



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

“EFECTO DE LA FRACCIÓN CONCENTRADA EN LECTINA  
DE FRIJOL TÉPARI (*Phaseolus acutifolius*) EN MÉDULA  
ÓSEA DE RATAS”.

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**STACY CRUZ JIMÉNEZ**

DIRIGIDA POR

**Dra. ADRIANA JHENY RODRÍGUEZ MÉNDEZ**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DE LA FRACCIÓN CONCENTRADA EN LECTINA  
DE FRIJOL TÉPARI (*Phaseolus acutifolius*) EN MÉDULA  
ÓSEA DE RATAS”.**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**STACY CRUZ JIMÉNEZ**

DIRIGIDA POR

**Dra. ADRIANA JHENY RODRÍGUEZ MÉNDEZ**

Dra. ADRIANA JHENY RODRÍGUEZ MÉNDEZ  
DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA  
ASESOR INTERNO

Dra. ANA ANGÉLICA FERREGRINO PÉREZ  
SINODAL

Dra. MARGARITA TERESA DE JESÚS GARCÍA GASCA  
SINODAL

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER  
SINODAL

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Frijol Tépari	1
1.1.1 Antecedentes históricos	1
1.1.2 Descripción botánica	1
1.1.3 Ecología y fitogeografía	3
1.1.4 Valor nutricional	3
1.1.5 Lectina del frijol Tépari	4
1.2 Lectinas	5
1.2.1 Definición	5
1.2.2 Historia	5
1.2.3 Propiedades de las lectinas	10
1.2.4 Estructura y clasificación	11
1.2.5 Fuente de lectinas	12
1.2.6 Aplicaciones de las lectinas	15
1.2.7 Lectinas y sistema inmune	15
1.3 Sistema inmune	17
1.3.1 Respuesta inflamatoria aguda y crónica	18
1.3.2. Células y tejidos del sistema inmune adaptativo	20
1.3.3 Médula ósea	21
1.3.4 Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)	25
1.3.4.1 PCNA en la replicación del DNA	26
1.3.4.2 Usos del PCNA	26
2. HIPÓTESIS	28
3. OBJETIVOS	29

3.1 General	29
3.2 Específicos	29
4. METODOLOGÍA	30
4.1 Materiales	30
4.2 Métodos	30
4.2.1 Preparación de las muestras	30
4.2.2 Tinción de hematoxilina y eosina	31
4.2.3 Inmunohistoquímica	31
4.3 Diseño experimental	33
5. RESULTADOS	35
5.1 Control del peso	35
5.2 Análisis histológico	36
5.3 Recuento de megacariocitos	38
5.4 Inmunohistoquímica	39
6. DISCUSIÓN	41
7. CONCLUSIONES	44
8. REFERENCIAS	45

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Lectinas de las plantas y carbohidratos a los que se unen.	11
2	Lectinas de cadena sencilla y doble.	13
3	Lectinas y su papel de defensa en las plantas.	16
4	Componentes de la inmunidad innata.	18
5	Marcadores linfocitarios.	20

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Frijol Tépari ( <i>Phaseolus acutifolius</i> ).	2
2	Diferentes aumentos en la médula ósea de un perro de 14 años de edad.	24
3	Cortes histológicos longitudinales de fémur de rata.	25
4	Fracción de lectina administrada y tiempos de exposición.	33
5	Evaluación del peso de las ratas tratadas con la fracción de lectinas.	34
6	Evaluación de cambios histológicos con los tratamientos de la fracción concentrada de lectina en médula ósea de vértebra y fémur a las cuatro semanas de tratamiento.	35
7	Evaluación de cambios histológicos con los tratamientos de fracción concentrada de lectina en médula ósea de vértebra y fémur a las seis semanas de tratamiento.	36
8	Análisis de megacariocitos en médula ósea de fémur de rata.	37
9	Análisis de megacariocitos en médula ósea de vértebra de rata.	37
10	Control positivo de la Inmunohistoquímica para PCNA.	38
11	Cambios histológicos en la médula ósea de fémur y vértebra con tinciones de Hematoxilina y Eosina (H&E) e Inmunohistoquímica (IHQ).	39

## **RESUMEN**

Debido a la necesidad por encontrar nuevas formas de modular la producción y activación de células del sistema inmune y con el fin de tratar diversas afecciones, se estudian diferentes sustancias que por su naturaleza, pueden tener un efecto sobre este mismo como estimulación, inhibición o toxicidad. En esta investigación se ensayó una fracción concentrada de lectina proveniente del frijol Tépari, administrada oralmente, de forma subcrónica utilizando como modelo experimental ratas Sprague Dawley macho de 14 semanas de edad. Posteriormente se realizaron observaciones sobre médula ósea proveniente de vértebras y fémur, a fin de detectar cambios en la histología y finalmente identificar si existe efecto de la lectina sobre la proliferación, utilizando marcadores específicos para células del sistema inmune en médula ósea. Finalmente se realizó un análisis global del efecto de la lectina comparándola con los respectivos controles, resultados que pese a una interesante tendencia no mostraron diferencia significativa que sugiera un aumento en la actividad proliferativa en la médula ósea, sin embargo no se descarta la posibilidad de ejercer un efecto a nivel MALT el cual es una nueva ruta de investigación. También se ha considerado que la lectina posea capacidades inmunodepresoras, lo cual permitiría considerarla como un fitofármaco potencial.

Palabras clave: Frijol Tépari, lectina, sistema inmune.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*)

#### 1.1.1 Antecedentes históricos

El frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*), perteneciente a la familia de las *Fabaceas*, conocido también como escomite, ejotillo (Chiapas), frijol piñuelero (Costa Rica) y Tepary bean en inglés. Es una leguminosa comestible, encontrada en regiones áridas del Sureste Norteamericano, Puerto Rico y México, con una gran capacidad de desarrollarse en condiciones hostiles como la alta concentración de sales y deficiencia de agua así como presentar resistencia a plagas y a microorganismos patógenos (Debouck, 2004; Fraile, 2007).

Esta especie ha estado presente por mucho tiempo en Mesoamérica, principalmente en zonas desérticas o con largos periodos de sequías. A diferencia de otras especies cultivadas del género, *P. acutifolius* fue la primera en describirse en su forma silvestre (Debouck, 2004).

Algunos hallazgos arqueológicos demuestran que esta especie se cultiva desde tiempos antiguos en el sureste de los Estados Unidos donde al parecer, se introdujo en México (hace 1200 años) y Puebla (donde existía hace 5000 años) Los cultivos se distribuyeron geográficamente desde Arizona y Nuevo México a Guanacaste en Costa Rica, en la ladera seca subtropical del Pacífico.

El producto principal es una semilla que se consume debido a su rico contenido en proteínas (17 a 27 %) y carbohidratos. También se utiliza como forraje después de su cosecha. No se sabe con precisión en donde fue domesticada la especie sin embargo, los análisis de electroforesis de la faseolina e isoenzimas indican que las poblaciones domesticadas eran pocas (Debouck, 2004).

#### 1.1.2 Descripción botánica

*P. acutifolius* es un terófito, se distingue fácilmente de otras especies de granos por su germinación epigea, hojas primarias sésiles, folíolos romboidales agudos, de



dos a cuatro flores de color rosa, tallos pequeños (blancos en algunos cultivares) con bractéolas triangulares muy pequeñas y las vainas marcadas con puntos de sutura (autogamia) (Figura 1). Existen dos formas silvestres reconocidas: la variedad *acutifolius* con folíolos romboidales y la variedad *tenuifolius* con folíolos lineales, a veces sagitados. Una tercera forma silvestre aparece de forma esporádica con folíolos falcados. Debido a que la variedad *tenuifolius* tiene diferentes características blastogénicas y posee una cierta incompatibilidad para el cruce, es considerada una especie distinta (*P. parvifolius*) (Debouck, 2004).

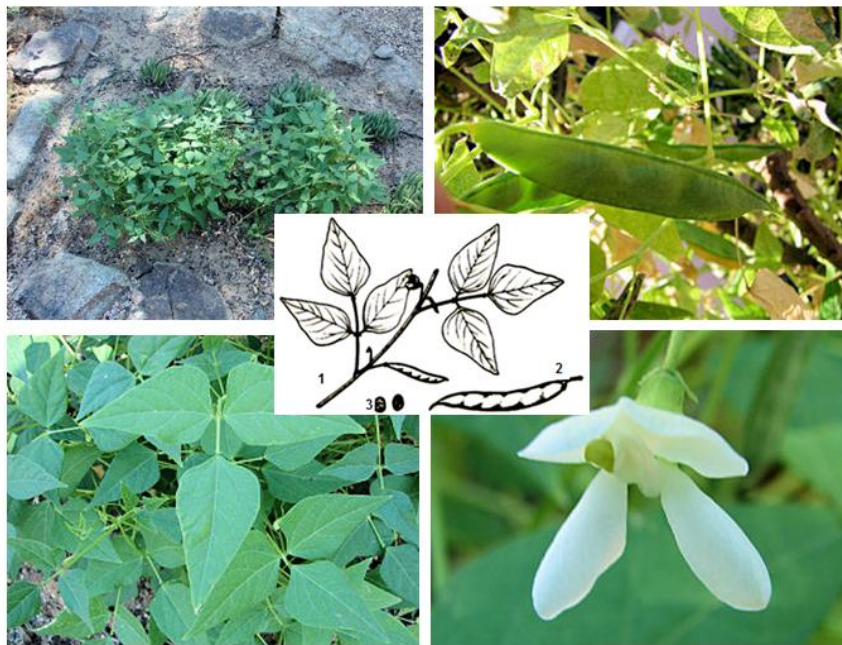


Figura 1. Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*). Las variedades domesticadas son enredaderas o matas, de hasta de 3m de alto, con folíolos lineales y romboidales agudos, difieren en sabor, color de la semilla entre otras características (Modificado de Fraile, 2007).

