratamientos de 24 horas. Las CI_{50} y CL_{50} para tratamientos de 72 horas fueron: 4.05 y 16.5 μg de proteína/mL respectivamente. Nuevamente, las células CaCo-2 mostraron ser más sensibles que las de cáncer de mama aunque las células MCF-7, de cáncer de mama glandular, presentaron una CL_{50} a 72 horas similar a la encontrada para células CaCo-2.

Otros autores han estudiado el efecto de diferentes lectinas sobre células de cáncer de colon. En un estudio donde se analizó el efecto sobre el crecimiento celular de tres líneas de cáncer colorrectal humano *in vitro*; LoVo (línea celular iniciada de un adenocarcinoma de colon metastático), HCT-15 (línea celular derivada de un carcinoma de colon) y SW837 (línea celular aislada de un adenocarcinoma rectal). Se trató a cada línea celular con cinco diferentes lectinas (PNA: *Phaseolus vulgaris*, GSA: *Griffonia simplicifolia*, CON-A: concanavalina A, WGA: germen de trigo y PHA-L: aglutininas de cacahuate) durante 2, 3, 5 y 7 días usando concentraciones de 0.1, 1.0, 10 y 100 µg de proteína/mL. Se observó un efecto negativo sobre el crecimiento de éstas líneas celulares, con al menos tres de las lectinas probadas, dándose los mejores efectos con concentraciones entre 10 y 100 µg de proteína/mL. Las lectinas WGA y CON-A demostraron tener un efecto a largo plazo, la lectina PNA estimuló ligeramente un efecto en el crecimiento de todas las líneas probadas. Los efectos de las lectinas GSA y PHA-L tuvieron variaciones entre las diferentes líneas celulares (Kiss *et al*, 2006). La sensibilidad de las células de epitelio colorrectal humano a bajas concentraciones de lectina se ha reportado en estudios con lectina de la haba VFA (*Vicia faba*) sobre tres líneas celulares derivadas de adenocarcinoma colorrectal humano *in vitro* (LS174T, SW1222 y HT29), en donde se describe la inhibición de la proliferación de éstas líneas de una manera dosis-dependiente presentando efecto con 10 µg de proteína/mL de tratamiento (Jordison *et al*, 1999). Dichos resultados demuestran la especificidad de diferentes lectinas para afectar el crecimiento de células cancerígenas determinadas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el efecto de la lectina de frijol tépari sobre las células CaCo-2 se encuentra entre 0.1 y 3 µg de proteína/mL, lo cual es menor a lo encontrado en los estudios antes mencionados. Cada línea celular expresa diferentes proteínas de membrana, permitiendo la interacción diferencial con cada lectina. De forma similar se han reportado estudios sobre la especificidad de las lectinas y su unión a carbohidratos en tres líneas de celulares de carcinoma colorrectal humano (CaCo-2, HT29 y HCT8), utilizando diferentes lectinas con fluorescencia: DBA (*Dolichos bofflorus*), PNA

(Lectina de cacahuate), LCA (*Lens culinaris*), STL (*Solanum tuberosum*) y WGA (germen de trigo). Fue posible determinar la tasa de unión a las diferentes líneas celulares, reflejando su patrón de glicosilación. Las que presentaban una mayor unión a las líneas celulares fueron (PNA) que se une a carbohidratos receptores galactosa β 1 terminales y a 3-N-acetilgalactosamina, y la lectina (WGA) que se une a N-acetilglucosamina y al ácido neuroamínico (Garbor *et al*, 1998).

El presente trabajo muestra que la lectina de frijol tépari es capaz de reconocer y afectar el crecimiento de células de cáncer de colon. Lo anterior es importante pues, dada la localización anatómica de dicho órgano, sería muy probable que la lectina pudiera entrar en contacto de forma natural con células cancerígenas. Además, la lectina estudiada presenta patrones de afinidad mayores que los que otras lectinas han mostrado en células de cáncer de colon. Por lo anterior, estudios en curso pretenden evaluar el uso de la lectina de frijol tépari sobre el cáncer de colon *in vivo*.