La forma cultivada, al igual que las formas silvestres tiene un ciclo corto, flores de 27 a 40 días después de la germinación y maduración de 60 a 80 días. Las plantas se marchitan por completo (excepto *P. parvifolius*).

En las formas silvestres, las semillas se dispersan en un radio de 3m por dehiscencia explosiva de las vainas. En algunos cultivares hay una latencia breve

después de la cosecha de aproximadamente un mes. Las semillas de las plantas silvestres, germinan a través de la imbibición causada por las sequias extensas de un año continuo. Sin embargo, sólo en algunas ocasiones la germinación escalonada se lleva a cabo en tres años (Debouck, 2004).

### 1.1.3 Ecología y fitogeografía

La forma cultivada se encuentra entre los 50m a 1920m sobre el nivel del mar. Requiere de una precipitación anual de 250mm a 300mm sin embargo en algunas regiones de México crece con una precipitación desde 150mm (Sonora) hasta 750mm (Campeche). Durante el periodo vegetativo, la temperatura durante el día puede llegar a ser de 20 a 32°C. Crece en arena, lodo y algunas ocasiones en suelos orgánicos con pH de 6.7 a 7.1 (Debouck, 2004).

Existe mayor predominio por la forma silvestre del frijol Tépari, que puede encontrarse en: Arizona, Nuevo México, Baja California, Sonora, Chihuahua, Durango, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Querétaro, Guerrero, Oaxaca y Jalapa. Ocupa hábitats semi-soleados, junto a los mezquites en las orillas de los arroyos, cerca de cactus y arbustos espinosos. Es considerada heliófita, puesto a que posee características que le permiten tolerar el exceso de sol (Debouck, 2004).

### 1.1.4 Valor nutricional

Este frijol es una fuente importante de aminoácidos como: serina, ácido aspártico, treonina, leucina, fenilalanina, asparagina, ácido glutámico, y la glicina (Valadez y Guzmán, 2011). Su contenido proteico oscila entre 13 y 31.9%, el de grasas de 0.4 al 3.4% correspondiendo del 65.3 al 69.1% a los carbohidratos; estos valores son dependientes de las condiciones agronómicas a las que se enfrenta la planta (Hamama y col., 2002; Fraile y col., 2007).

Muchas leguminosas son ricas fuentes de lectinas la mayor parte de estas moléculas se encuentran dentro de los cotiledones de las semillas, así como en hojas, tallos y raíces. Las lectinas pueden ocupar hasta un 10% del nitrógeno total

contenido en las semillas. Muchas de las lectinas de leguminosas son metaloproteínas, es decir requieren cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , o  $\text{Mn}^{2+}$ ) para su actividad biológica (Valadez y Guzmán, 2011).

Como muchas otras leguminosas, el frijol Tépari posee inhibidores de tripsina, factores con actividad antitumoral, hemaglutininas y toxinas. Estas últimas producen una importante pérdida de peso, problemas relacionados con la deficiencia de ciertas proteínas y hasta la muerte cuando se administra en su forma natural en ratas y ratones (Osman y col., 2003, Valadez y Guzmán, 2011). Este frijol es una importante fuente de lectinas (Pratt y Singh, 1990) que presentan un peso molecular dependiente del sitio geográfico del cual procede el frijol; 83kDa para las provenientes de Puerto Rico; 117kDa para las de Chiapas, México; y de 115-120kDa para las provenientes de Querétaro, México (Valadez y Guzmán, 2011).

#### 1.1.5 Lectina del frijol Tépari

Algunas lectinas del frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) se han aislado de sus semillas maduras mediante cromatografía de afinidad, cromatografía líquida de alto rendimiento y técnicas de solubilidad (Pratt y Singh, 1990).

Las subunidades de estas lectinas son polipéptidos con un peso molecular aparente de 30kDa. Las lectinas son sintetizadas en la planta aproximadamente 13 días después de la floración y posteriormente constituyen una importante fracción de proteínas en la semilla madura. La lectina tiene reactividad cruzada con las subunidades de la fitohemaglutinina (PHA), exhibiendo actividad eritroaglutinante y leucoaglutinante. Se ha observado toxicidad en los gorgojos de frijol (*Acanthoscelides obtectus*), cuando es incorporada a su dieta la semilla madura, a concentraciones por encima de las de PHA (5.1%) (Pratt y Singh, 1990).

## 1.2 Lectinas

### 1.2.1 Definición

Existen ciertos lípidos, taninos, sustancias catiónicas y carbohidratos, que en interacciones entre carbohidrato-carbohidrato pueden aglutinar células. Un ejemplo de este hecho son las lectinas, las cuales son glicoproteínas de origen no inmunológico, que se unen específica y reversiblemente a carbohidratos libres o que forman estructuras más complejas (Hernández, 1999). Las lectinas fueron clasificadas al principio como anticuerpos debido a la especificidad que tienen para enlazarse, sin embargo no poseen semejanza estructural a estos ya que son diferentes a las inmunoglobulinas. El término de “lectina” quedó limitado por las inmunoglobulinas las cuales necesitan un estímulo antigénico para sintetizarse y separado de la familia de las súper inmunoglobulinas animales; a pesar de presentar capacidad de formar enlaces con carbohidratos. Las lectinas pueden inducir estímulos externos que son diferentes a una exposición antigénica, como lo son los sensores de mono o disacáridos que actúan en la quimiotaxis o en los sistemas de operón y de proteínas de transporte (Rüdiger y col, 1985).

Las lectinas no modifican bioquímicamente los carbohidratos a los que se unen, por lo que las glicosiltransferasas, glicosidasas y enzimas que introducen un sustituyente como un grupo sulfato quedan excluidas de la clasificación. También es considerada una lectina, aquel carbohidrato capaz de reconocer el dominio y de activar una proteína multifuncional; un ejemplo son las lectinas tipo C encontradas en animales (Rüdiger y Hans, 2002).

La expresión de lectinas de algunas plantas incrementa como consecuencia de estrés, infección viral, sequía o una concentración salina elevada (Rüdiger y Hans, 2002).

### 1.2.2 Historia

La aglutinación de los eritrocitos por proteínas y moléculas de origen natural con capacidad de reconocer azúcares de superficie, se conoce desde finales del siglo

XIX y fue uno de los marcadores potenciales que centraron la atención en el estudio de las lectinas (Hans, 2002).

El interés por el aislamiento de estas moléculas en plantas y animales ha aumentado, debido a su uso como herramientas en la caracterización y la amplia gama de interacciones con diferentes sistemas biológicos (Hans, 2002).

Las proteínas aglutinadoras de eritrocitos, denominadas hemaglutininas, o fitohemaglutininas (procedentes de plantas) fueron descritas en 1888 por Peter Hermann Stillmark en su tesis doctoral en la Universidad de Dorpat (Estonia) (Rüdiger y Hans, 2002).

Stillmark describió los extractos de ricino (*Ricinus communis*) y otras plantas de la familia *Euphorbiaceae* con actividad aglutinante para las células sanguíneas provenientes de diferentes fuentes animales, por ejemplo de ratones, perros y gatos. Analizó el ricino de esta misma familia, y asumió que su capacidad de aglutinación y toxicidad era originada por la ricina, la cual consideraba una enzima. Ahora se sabe que *Ricinus communis*, contiene una proteína tetramérica nombrada de la misma manera que su fuente de origen, la cual posee la característica de aglutinar células, y alta toxicidad. (Harley y col., 1984, Roberts y col., 1985, Rüdiger y Hans, 2002,).

Algunos resultados obtenidos por Stillmark indicaron que la selectividad de la Ricina, induce la aglutinación de las células rojas en diferentes animales. Esta observación fue corroborada por Karl Landsteiner, galardonado al Premio Nobel por el descubrimiento de los grupos sanguíneos humanos A, B y O de la sangre en 1900, quien además documentó la actividad de diferentes extractos de semillas en células rojas de diferentes animales. Por otro lado, H. Hellin demostró la presencia de otra hemaglutinina: la "Abrina" en extractos de frijol (*Abrus precatorius*). Sin embargo fue Erlich quien describió la capacidad aglutinante de la Ricina y la Abrina en ratones cuando se les sometía a pequeñas dosis repetidas inyectadas subcutáneamente. Este hecho evidenció la especificidad de la respuesta inmune. Erlich demostró que la inmunidad a las toxinas era transferida de la madre a sus

descendientes mediante el embarazo, por la sangre y leche materna después del nacimiento. Mediante estudios de los efectos inmunológicos de la anti-Ricina en la actividad aglutinante de la Ricina, Erlich demostró que hay una relación cuantitativa entre la cantidad de anti-suero y antígeno, y mediante esta evidencia, realizó la primera determinación cuantitativa del anticuerpo *in vitro*. Estos estudios demostraron la respuesta específica de los anticuerpos, el fenómeno de la memoria inmunológica y la transferencia de la inmunidad humoral de la madre a sus descendientes (Sharon y Lis, 2004).

En 1919, James B. Sumner de la Universidad de Cornell (Itaca, New York) conocido por ser el primero en cristalizar la enzima ureasa, aisló una proteína de *Canavalia ensiformis*, la primera hemaglutinina de este frijol que fue nombrada Concavalina A. Sin embargo, pasaron casi dos años antes de que se reportara que la Concavalina A aglutinaba eritrocitos, levaduras, la mucina y el glucógeno de una solución. Se realizaron experimentos con la lectina los cuales concluyeron que la hemaglutinación inducida por la Concavalina A podía ser consecuencia de la reacción de una proteína contenida en la planta con los carbohidratos de la superficie de las células rojas (Rüdiger y Hans, 2002; Sharon y Lis, 2004).

A partir del descubrimiento de la Concavalina A, nace el interés por otras lectinas como la del frijol de soya, de chícharos verdes, semillas del Guisante sureño (*Dolichos biflorus*), de germen de trigo y de champiñones (*Agaricus campestris*) (Sharon y Lis, 1972, Masaoka y col., 1999) así como de las lectinas animales entre las que se encontraban las de águila (Springer y Desai, 1971), caracol (Hammarström y Kabat, 1969) y el exoesqueleto del cangrejo (Marchalonis y Edelman, 1968).

El objetivo de estas investigaciones era conocer más sobre las bases estructurales de la especificidad de antígenos asociada con el sistema grupo sanguíneo ABO. La habilidad de las aglutininas de las plantas para distinguir entre diferentes tipos de eritrocitos, llevó a Shapleigh en 1954 a proponer el nombre de lectinas, del latín *legere*, cuyo significado es seleccionar o elegir. Este término fue generalizado para

referir a todas las aglutininas de origen no inmune independientemente de la fuente o tipo de especificidad que presentaran en los eritrocitos (Sharon y Lis, 1972).

En los 60's dos descubrimientos generaron una mayor atención en las lectinas. El primero, por Peter C. Nowell (1960), quien encontró que la lectina de un tipo de frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*) conocida como fitohemaglutinina (PHA), era mitogénica, es decir poseía la habilidad de estimular a los linfocitos a sufrir mitosis (Sharon y Lis, 2004). Este descubrimiento rompió con la idea de que los linfocitos no podían diferenciarse o dividirse aun más (Morgan y col, 1976).

Al paso del tiempo, se probó que otras lectinas eran mitogénicas tal como la Concavalina A sin embargo, esta es inhibida por bajas concentraciones de monosacáridos como la manosa, resultado de los enlaces de las lectinas a los azúcares de la superficie de los linfocitos lo cual fue una de las primeras manifestaciones del papel biológico de los carbohidratos de superficie. Las lectinas mitogénicas comenzaron a ser una herramienta para el estudio de la transducción de señales de las células y para el análisis de eventos bioquímicos que ocurren durante la estimulación de linfocitos *in vitro* (Sharon y Lis, 2004).

El segundo descubrimiento fue hecho por Joseph C., del Hospital General de Boston, Massachusetts quien encontró que la aglutinina del germen de trigo (WGA) tenía la habilidad de aglutinar preferencialmente las células "malignas". Estas observaciones continuaron con los reportes de Max M. Burgeu, Leo Sachs y Michael Inbar del Instituto Weizmann (Rehovot), demostrando que la Concavalina A y la aglutinina del frijol de soya (SBA) tenían la misma propiedad aglutinante. Se poseía la evidencia de que los cambios en los carbohidratos de superficie de la membrana celular, estaban asociados con el desarrollo de cáncer y que una alta susceptibilidad a la aglutinación por lectinas era una propiedad de las células malignas. Actualmente se sabe que no solo las células malignas presentan aglutinación (Sharon y Lis, 2004).

A principios de 1970, se reportó la presencia de otras hemaglutininas en numerosos organismos, principalmente plantas, pero muy pocas purificadas, la mayoría de las veces por técnicas convencionales (Sharon y Lis, 2002).

La presencia de hemaglutininas en animales fue señalada en casi todos los invertebrados o vertebrados inferiores. Hasta mediados de los 1970's, tres lectinas animales (águila, caracol y armadura del cangrejo) fueron purificadas y caracterizadas. La primera aislada del águila mostró ser específica para L-fructosa (Sharon y Lis, 2002).

En 1975 Vivian Teichberg purificó una lectina específica de la familia de la  $\beta$ -galactosa (proveniente de la anguila eléctrica) nombrada galectina (Teichberg y col., 1975). Desde el comienzo de los 1980's el número de las lectinas animales purificadas también comenzó a crecer rápidamente gracias a las técnicas recombinantes (Sharon y Lis, 2004).

En 1978 la Ricina ganó fama, después de su uso como arma biológica, en el "Homicidio sombrilla", en el cual fue asesinado Georgi Markov, escritor y locutor de oposición en Bulgaria y miembro de la BBC en Londres. Se utilizó como arma por los Estados Unidos durante la primera guerra mundial y durante la segunda guerra mundial se desarrolló una bomba de Ricina, probada por el ejército Británico, pero nunca se desplegó como arma masiva de destrucción (Sharon y Lis, 2004).

El interés en las lectinas es un ejemplo claro de que son herramientas invaluable para la detección, purificación y caracterización de glicoconjugados, principalmente de glicoproteínas para el análisis de tejidos en técnicas de histoquímica, para cambios que ocurren la superficie de las células durante procesos físicos, patológicos y para la diferenciación de cáncer (Sharon y Lis, 2004).



### 1.2.3 Propiedades de las lectinas

En los 1970's se intensificaron los estudios de las propiedades moleculares de las lectinas, lo cual era necesario para entender su actividad a nivel molecular. Estos estudios comenzaron desde la determinación de las principales propiedades fisicoquímicas de las lectinas para completar la secuencia de aminoácidos y la elucidación de sus estructuras tridimensionales. Antes de la invención de las técnicas recombinantes, la determinación de la estructura primaria de las lectinas avanzó lentamente sin embargo, a finales de década se completaron las secuencias de unas docenas de ellas, todas provenientes de plantas (Sharon y col., 1974).

La Concavalina A fue la primera lectina de la cual se elucidó su estructura (Edelman y col., 1972) seguido por la determinación de la estructura de WGA, así como sus complejos y ligandos (ácido N-acetilneuramínico y oligómeros ligados-b4 N-acetilglucosamina) por Christine Schubert Wright de la Universidad Richmond (Sharon y col., 1974).

La variabilidad de las estructuras primarias de numerosas lectinas promovió la identificación de homologías entre las secuencias de lectinas desde la nomenclatura taxonómica y fuentes de origen (Sharon y col., 1974).

Unas de las estructuras terciarias comunes, observadas en las primeras lectinas de leguminosas hacen referencia a un pliegue que consiste característicamente de un rollo muy flexible y elaborado, derivado de las cadenas antiparalelas- $\beta$  organizadas como dos láminas- $\beta$  (Srinivasan y col., 1996). Estos plegamientos han sido encontrados en las lectinas de leguminosas y en muchas otras lectinas de animales como las pentraxinas (Crennel y col., 1994), ERGIC-53 (Itin y col., 1996; Velloso y col., 2002) así como también en moléculas que no son lectinas, por ejemplo en varias glicosidasas, entre ellas la sialidasa de *Vibrio cholerae* (Sharon y col., 1974).

A finales de los 1980's el uso de la cristalografía en rayos X, la mutagénesis dirigida de los grupos químicos de la lectina sobre carbohidratos y el conocimiento de las interacciones intermoleculares (principalmente puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas) dieron pauta para concluir que el reconocimiento de carbohidratos por las lectinas es de manera muy diversa (Sharon, 2004).

#### 1.2.4 Estructura y clasificación

La familia de las lectinas de leguminosas tiene una secuencia homóloga entre sí, y una amplia variedad de azúcares a los que se unen (Cuadro 1), entre los que se han identificado: Glucosa (Glc), N-Acetilglucosamina (GlcNAc), Manosa (Man), Galactosa (Gal), N-Acetilgalactosamina (GalNAc), Fucosa (Fuc) y algunos otros oligosacáridos, así como las llamadas “de unión al ácido siálico” una familia de monosacáridos no sintetizados por plantas (Reuter y Gabius, 1996).