IX. CONCLUSIONES.

- Fue posible obtener una fracción rica en lectina de frijol tépari sin embargo, se perdió actividad aglutinante al someter a la proteína a intercambio iónico. Será necesario optimizar el método de purificación y establecer las condiciones para evitar la pérdida de actividad.
- Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la fracción concentrada de lectina de frijol tépari fue capaz de reconocer a células de cáncer de colon humano (CaCo-2) provocando la muerte e inhibiendo la proliferación en función de la concentración.
- El efecto antiproliferativo de la fracción rica en lectina sobre células CaCo-2 fue más efectivo en tratamientos largos que en tratamientos cortos ya que se requirió menor cantidad de dicha fracción para provocar el mismo efecto. Sin embargo, el efecto citotóxico fue el mismo para tratamientos cortos o largos ya que fue necesaria la misma concentración para provocar el 50% de muerte celular.
- El efecto de la lectina estudiada sobre la proliferación y sobrevivencia de células CaCo-2 fue diferencial respecto a su contraparte normal IEC-18, las cuales requirieron aproximadamente 3 veces más fracción para sufrir el mismo efecto.
- Fue posible comparar los resultados obtenidos con otros estudios en los que se utilizó la misma fracción concentrada de lectina y se determinó que las células de cáncer de colon son más sensibles que células de cáncer cérvico-uterino y mama.

X. PERSPECTIVAS.

- Trabajos futuros se enfocarán en estudiar los mecanismos de acción involucrados en la muerte de células de cáncer de colon.
- Determinar el potencial de dicha lectina como herramienta terapéutica contra cáncer de colon *in vivo*.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 1999. Biología Molecular de la Célula. Ediciones Omega. 3ª edición. Barcelona, España. pp: 1258-1270.

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Jphnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watter P. 2006. Introducción a la Biología Celular. 2º edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. pp 727-739.

American Cancer Society, Inc. 2007.

http://www.cancer.org/docroot/ESP/content/ESP_5_1x_Que_es_5.asp

Última consulta 20 de febrero 2007

American Type of Culture Collection. 2005. <http://www.atcc.org> Última consulta 11 de enero 2007.

Avers, J. C. 1986. Molecular Cell Biology. Editorial Benjamin Cummins 1ª edición. Estados Unidos de Norteamérica. pp 158-163

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annal. Biochem: 72: 248-254.

Boyd W.C. y Reguera R.M. 1954. Antigenic relations of blood group antigen as suggested by test with lectins. Immunology. 73: 226.

Bussolino, F., Mantovani, A. y Mittleman, A. 1997. Molecular mechanisms of blood vessel formation. Trends Biochem Sci. 22: 251-256.

Castañeda Cuevas, A. 2007. Efecto citotóxico de una lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células humanas de cáncer de mama. Trabajo de Investigación para obtener el grado de Licenciado en Nutrición. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. pp. 42-45

Castillo-Villanueva, A. y Abdullaev F. 2005. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. Revista de Investigación Clínica 57 (1): 55-64.

Chrispeels, M. J. y Raikhel, N. V. 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. The Plant Cell. 3: 1-9.

Cox, T. y Sinclear, J. 1998. Biología Molecular en Medicina. Editorial Panamericana. 3ª Edición. Madrid, España. pp 158.

Debouck D. G. 1994. *Phaseolus acutifolius*. Plant production and protection series. 26: 47-62. <http://www.hort.purdue.edu/newcorp/1492/beans.html> Última consulta 21 de enero 2007.

Fawcett, D. 1995. Tratado de Histología. Editorial Interamericana McGraw-Hill, 12ª Edición. Madrid, España. pp: 697-698.