Cuadro 1. Lectinas de plantas y carbohidratos a los que se unen.

Lectina	Especificidad a azúcar
Concavalina A	$\alpha$ -D-glucopiranososa $\alpha$ -D-manopiranososa
Lectina de lenteja (LcH)	$\alpha$ -D-glucosa $\alpha$ -D-manosa
Aglutinina de loto (Loto A)	$\alpha$ -L-fucosa
Aglutinina de frijol (PHA) (mezcla de isolectinas)	N-acetil-D-galactosamina
Hierba carmín (PWM) (mezcla de 5 isolectinas)	GlcNAc
Aglutininas <i>Europeas Ulex</i>	
Forma I	$\alpha$ -L-fucosa
Forma II	di-N-acetil-D-galactosamina
Ricina	D-galactosa N-acetil-D-galactosamina
Aglutinina <i>Dolichos biflorus</i>	A- ligado N-acetil-D-galactosamina (Sangre del grupo A)

(Modificado de Rüdiger y Hans, 2002).

Las lectinas de unión al ácido siálico satisfacen el requisito de selectividad estereoquímica determinante para GlcNAc, es decir, la presencia ecuatorial de un

grupo N-acetil y un grupo hidroxilo adyacente. Con base en su estructura cuaternaria, las lectinas de leguminosas se agrupan tradicionalmente en dos categorías. Un grupo se compone de las lectinas con subunidades idénticas o casi idénticas, mientras que la otra categoría se caracteriza por diferentes tipos de subunidades. Un pequeño subgrupo de la primera categoría está sujeta a transpeptidaciones (Rüdiger y Hans, 2002).

Las lectinas de una subunidad, son conocidas como lectinas de una cadena, entre las que se encuentran; la lectina del frijol *Phaseolus*, la lectina de soya y la Conavalina A. Por otro lado, se encuentran las lectinas que poseen una doble cadena entre ellas: la lectina proveniente de la subespecie *viceae*, las familias de *Solanaceae*, *Euphorbiaceae* y las lectinas de plantas monocotiledóneas (Cuadro 2).

#### 1.2.5 Fuente de lectinas

De manera general, las semillas son la fuente más rica de lectinas, tal es el caso de Ricina o Con A, sin embargo para las plantas, son los órganos de almacenamiento como las raíces (*Urtica*, *Phytolacca*, *Sambucus*, *Trichosanthes*, *Calystegia*), los tubérculos o bulbos (*Solanum*, *Galanthus*, *Scilla*, *Allium*, *Crocus*, *Tulipa*, *Iris*), la corteza (*Sambucus*, *Sophora*, *Robinia*, *Maackia*, *Laburnum*, *Cytisus*, *Cladrastis*, *Hevea*, *Abies*) o las hojas (*Aloe*, *Lactuca*, *Vicia unijuga*, *Viscum album*) las que pueden proveer una opulenta bandeja de lectinas (Pont y col., 1991).

En las células vegetales, las lectinas se encuentran primordialmente en los cuerpos proteicos. Abundan en proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático (RE) y se transportan a través del aparato de Golgi. El origen y papel de los cuerpos proteicos es el recambio proteico, su contenido principal es de proteínas de reserva (vicilina, legumina y covicilina) y están relacionados con los lisosomas. En las leguminosas tienen una íntima relación con las proteínas (Shutov y col., 1998), en otras plantas las lectinas hidrolasas (glicosidasas, fosfatasas) y fitina contribuyen al almacenamiento de fosfatos (Münz, 1989).

Cuadro 2. Lectinas de cadena sencilla y doble.

Lectina	Fuente natural	Sitio de unión	Características	mg de lectina / 100g de semilla
Lectina de soya (SBA)	Frijol de soya ( <i>Glycine max</i> )	Gal / GalNAc y Glicanos de unión a manosa	Desnaturalizada por cloruro de guanidinio. Lectina de cadena sencilla.	2100
Concanavali na A (ConA)	Semillas de <i>Canavalia ensiformis</i>	Man/Glc	Alto grado de homología con la secuencia de aminoácidos de las lectinas de legumbres. Presenta permutación circular. Lectina de cadena sencilla.	300
Lectinas de leguminosa (subespecie <i>viciaeae</i> )	Semillas de lasubesp. <i>vicia</i> , Familias: <i>Pisuy Lathyrus</i>	<i>Lens culinaris</i> : Man/Glc	Lectinas de doble cadena.	60
Lectinas de <i>Solanaceae</i>	Epidermis de la papa	GlcNAc y sus oligómeros	No están relacionadas con las lectinas de leguminosas.	
Lectinas <i>Euphorbiaceae</i>	Semillas de <i>Euphorbiaceae</i>	Gal	Alta toxicidad, similar a la lectina de plantas	1400
Las lectinas de plantas monocotiledóneas	Raíces del germen de trigo. (Lectina WGA)	N-acetil-glucosamina	Pequeña y resistente al calor. Presenta doble cadena	45

(Rüdiger y Hans, 2002).

Las lectinas de las plantas viajan por la vía secretora intracelular, después de su síntesis en el retículo endoplasmático, terminando en cuerpos proteicos o vacuolas de almacenamiento (Vitale y Chrispeels, 1992).

Hace casi dos décadas, dos lectinas relacionadas a *Dolichos biflorus*; (*Leguminosae*) se detectaron en diferentes sitios. La lectina "clásica" de la semilla depositada en los cuerpos proteicos, y una segunda lectina encontrada en el tallo y las hojas, de manera análoga se presenta en la aglutinina de la papa (Etzler y col., 1984).

Por otra parte, importantes lectinas intracelulares se han encontrado en el citoplasma (Peumans y col., 2000) y el espacio intercelular (Etzler y col., 1984). La cantidad de lectina puede variar notablemente de una especie de planta a otra (Freier y col., 1985).

La diversidad intrafamiliar de las lectinas animales es muy evidente, ya que puede llevar a la expresión de varios caracteres de la familia en una misma célula, por ejemplo para las galectinas. Curiosamente, esta familia de lectinas animales muestra un perfil de plegado similar al de las aglutininas de leguminosas (Kopitz y col., 2001).

#### Lectinas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*)

La fracción de lectina del frijol, *Phaseolus vulgaris*, cuyo estudio es ampliamente conocido, es considerada una fitohemaglutinina (PHA) debido a que proviene de las plantas, la fracción de esta lectina produce mala absorción e irritaciones en el tracto digestivo cuando la fuente que la contiene se consume sin su completa cocción. (Sharon y Lis, 2004).

La estructura de la lectina fitohemaglutinina consiste en dos tipos de subunidades, la identidad de la secuencia en el nivel de aminoácido se debe a los genes ligados en tándem. Las subunidades de este tipo de lectinas son designadas como E y L, las cuales tienen afinidad de unión a los eritrocitos y leucocitos, respectivamente (Reuter y Gabius, 1999).

Estas son sintetizadas en el retículo endoplásmico y ensambladas en forma de tetrámeros al azar, dando origen a las isolectinas. La liberación de la señal de la secuencia del N-terminal es común para PHA y otras proteínas de la vía secretora. Una de las características de esta lectina es que la proteólisis puede ocurrir en el C-terminal, pero de una manera imprecisa, lo que lleva a las llamadas “terminaciones irregulares” sin embargo, ambas subunidades de PHA tienen en común la N-glicosilación (Reuter y Gabius, 1999).

### 1.2.6 Aplicaciones de las lectinas

Las lectinas, son consideradas herramientas indiscutibles en diversos campos, como la biología, la medicina, y la genética. En las plantas desempeñan un papel primordial en la defensa contra patógenos (Xiang y col., 2011), actúan como citotóxicos e impiden la absorción de los nutrientes al liberarse cuando las plantas son consumidas por sus depredadores. Contenidas en las raíces, aglutinan a las bacterias e impiden el crecimiento de las hifas de los hongos (Chrispeels y Raikhel, 1991).

Dentro de las aplicaciones dentro de la medicina, es el uso de las lectinas como tratamiento alternativo a la quimioterapia, las cuales muestran beneficios en contraste a ésta, al ser selectivas con la célula diana y producir una menor severidad en los efectos secundarios, además de ser en forma relativa, de fácil purificación (Michael, 1987).

Es amplio el uso de las lectinas en el campo de la investigación (Cuadro 3). Son utilizadas para la tipificación sanguínea así como la inducción de mutaciones en líneas celulares (Hart, 1980), como marcadores de tinción en diversos tejidos con el fin de evaluar lesiones benignas y malignas a través del cambio de carbohidratos de superficie (Melo y col., 2006), en el aislamiento de polisacáridos y glicoproteínas, identificación de bacterias, células normales y transformadas, la estimulación de linfocitos (Kostrominova, 2011).