Flórez, J. 2000. Farmacología Humana. Editorial Masson. 3ª edición. Barcelona, España. pp 927-940.

Ganem Báez F. y Martín González O. 2000. Lectina Concanavalina A: obtención y purificación. Universo Diagnóstico: 1(1): 1-41.

Garbor, F., Stangl, M. y Wirth, M. 1998. Lectin-mediated bioadhesion: binding characteristics of plant lectins on the enterocyte-like cell lines CaCo-2, HT29 and HCT8. J. Control Release 55: 131-142

García-Gasca T., Salazar Olivo, L. A., Mendiola-Olaya E. y Blanco-Labra A. 2002. The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on *in vitro* cell proliferation and cell adhesion of transformed cells. Toxicol. In Vitro: 16:229-233.

Geoffrey, M. 2000. The Cell a Molecular Approach. Editorial Sinauer. 2º edición. pp 1358.

Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. y Sharon, N. 1980. What should be called a lectin?. Nature. 285: 66.

González de Mejía, E., Hanklin, C., Paredes-López, O. y Shanon, L. 1990. The lectins and lectin-like proteins of tepary beans (*Phaseolus acutifolius*) and tepary-common bean (*Phaseolus vulgaris*) hybrids. J. Food Biochem. 14: 117-126

González de Mejía E., Grajeda Cota P., Celada E., y Valencia M.E., 1998. Caracterización del potencial del frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*). Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 38: 907-924.

González de Mejía E. y Prisecaru V. I. 2005. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 45:425-445.

Gordon, P. V., Paxton, J. B. y Fox, N. S. 2005. A methodology for distinguishing divergent cell fates within a common progenitor population: adenoma-and neuroendocrine-like cells are confounders of rat ileal epithelial cell (IEC-18) culture. BMC Cell Biology. 6:2. <http://www.biomedcentral.com/1471-2121/6/2> Última consulta 15 de Marzo de 2007.

Hernández Díaz P., Martín González O., Rodríguez de Pablos Vélez Y. y A. Ganem Báez F. 1999. Aplicaciones de las lectinas. Revista Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 15(2):91-95.

Hernández Rivera E. 2005. Efecto citotóxico de una fracción rica en lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células cancerígenas. Tesis para obtener el grado de Químico en Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. pp 32-41

http://www.juliet.med.jhmi.edu/~bianchet/lectin_dimer.jpg Última consulta 22 de marzo de 2007.

<http://www.bioteach.ubc.ca/CellBiology/TheCellCycle/cellcycle.gif>. Ultima consulta 31 de marzo de 2007.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), 2006. <http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/estadisticas/2006/cancer06.pdf>. Última consulta 12 de marzo de 2007.

Janzen, D. H., Juster, H. B. y Liener, I. E. 1976. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. Science 192: 795-796.

Jordison, M., El-Harury, I., Calnan, D., Calam, J. y Pignatelli, M. 1999. *Vicia faba* agglutinin, the lectin present in broad beans, stimulates differentiation of undifferentiated colon cancer cells. Gut. 44: 709-714.

Karp, G. 1996. Biología Celular y Molecular. McGraw Hill. Interamericana. 1ª edición. Madrid, España. pp. 671-688.

Kiss, R., Camby, I., Duckworth, D., De-Decker, R. y Salmon, I. 1997. *In vitro* influence of *Phaseolus vulgaris*, *Griffonia simplicifolia*, Concanavalin A, wheat germ and peanut agglutinins on HCT-15, LoVo and SW 837 human colorectal cancer cell growth. Gut; 40: 253-261

Koblinski, J. E., Ahram, M. y Sloana, B. F. 2000. Unraveling the role of proteases in cancer. Clin. Chim. Acta. 291: 113-135.

Laemmli, H. K. 1979. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Liener, M. 1997. Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds www.diarioelzonda.com.ar. Última consulta 18 de diciembre de 2006.