### 1.2.7 Lectinas y sistema inmune

En otro aspecto de la medicina, las lectinas han sido objeto de estudio en los últimos años debido a su interesante efecto en el sistema inmune. Algunas actúan como moduladoras en la producción de estirpes linfoides, en su actividad inflamatoria y mitogénica (Reuter y col., 1999).

Cuadro 3. Lectinas y su papel de defensa en las plantas.

Familia de la PHA	PROPIEDAD
PHA- A	Tóxico para aves y mamíferos
PHA –E	Tóxico para aves y mamíferos
$\alpha$ AI	Tóxico para gorgojos
Arcelina	Tóxico para gorgojos
Familia de lectinas con enlace a Quitina	
WGA	Tóxico para los gorgojos, barrenador del maíz europeo y gusano de raíz del maíz del sur
Lectina de arroz	Tóxico para gorgojos
Lectina Datura	Tóxico para gorgojos
Lectina de tomate	Tóxico para gorgojos
Lectina de ortiga	Tóxico para gorgojos, Inhibe los hongos
Heveina	Inhibe los hongos
Quitinasa	Inhibe los hongos

(Sharon y Lis, 2004).

Lectinas como Con A, al ser administradas vía intraperitoneal inducen efectos inflamatorios en el peritoneo (Baintner y col., 2007) en contraste con la galectina-1, la cual produce un efecto apoptótico en células T, herramienta muy útil en el tratamiento de enfermedades de carácter autoinmune como lo es la *miastenia gravis* (Reuter y col., 1999).

Esta lectina induce la expresión de citocinas a nivel de genes y proteínas en las células mononucleares de la sangre periférica, induce la apoptosis en los monocitos THP-1 y los timocitos murinos. A bajas concentraciones, induce la mitogénesis, sin embargo a dosis mayores a 500 ng/mL actúa inhibiendo la producción de neutrófilos (Savoie y col., 2000).

Por otro lado, se ha demostrado que Con A junto a PHA estimulan la producción de IFN en los timocitos cultivados *in vitro* (Reem y col., 1982). Adicionalmente se ha ensayado el efecto de algunas lectinas como PHA-L y PHA-E, Con A y PHA de lenteja sobre la superficie de los linfocitos, demostrando que estimulan la síntesis de DNA en poblaciones de linfocitos humanos, lectinas, que corrobora su actividad mitogénica (Boldt y col., 1975).

### 1.3 Sistema inmune

Ante la necesidad de sobrevivir, el ser humano en su evolución ha desarrollado un complejo sistema de defensa, que le permite reconocer agentes externos y neutralizarlos mediante la modulación de sustancias. Estos mecanismos, pueden ser innatos (reconociendo patrones moleculares muy conservados que son comunes a un grupo o familia de patógenos) y adquiridos (permite el reconocimiento de patógenos con los que no se ha tenido contacto, es específico y evolutivamente más reciente) (Regueiro, 2006).

La inmunidad innata (Cuadro 4) se basa en la activación de una serie de moléculas preformadas (las proteínas del complemento) y de células como los fagocitos (monocitos, macrófagos y neutrófilos) e inflamocitos (mastocitos, basófilos y plaquetas), los cuales poseen receptores innatos para una gran variedad de patógenos (Regueiro, 2006).

Los responsables principales de la inmunidad adaptativa son los leucocitos denominados linfocitos T y B, que cuentan con receptores de reconocimiento del patógeno altamente específicas (denominados TCR y BCR respectivamente) Los linfocitos son capaces de reconocer a los patógenos tanto fuera (linfocitos B) como dentro de las células del organismo (linfocitos T) (Regueiro, 2006).

Para combatir a los patógenos extracelulares, los linfocitos B secretan una forma soluble del receptor de membrana por el cual reconoce al patógeno, que se denomina anticuerpo. Las estructuras de los patógenos reconocidas por los anticuerpos se denominan antígenos. Los anticuerpos no eliminan directamente al patógeno o al antígeno, sino que facilitan su destrucción por los mecanismos de la inmunidad innata (complemento y fagocitos) (Regueiro, 2006).



Cuadro 4. Componentes de la inmunidad innata.

COMPONENTES	FUNCIONES PRINCIPALES
<b>BARRERAS</b>	
Capas epiteliales	Impedir la entrada de microbios
Defensinas/Catelicidina	Destrucción de microbios
Linfocitos intraepiteliales	Destrucción de microbios
<b>CÉLULAS EFECTORAS CIRCULANTES</b>	
Neutrófilos	Fagocitosis y destrucción inicial de microbios
Macrófagos	Fagocitosis y destrucción eficiente de microbio, secreción de citocinas que estimulan la inflamación
Linfocitos NK	Lisis de las células infectadas, activación de los macrófagos
<b>PROTEÍNAS EFECTORAS CIRCULANTES</b>	
Completo	Destrucción de microorganismos , opsonización y activación de leucocitos
Lectina de unión a manosa (Colectina)	Opsonización, activación del complemento (vía de la lectina)
Proteína C reactiva (pentaxina)	Opsonización de los microbios, activación del complemento
<b>CITOCINAS</b>	
TNF, IL-1, quimiocinas	Inflamación
IFN- $\alpha$ , $\beta$	Resistencia a la infección vírica
IFN- $\gamma$	Activación de los macrófagos
IL-12	Producción de IFN- $\gamma$ por los linfocitos NK y T
IL-15	Proloferación de los linfocitos NK
IL-10, TGF- $\beta$	Control de la inflamación
Abreviaturas: IFN, interferón; IL, interleucina; NK, citolítico natural; TGF- $\beta$ , factor transformador de crecimiento - $\beta$ ; TNF, Factor de necrosis tumoral.	

(Regueiro, 2006).

### 1.3.1 Respuesta inflamatoria aguda y crónica.

La inflamación es una respuesta fisiológica de diversos estímulos, como infecciones y lesión tisular. En general la reacción inflamatoria aguda tiene un inicio rápido y dura poco. Suele acompañarse de una respuesta generalizada que se conoce como reacción de fase aguda y se caracteriza por la alteración rápida de las concentraciones de varias proteínas plasmáticas. En algunas enfermedades la activación inmunológica persistente puede ocasionar inflamación crónica, que a menudo tiene consecuencias patológicas (Kuby, 2007).

Dentro de las células involucradas en el proceso inflamatorio se encuentran los macrófagos los cuales arriban al sitio de lesión o en donde se encuentra un agente patógeno 5 a 6h después del comienzo de la reacción inflamatoria. Estos

macrófagos son células activadas que muestran incremento de la fagocitosis y de la liberación de mediadores y citocinas que contribuyen a la inflamación.

Los macrófagos tisulares secretan tres citocinas (IL-1, IL-6, y TNF- $\alpha$ ) que inducen a muchos cambios locales y generales durante la reacción inflamatoria. Tanto TNF- $\alpha$  como IL-1 inducen el aumento de la expresión de moléculas de adhesión sobre las células endoteliales, además TNF- $\alpha$  y INF- $\gamma$  activan a los macrófagos y neutrófilos y promueven su actividad fagocítica y un incremento de las enzimas líticas hacia los espacios tisulares (Kuby, 2007)

La reacción inflamatoria local se acompaña de una respuesta sistémica o general conocida como reacción de fase aguda. Muchos efectos generales de la fase aguda se deben a la acción combinada de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Este último también actúa sobre células endoteliales vasculares y los macrófagos para promover la secreción de los factores estimulantes de colonias (M-CSF, G-CSF y GM-CSF). Estos CSF estimulan la hematopoyesis y por tanto causan aumentos transitorios de la producción de leucocitos necesarios para combatir la infección (Kuby, 2007).

Dos citocinas en particular, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , desempeñan un papel central en el desarrollo de la inflamación crónica. Las células T<sub>H1</sub>, NK y T<sub>C</sub> liberan INF- $\gamma$ , en tanto que los macrófagos activados secretan TNF- $\alpha$ . Los leucocitos producen; el INF- $\alpha$ , el INF- $\beta$  lo elaboran sobre todo los fibroblastos y por este motivo con frecuencia se le denomina interferón de fibroblastos. Sólo las células T y NK producen INF- $\gamma$ . Sin embargo, el INF- $\gamma$  tiene diversas actividades que lo diferencian de los otros interferones, como lo es su capacidad para activar los macrófagos. En su estado activado, los macrófagos muestran aumento en la expresión de moléculas MHC clase II, mayor producción de citocinas e incremento de la actividad microbicida, lo cual los hace más eficaces en la presentación de antígeno y la muerte de los patógenos intracelulares (Kuby, 2007).