Lipkin, M. 1974. Phase 1 and Phase 2 proliferative lesions of colonic epithelial cells in diseases leading to colonic cancer. Cancer. 34(3): 878-888.

Lis, H. y Sharon, N. 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* 98: 637-674

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaria, P., Baltimore, D. y Darnell, J. 2002. *Biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana. 4° edición. Madrid, España pp 1054-1081.

Lyu S., Choi S. H. y Park W. B. y Kim, W. 2001. Involvement of caspase-3 in apoptosis induced by *Viscum album* var. *coloratum* agglutinin in HL-60 cells. *Biosci. Biothechnol Biochem*; 65: 534-541

Lyu S., Choi S. H. y Park W. B. 2002. Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p-53. *Arch. Pharm. Res.* 25(1): 93-101.

Maier, G. y Fiebig, H. 2002. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts *in vitro*. *Anti-Cancer Drugs*; 13: 373-379

Martínez- Rodríguez, J. M. 1980. El tépari (*Phaseolus acutifolius* Gray): Aspectos históricos, agronómicos, ecológicos y socioeconómicos de su cultivo. Seminario de fitotecnia. Escuela de Agricultura y Ganadería. Universidad de Sonora. pp 12-18.

MedlinePlus Enciclopedia Médica: Cáncer de colon.
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish> Última consulta 10 de Marzo de 2007

Mejía, R. M. 1995. Contribución al estudio de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) en Querétaro: susceptibilidad sensorial y la función de sus lectinas en la resistencia al ataque de insectos durante su almacenamiento. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. pp 13-20.

McCance y Huether. 1994. *Pathophysiology. The Biologic Basis for Disease in Adults and Children* 2° edición. St. Louis, Mo., E.U. pp 318-327.

Moffett, D. F., Moffett, S. B. y Schauf, C. L. 1993. *Human physiology*. Editorial Wm. C. Brown Publishers. 2° edición. Estados Unidos. pp 592-622.

Muñoz, A. 1997. *Cáncer. Genes y nuevas terapias* Editorial Hélice. 1ª edición. Madrid, España. pp 495-507.

Murray, P. D. 1990. *Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology*. 182: 289-293.

Murray, N. R., Davidson, L. A., Chapkin, R. S., Gustafson, W. C., Schattenbrg, D. G. y Fields, A. P. 1999. Overexpression of protein kinase C β_{II} induces colonic

hyperproliferation and increased sensitivity to colon carcinogenesis. *Journal of Cell Biology*. 145: 699-711.

Nabham, G. P. y Felger, R.S. 1978. Teparies in southwestern North America: A biogeographical and ethnohistorical study of *Phaseolus acutifolius*. *Econ. Bot.* 32: 2-19.

Nagy, J., Masse, E. y Hereberg, K. 1995. Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyper permeability, and ascites fluid accumulation. *Cancer*. 55: 360.

Nakata, S. y Kimura, T. 1985 Effect of ingested toxic bean lectins on the gastrointestinal tract in the rat. *J. Nutr.* 115(12): 1621-1629.

Nicolson, G.L. 1994. Cancer progression and growth. *Exp Cell Res*, 204(2): 171-180.

Nishimura H., Nishimura M., Oda R., Yamanaka K., Matsubara T., Ozaki Y., Sekiya K., Hamada T. and Kato Y. 2004. Lectins induce resistance to proteases and/or mechanical stimulus in all examined cells—including bone marrow mesenchymal stem cells—on various scaffolds. *Exp. Cell Res*: 295: 119-127.

Organización Mundial de la Salud, (OMS). 2006. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets>. Última consulta, 12 de marzo de 2007.

Pageot, L. P., Perrault, N., Basora, N., Francoeur, C., Magny, P. y Beaulieu, J. F. 2000. Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Micros. Res. Tech.* 49: 394-400.