### 1.3.2 Células y tejidos del sistema inmune adaptativo

Las células que participan en la inmunidad adaptativa son los linfocitos específicos frente a antígenos. Son las únicas células del cuerpo capaces de reconocer diversos determinantes antigénicos y distinguirlos específicamente (Cuadro 5) por lo que confieren las características de la respuesta inmunitaria adaptativa, su especificidad y memoria. Su disminución produce inmunodeficiencias congénitas y adquiridas, así como el descenso de los linfocitos producido por fármacos, irradiación y anticuerpos dirigidos, lo que da lugar a una alteración de las respuestas inmunitarias adaptativas. En contraste, la estimulación de los linfocitos por los antígenos en un cultivo origina respuestas *in vitro* que manifiestan muchas de las características propias de una respuesta inmunitaria inducida *in vivo* bajo condiciones fisiológicas (Abbas, 2008).

Cuadro 5. Marcadores linfocitarios.

COMPONENTES	FUNCIONES PRINCIPALES
<b>BARRERAS</b>	
Capas epiteliales	Impedir la entrada de microbios
Defensinas/Catelicidina	Destrucción de microbios
Linfocitos intraepiteliales	Destrucción de microbios
<b>CÉLULAS EFECTORAS CIRCULANTES</b>	
Neutrófilos	Fagocitosis y destrucción inicial de microbios
Macrófagos	Fagocitosis y destrucción eficiente de microbio, secreción de citocinas que estimulan la inflamación
Linfocitos NK	Lisis de las células infectadas, activación de los macrófagos
<b>PROTEÍNAS EFECTORAS CIRCULANTES</b>	
Completo	Destrucción de microorganismos, opsonización y activación de leucocitos
Lectina de unión a manosa (Colectina)	Opsonización, activación del complemento (vía de la lectina)
Proteína C reactiva (pentaxina)	Opsonización de los microbios, activación del complemento
<b>CITOCINAS</b>	
TNF, IL-1, quimiocinas	Inflamación
IFN- $\alpha$ , $\beta$	Resistencia a la infección vírica
IFN- $\gamma$	Activación de los macrófagos
IL-12	Producción de IFN- $\gamma$ por los linfocitos NK y T
IL-15	Proloferación de los linfocitos NK
IL-10, TGF- $\beta$	Control de la inflamación
Abreviaturas: IFN, interferón; IL, interleucina; NK, citolítico natural; TGF- $\beta$ , factor transformador de crecimiento - $\beta$ ; TNF, Factor de necrosis tumoral.	

(Abbas, 2008)

La respuesta inmune adaptativa se lleva a cabo en órganos ó tejidos específicos denominados linfoides. Existen dos tipos de órganos linfoides: primarios (médula ósea y timo) donde los linfocitos adquieren la capacidad de reconocer antígenos (mediante el TCR y el BCR) y secundarios (bazo, ganglio linfático y el tejido linfoide asociado a mucosas o MALT) (Regueiro, 2006).

### 1.3.3 Medula ósea

La médula ósea es el órgano linfoide más largo del cuerpo humano y con mayor actividad hematopoyética. Es importante como órgano linfoide primario y secundario, da origen al abanico de linfocitos B y es el lugar donde se sintetizan los anticuerpos, además de encontrarse en ella: linfocitos T maduros, células secretoras de anticuerpos (también nominadas células plasmáticas) y células presentadoras de antígenos (Regueiro, 2006; Travlos, 2006).

Está formada por islotes de células hematopoyéticas situadas en el interior de los huesos. Todas las células del sistema inmunitario se originan a partir de las células hematopoyéticas pluripotenciales de la médula ósea a través de los linajes mieloide y linfoide. Durante la edad fetal estas funciones también son realizadas por el hígado, que abandona esta actividad después del nacimiento. Los precursores de los distintos tipos celulares producidos en la médula ósea migran hacia otros órganos donde sufren posteriores procesos de diferenciación para convertirse en células plenamente funcionales para aumentar la posibilidad de que encuentren a su antígeno específico, los linfocitos pasan su vida recirculando por los diferentes órganos linfoides secundarios (Regueiro, 2006).

Dado que el sistema hematopoyético es un órgano blanco potencial de exposición a sustancias químicas, la evaluación de la sangre y la médula ósea son importantes en los estudios de toxicidad o seguridad. Como parte de la evaluación del sistema hematopoyético, la evaluación morfológica de secciones del tejido provee información sobre su estructura (celularidad, linajes celulares, alteraciones

vasculares o estromales, inflamación, necrosis); la estimación de las reservas de hierro y la identificación de otras características (como por ejemplo pigmentos, agentes infecciosos, desordenes proliferativos o neoplásicos). Junto al hemograma y el examen histológico, aportan información sobre el sistema hematopoyético que no podría adquirirse con el simple análisis de la sangre periférica (Travlos, 2006).

La respuesta de la exposición a sustancias químicas o sus metabolitos ocurren de forma directa en tejidos hematopoyéticos o indirectamente a través de las lesiones a otros órganos, sistemas o rutas metabólicas. Los efectos a la médula ósea se reflejan en lesiones que pueden ser observadas en secciones de tejido embebidas en parafina (Travlos, 2006).

El aumento en las células nucleadas en los cortes de médula ósea indican mayor demanda de células, y es la mejor evidencia del incremento del linaje hematopoyético, sin embargo la identificación de células linfoides no es posible en preparaciones teñidas con Hematoxilina y Eosina (H&E) (Travlos, 2006).

Los incrementos en las células hematopoyéticas (también referido como hiper celularidad, hiperplasia hematopoyética o células hematopoyéticas proliferativas) son diagnosticados mediante una estimación del porcentaje, de la médula ósea roja respecto a la amarilla en las cavidades o trabéculas medulares y a su vez comparando éstas con los controles. En roedores, si la hiperplasia es significativa, las células pueden ocupar la mayoría de los espacios trabeculares. En perros adultos, la hiperplasia puede considerarse que ocupa hasta un 75% del espacio trabecular. El aumento en la celularidad puede contemplar una línea celular específica o todas las líneas celulares (panhiperplasia) (Travlos, 2006).

Algunos elementos de la médula ósea que pueden utilizarse como referencia son los mastocitos y megacariocitos, los cuales pueden tener un incremento en su número, sin embargo el aumento también ha sido observado en secciones de médula ósea de hueso en ratas viejas. También se ha observado en ratas la emperipolesis de neutrófilos dentro de megacariocitos y ha sido asociado con la

administración de factores de crecimiento de células hematopoyéticas o hiperplasia de células hematopoyéticas, relacionada a una inflamación crónica (Travlos, 2006).

Una preparación de médula ósea suele ser necesaria para realizar observaciones sobre la sincronía de la maduración ya que las secciones histológicas no proveen evidencia del linaje afectado. En la mayoría de las especies, el aumento en la hiperplasia sugiere una respuesta a una anemia. Hay incremento en las células de la médula que no afectan la sincronía y maduración. En roedores, la hiperplasia eritroide puede o no ser evidente en los cortes histológicos de la médula ósea (Travlos, 2006).

Por otra parte, el incremento de los linfocitos es complicado de identificar en la médula de hueso desde secciones histológicas teñidas con H&E, excepto en casos de linfomas, sin embargo los cambios en los linfocitos pueden identificarse con una tinción de Romanowsky en frotis. El efecto contrario, es decir la disminución de células nucleadas o denominadas también hipocelularidad, hipoplasia, o atropía puede verse reflejada en la médula ósea, como una disminución en la hematopoyesis en general (panhipoplasia) o en líneas celulares específicas. No obstante morfológicamente las secciones de médula ósea pueden parecer hipocelulares dependiendo de los diferentes estados de maduración (Figura 2) (Travlos, 2006).

En perros se considera que existe hipocelularidad cuando los espacios trabeculares contienen menos del 25% de médula ósea roja. La panhipoplasia en médula ósea ha sido caracterizada en sangre periférica por la pancitopenia y el reemplazo de tejido hematopoyético con tejido adiposo en las cavidades de la médula (Travlos, 2006).

Adicionalmente, las secciones de médula ósea aparecen como normales o hipercelulares para casos en los que una sola línea celular es afectada, las células hematopoyéticas deberían disminuir, indicando la línea involucrada. Adicionalmente, suele presentarse el asincronismo de maduración favoreciendo los

estadios tardíos del desarrollo celular así como hipoploidia megacariocítica. Nuevamente, mientras la histología aporta evidencia de un efecto generalizado, frotis sanguíneos son convenientes para complementar el análisis (Travlos, 2006).