Peumans, J. W. y Van Damme, J.M. 2002. Seed Lectins. *Seed Proteins*. 42: 657-683

Quiroz, F. 1975. *Tratado de Anatomía Humana*. Editorial Porrúa S.A. 3° edición. México. pp 161-162.

Reynoso-Camacho R., González de Mejía E. y Loarca-Piña G. 2003. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food Chem Toxicol.* 41: 7-21.

Riaño-Sánchez R. 1997. Importancia y aplicaciones de las lectinas. Facultad de Química Farmacéutica Biológica. Universidad Veracruzana. <http://www.monografias.com/trabajos11/lectin>. Última consulta 31 de enero 2007.

Rouvière, H. y Delmas, A. 2001. *Anatomía Humana. Descriptiva, topográfica y funcional*. Editorial Masson. 10° edición. Madrid, España pp 364-365.

Scheerens, J.C., Tinsley, A.M., Abbas, I.R., Weber, C.W. y Berry, J.W. 1983. The nutritional significance of tepary bean consumption, *Desert Plants*. 5: 5-11

Tanaka, T. 1995. Chemopreventions of oral carcinogenesis. *Oral Oncol*: 31B(1): 3-15

Thomas, C.V. y Waines, J.G. 1984. Fertile backcross and allotetraploid plant from crosses between tepary beans and common beans. *J. Hered.* 75: 93-98.

Torroella M. y Villa Treviño S. 1998. Bases genéticas del cáncer. Fondo de Cultura Económica. 1° edición. México D.F. pp 76-78

Tratamiento del cáncer de colon. 2006.
<http://elmundosalud.elmundo.es/elmundosalud/especiales/cancer/colon7.html>.
Última consulta 4 de Abril de 2007.

Turner, R. H. y Liener, I. E. 1975. The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. *Anal. Biochem.* 68: 651-653.

Van Damme, J.M., Peumans, W.J., Barre, A. and Rouge, P. 1998. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Review Plant Science*: 17: 575-692

Willett, W. C. 1995. Diet, nutrition, and avoidable cancer. *Environmental Health Perspectives* 103(suppl 8): 165-170.

Yllescas Gasca L. 2006. Efecto de las lectinas del frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células del cáncer de cuello uterino. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Nutrición. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro: 35-40.

Zarkovic, N., Kalisnik, T., Loncaric, I., Borovic, S., Mang, S., Kissel, D., Konitzer, M., Jurin, M. y Grainza S. 1998. Comparison of the effects of *Viscum album* lectin ML-1 and fresh plant extract (Isorel) on the cell growth *in vitro* and tumorigenicity of melanoma B16F10. *Cancer Biother. Radiopharm.* 13:121-131.

ANEXO 1

1. Frijol Tépari

1.1. Características y descripción.

Puesto que las lectinas son sustancias encontradas comúnmente en las leguminosas, se piensa que juegan un papel en la resistencia al ataque de patógenos y microorganismos. Estudios sobre el uso terapéutico de lectinas contra el cáncer se han llevado acabo en modelos de experimentación con diferentes variedades de frijol, tal es el caso del tépari (*Phaseolus acutifolius*) (Reynoso-Camacho y col., 2003).

El frijol tépari pertenece a la familia de las leguminosas, su clasificación botánica es (Martínez-Rodríguez, 1980):

REINO	VEGETAL
División	Espermatofita
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Dicotiledoneae
Orden	Rosales
Familia	Leguminosa
Subfamilia	Fabaceae (papilionoidae)
Tribu	Phadeolinae
Género	<i>Phaseolus</i>
Especie	<i>acutifolius</i>
Variedades	<i>acutifolius</i> , <i>tenulfolius</i>