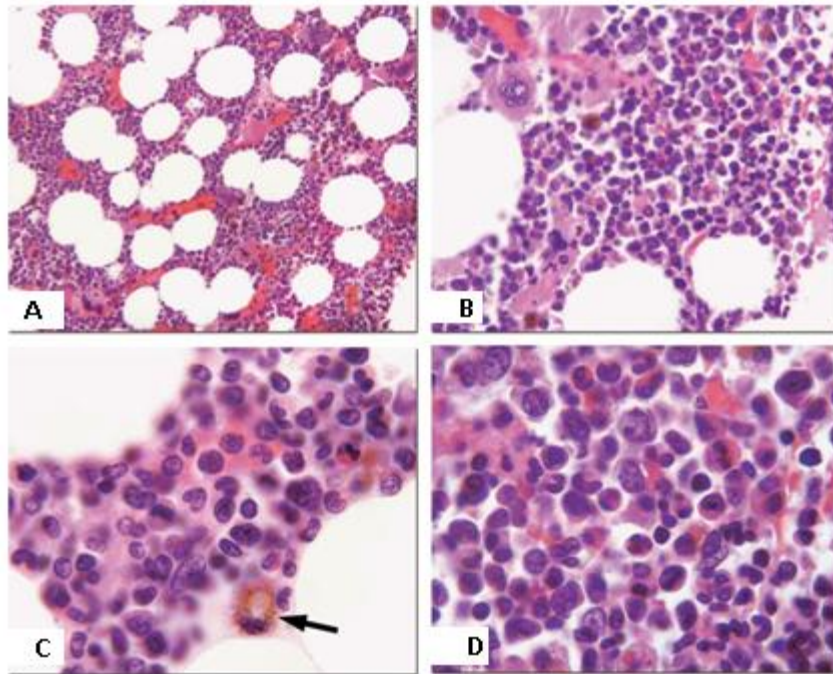


Figura 2. Diferentes aumentos en la médula ósea de un perro de 14 años de edad. Se observa una deficiencia de la línea eritroide, predominando maduros e inmaduras células mieloides incluyendo eosinófilos y megacariocitos (A y B) y un macrófago que contiene hemosiderina (Flecha) Figura C, la celularidad cambiará de acuerdo al estado de madurez de la médula ósea (Travlos, 2006).

En anemia relacionada con la inflamación crónica el patrón celular y la morfología de la médula es frecuentemente normal, pero hay algunos incrementos de hierro en contenido en los macrófagos (hemosiderina) observado en la tinción de H&E, o gránulos azules con la tinción de azul de Prusia (Travlos, 2006).

La desnutrición produce una disminución de la hematopoyesis y la celularidad de la médula ósea con un incremento de la médula amarilla (Travlos, 2006).

La dieta se considera un factor de variación en la generación de nuevas células, (Figura 3). Por ejemplo una restricción en la dieta suficiente para detener la

ganancia de peso en ratas jóvenes disminuyó en un 50%, 40% y 20% los precursores eritrocitarios, mieloides y megacariocíticos respectivamente. En otros estudios, con una restricción de leve (75% respecto al control) a moderada (50% respecto al control) en la dieta, se observó una disminución en el tejido hematopoyético con un incremento de la médula amarilla. Este tipo de estudios sin embargo, no proveen información de cambios en los linajes linfoides (Travlos, 2006).

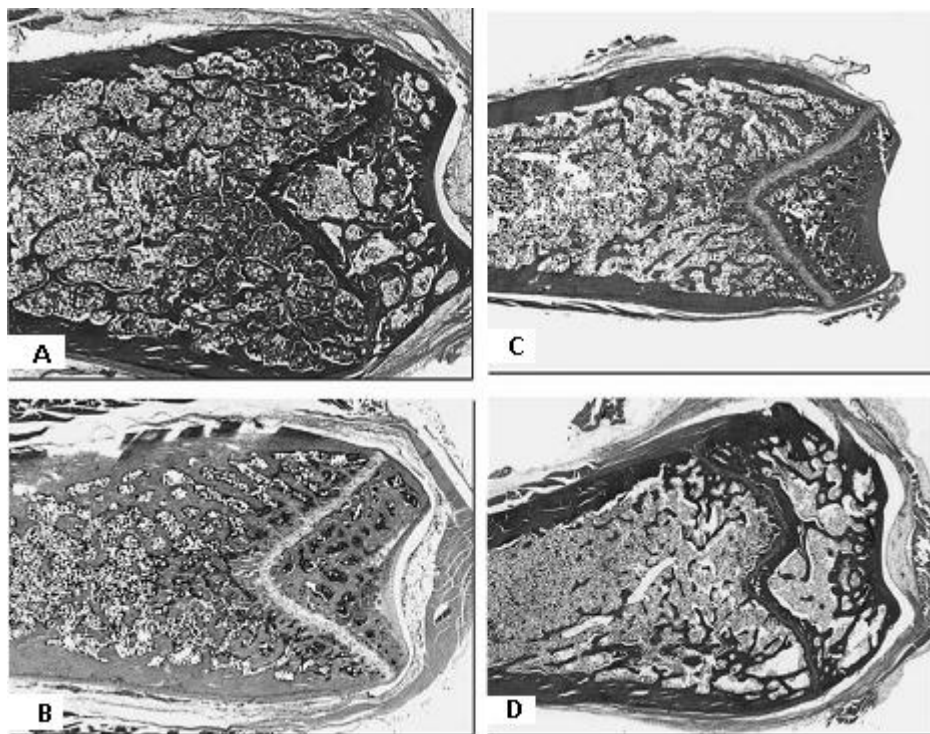


Figura 3. Cortes histológicos longitudinales de fémur de rata. Puede notarse la variación en la celularidad de la médula ósea después de dos años con diferentes tratamientos en ratas hembra F344 (A y B) y después de un estudio de toxicidad crónico en ratas Sprague-Dawley (C y D) (Travlos, 2006).

#### 1.3.4 Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

PCNA es una proteína de 29kDa que ha sido llamada el anillo maestro del genoma, puesto que se ha demostrado que participa activamente en numerosas rutas



moleculares responsables de la vida y muerte de células en mamíferos (Malkas y col., 2006).

Fue caracterizado originalmente como una abrazadera del DNA para la acción de la DNA polimerasa y como componente esencial del replisoma eucariótico del DNA cromosomal. Estudios posteriores demostraron su capacidad de interactuar en diferentes rutas metabólicas asociadas incluyendo: el procesamiento de fragmentos de Okazaki, reparación de DNA, síntesis de DNA, metilación del DNA, reacomodo de la cromatina y regulación del ciclo celular (Maga y Hübscher, 2003).

#### 1.3.4.1 PCNA en la replicación de DNA

La identificación del PCNA como un factor de replicación de las DNA polimerasas toma lugar en el corazón de los replisomas. Otros trabajos han revelado un rol adicional para esta proteína en coordinación a una red compleja de interacciones en la horquilla de replicación (Maga y Hübscher, 2003).

Como consecuencia de la interacción con PCNA, varias enzimas muestran un incremento en su eficiencia catalítica. Es interesante como la mayoría de estas enzimas reconocen estructuras específicas en el DNA o tienen una especificidad limitada en la secuencia de DNA (Maga y Hübscher, 2003). Una posibilidad intrigante es que las proteínas que tienen bajas secuencias específicas usan PCNA como un adaptador que facilita la interacción con sustratos de DNA (Maga y Hübscher, 2003).

#### 1.3.4.2 Usos del PCNA

PCNA se ha utilizado para evaluar el crecimiento moderado y acelerado, así como recuperación de células. Se ha utilizado por ejemplo; como marcador en el reconocimiento de la metástasis en cáncer de mama (Malkas y col., 2006), en plantas se utiliza para monitorear durante el tiempo de germinación, antes y durante el ciclo y renaudación de las células embrionales (Citterio y col., 1992).

Otro de sus usos es la identificación de melanomas en fase de crecimiento, así como evaluar la recuperación de los cementoblastos en las raíces de los dientes después de algún trauma dental (Ebensberger y col., 2002).

## **2. HIPÓTESIS**

La fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari tiene un efecto estimulante sobre la proliferación de células precursoras en la médula ósea.

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1 General

Determinar el efecto de la fracción concentrada de lectina (FCL) del frijol Tépari sobre la proliferación en los centros germinales y celularidad en general en la médula ósea de ratas.

#### 3.2 Específicos

- Determinar cambios histológicos, en los grupos tratados con la FCL.
- Evaluar la proliferación hematopoyética de los animales tratados con FCL.
- Determinar los cambios en la distribución de PCNA para evaluar la proliferación en médula ósea.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales

Los tejidos se obtuvieron de 14 ratas macho Sprague Dawley sanas de 14 semanas de edad. Las ratas se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Naturales de la U.A.Q, en fotoperiodos de 12h luz y 12 de oscuridad y tuvieron acceso a alimento y agua comercial *ad libitum*. El proyecto fue previamente revisado y autorizado por el comité de Bioética de la FM-UAQ.

La fracción concentrada de lectinas; purificada por el colaborador del proyecto el Dr. Alejandro Blanco Labra (Laboratorio de Mecanismos de Defensa de Plantas del CINVESTAV Unidad Irapuato), se resuspendió en solución salina y se administró mediante una cánula intragástrica a las ratas cada tercer día durante 6 semanas a dosis de 50 mg de lectina/Kg de peso de rata y 25 mg de lectina/Kg de peso de rata y durante 4 semanas a dosis 50 de mg de lectina/Kg de peso de rata.