Es una planta anual, trepadora, de raíz fibrosa y de altura variable (generalmente de 30 cm hasta 1.5 m), de tallos delgados y pilosos, con hojas delgadas y lineales en los tipos silvestres, mientras que en los tipos cultivados son abovedadas (Figura 11). Las variedades trepadoras salvajes llegan a tener hasta 3 metros de altura. Las variedades domesticadas son medio-trepadoras o arbustivas que se

sostienen erectas solas y, por consiguiente, pueden ser cultivadas en el campo o en los huertos. Los cultivares domesticados difieren en sabor, color de la semilla, principalmente blanco, café y negro. Las vainas son pequeñas, las semillas semejan a los frijoles en miniatura y los tamaños varían entre 8.6 a 9.1 mm. La inflorescencia es un racimo axilar con dos a cinco flores. La vaina recta o falcada, de 5 a 9 cm de largo por 1 cm de ancho, contiene hasta 7 semillas, pero generalmente son 5. Las semillas aplanadas o reniformes, casi redondas, de 6 a 9 mm de largo y 3 a 6 mm de ancho, tienen la testa blanca, castaño o azul oscuro, uniforme o con manchas o puntos. El hilio es diminuto y circular. Las vainas jóvenes y las hojas también pueden proporcionar forraje para el ganado (Nabham y Felger, 1978; González de Mejía *et al.*, 1998).



Figura 11. Frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*).

1.2. Origen y distribución geográfica.

El frijol tépari es una leguminosa que crece en forma silvestre en algunas regiones áridas y semiáridas del suroeste de E.U.A, desde la parte central del estado de

Arizona (E.U.A.) hasta el sur de Nicaragua. Su origen se remota a 5000 a.C., en el valle de Tehuacán Puebla, lugar donde se encontraron las semillas más antiguas. Es una de las cinco especies de *Phaseolus* domesticadas en las Américas en tiempos precolombinos. Sus parientes silvestres, *P. acutifolius* var. *acutifolius*, *P. acutifolius* var. *tenuifolius* y *P. parvifolius* var. *Freytag*, están distribuidos en Aridoamérica y otras partes secas de América Central al noroeste del Lago de Nicaragua (Debouck, 1994). Actualmente su ubicación geográfica se ha extendido y algunas de sus variedades se han domesticado, por lo cual su localización se ha presentado más heterogénea. La mayoría de las especies silvestres y domesticadas se encuentran en las zonas desérticas del oeste de los Estados Unidos y el noroeste de México (Martínez- Rodríguez, 1980).

Este cultivo ha despertado gran interés por su valor intrínseco al ser un cultivo subexplotado, adaptado a condiciones de climas áridos y semiáridos. Presenta características muy importantes como su alto valor nutricional y la resistencia a condiciones agronómicas adversas como son; altas concentraciones salinas en el suelo, mínima irrigación y resistencia a ciertas plagas de insectos y de patógenos (Thomas y Waines, 1984; Debouck, 1994).

El frijol tépari contiene cantidades similares de proteína a las de otras leguminosas. La calidad biológica de su proteína es superior a la del frijol común, especialmente la variedad blanca. Se ha indicado que el tépari tiene potencial como donador de genes para obtener mejores variedades de frijol desde el punto de vista culinario, nutricional y toxicológico (González de Mejía *et al.*, 1998).

Existen antecedentes de consumo de frijol tépari por las tribus indígenas del noroeste de México desde hace varios siglos. Se prepara como cualquier otra leguminosa de grano, remojándolas, cocinándolas y en algunos casos, horneándolas. Son usadas como base para sopas y cocidos. Su alto contenido de lisina las hace excelentes fuentes suplementarias a los cereales. Sin embargo, como en el caso de otras leguminosas, la proteína es deficiente en metionina (González de Mejía *et al.*, 1998). El frijol tépari induce flatulencia en forma más

fuerte que otras leguminosas, y toma mucho más tiempo para suavizarse para su consumo. Se utiliza principalmente como alimento para humanos y animales debido a su gran contenido proteínico. Es un fertilizante natural porque al ser cultivado incrementa la fijación de nitrógeno atmosférico mediante la asociación de bacterias del género *Rhizobium* (Mejía, 1995).