Los animales se sacrificaron a las 4 y 6 semanas de tratamiento por decapitación sin utilizar anestesia (con fin de evitar la alteración de los componentes séricos), siguiendo los lineamientos establecidos en la NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”, así como todos los residuos biológicos se trataron de la forma correspondiente. Se obtuvo la sangre en tubos sin anticoagulante la cual se centrifugó durante 5 min a 3,000 rpm para obtener el suero el cual fue almacenado a -80° C hasta su uso. Durante la necropsia se disecaron los tejidos de interés.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Preparación de las muestras.

Los tejidos (fémur y vértebra) se extrajeron mediante disección; se lavaron con solución salina isotónica (0.9% NaCl) a 4°C, y se fijaron en paraformaldehído (al 4% en amortiguador de fosfatos (PBS) durante 48 h. Los tejidos se decalcificaron

por quelación de ácido ( $\text{HNO}_3$  al 10%) y se deshidrataron en un gradiente de etanol, para finalmente incluirse en parafina. De los bloques de tejidos se obtuvieron cortes (4-6 $\mu\text{m}$  de grosor) que se utilizaron para el análisis histológico con la tinción con H&E así como el estudio inmunohistoquímico (IHQ).

#### 4.2.2 Tinción con hematoxilina y eosina

Las secciones de tejido se rehidrataron gradualmente en soluciones seriadas de etanol (absoluto, 2x 5 min; 96% 2x 5 min; 70%, 5 min; 50%, 5 min; agua desionizada, 5 min), y se equilibraron en agua (1min). Las laminillas se incubaron con la hematoxilina de Harris (0.5% de hematoxilina (Merk, Darmstadt, Germany) en etanol absoluto al 5%), sulfato de aluminio potásico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 0.25% de óxido de mercurio (II) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) por 3 min, se lavaron en agitación con agua durante un minuto y se pasaron rápidamente a través de alcohol acidificado (HCl al 1% en alcohol al 70%). Se lavaron en agua durante 1 min y se sumergieron cinco veces en agua amoniacal (0.1% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  en agua desionizada) posteriormente se enjuagaron en agua destilada durante 1 min. Las laminillas se incubaron en eosina Y (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) (0.25% en alcohol acidificado al 60%) por 15 s, y se enjuagaron con agua se deshidrataron en un gradiente de etanol (70%, 96% 3x, 100% 3x). Posteriormente se sumergieron en dos baños de xilol (3 veces) y se montaron permanentemente utilizando Entellan [Merk].

#### 4.2.3 Inmunohistoquímica

Las secciones de tejido de médula ósea (MO) de fémur y vértebra se rehidrataron comenzando con xilol (3 veces por 5 min) y posteriormente por un gradiente de soluciones de etanol (etanol absoluto, 5min 3x; al 96% 2x 5 min; 70% 5 min; 50% 5 min) hasta llegar en agua durante 5 min. Se procedió al desmascaramiento de epítopes empleando una solución de citratos pH 6.0 por 20 min, seguido a una solución de citratos (20 min) precalentada a ebullición en baño María. Posteriormente las laminillas se incubaron con una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% en TBS-

Metanol durante 1 h con el fin de eliminar la peroxidasa endógena. Las laminillas se equilibraron posteriormente con amortiguador salino de Tris (TBS) pH 7.6 durante 5 min. Se prosiguió con el bloqueo para el cual se incubaron las laminillas durante 1 h con una solución al 5% de leche descremada en TBS en una cámara húmeda, seguido de un lavado con una solución al 0.1% de Tritón X-100 en TBS (TBST) 3 veces durante 10 min cada vez.

Los tejidos se incubaron durante toda la noche con un anticuerpo monoclonal generado en ratón, dirigido contra el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, catálogo 05-347) en una dilución 1:200 en leche al 1% en TBS. Posteriormente se lavaron con TBST durante 10 min, seguido de 3 lavados (10 min cada uno) de TBST sobre la cámara húmeda. Los tejidos lavados se incubaron con IgG-anti ratón generado en cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz Biotechnology, catálogo sc-6247) en una dilución de 1:500 en leche al 1% en TBS durante 2 h a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se realizaron lavados con TBST (3x 15 min) y después con TBS (3x 15 min). Se procedió a revelar las laminillas utilizando una solución de diaminobencidina (DAB) al 3% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.13% (v/v) posteriormente se realizaron lavados con TBS (5min x3). Finalmente se realizó la deshidratación de los tejidos con un gradiente de agua, etanol (50 al 100%) y xilol para su montaje y preservación.

Análisis de imagen.

Para los cortes histológicos, se realizó una relación de las áreas de médula ósea roja y amarilla utilizando el microscopio Olympus U-CMAD3 U-TV1X-2. El análisis se realizó con el software IP-lab (Image Pro Plus, Media Cybernetics). Todas las ratas se analizaron y se tomaron microfotografías representativas de cada grupo para realizar el análisis histológico de acuerdo al método de Travlos (2006).

Análisis estadístico

Para determinar las diferencias entre tratamientos a diferentes dosis se compararon las medias mediante ANOVA por el método de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 4.3 Diseño experimental

Definición de variables y unidades de medida.

- Administración aguda (4 semanas de tratamiento).
- Administración subcrónica (6 semanas de tratamiento).
- Fracción concentrada de lectina.
- Proliferación celular y cambios histológicos en médula ósea de fémur y vértebra.

Criterios de inclusión.

- Ratas Sprague Dawley macho de 14 semanas de edad.

Criterios de exclusión.

- Ratas que presenten alguna patología antes del experimento.

Criterios de eliminación.

- Ratas que mueran antes de concluir el tratamiento otra índole a la de interés.
- Ratas que presenten patologías durante el experimento.

Definición de los grupos.

- Se formaron 2 grupos de acuerdo a los criterios anteriores (Figura 4).





### Administración aguda

- 3 Ratas tratadas durante **4 semanas** con la fracción concentrada de lectinas a una dosis de 50 mg/kg de peso de la rata, administrada cada tercer día
- 2 Ratas control, (Se administró agua inyectable).



### Administración subcrónica

- 3 Ratas tratadas con lectina a 50mg/kg de peso de rata durante **seis semanas** cada tercer día.
- 2 Ratas control (Se administró agua inyectable).
- 3 Ratas tratadas con lectina a 25 mg/kg durante seis semanas cada tercer día.

Figura 4. Administración de fracción de lectina y tiempos de exposición.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Control del peso

En estudios previos se observó que en la administración de FCL a una concentración de 50 mg/kg de peso provoca una disminución tanto en el consumo de alimento como en el peso corporal de los animales. Dicho efecto se observó en las primeras semanas de tratamiento, pero al final del mismo se recuperó parcialmente el peso de los animales (Fig. 5). Cabe mencionar que la merma en peso corporal no afectó metabólicamente a los animales; los marcadores de daño hepático, renal y pancreático así como el peso y morfología de los órganos no muestran alteraciones, por lo que se descartan daños a nivel sistémico (García, 2011; Reyes, 2011).

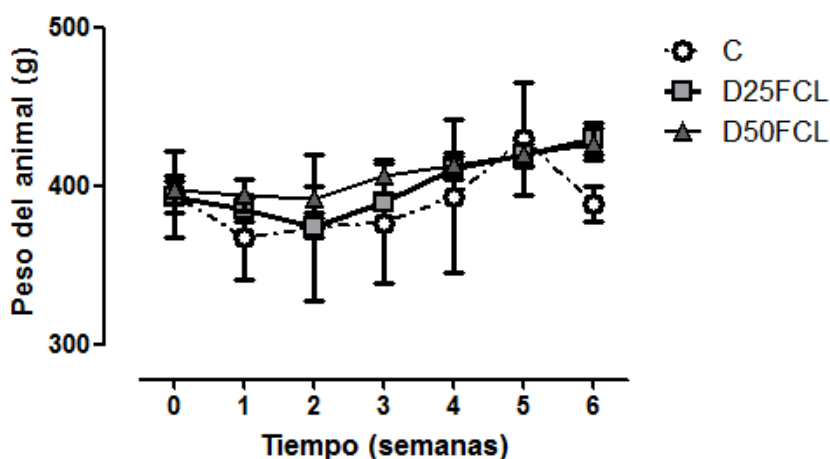


Figura 5. Evaluación del peso de las ratas tratadas con la fracción de lectinas. Peso del animal registrado semanalmente. Se calculó la media  $\pm$  error estándar y mediante ANOVA se hizo la comparación de muestras (Reyes, 2011).

## 5.2 Análisis histológico.

Se realizaron cortes seriados de los tejidos, con el fin de obtener laminillas con la mayor cantidad posible de tejido a analizar y en las mejores condiciones. Hecha la tinción con H&E se procedió a realizar un recuento de megacariocitos, así como comparación de la celularidad en los espacios trabeculares. Se buscaron anomalías óseas, presencia de células plasmáticas, neutrofilia, macrófagos con hemosiderina, en el tejido adiposo del control y se comparó con los tejidos tratados con las distintas dosis de FCL.

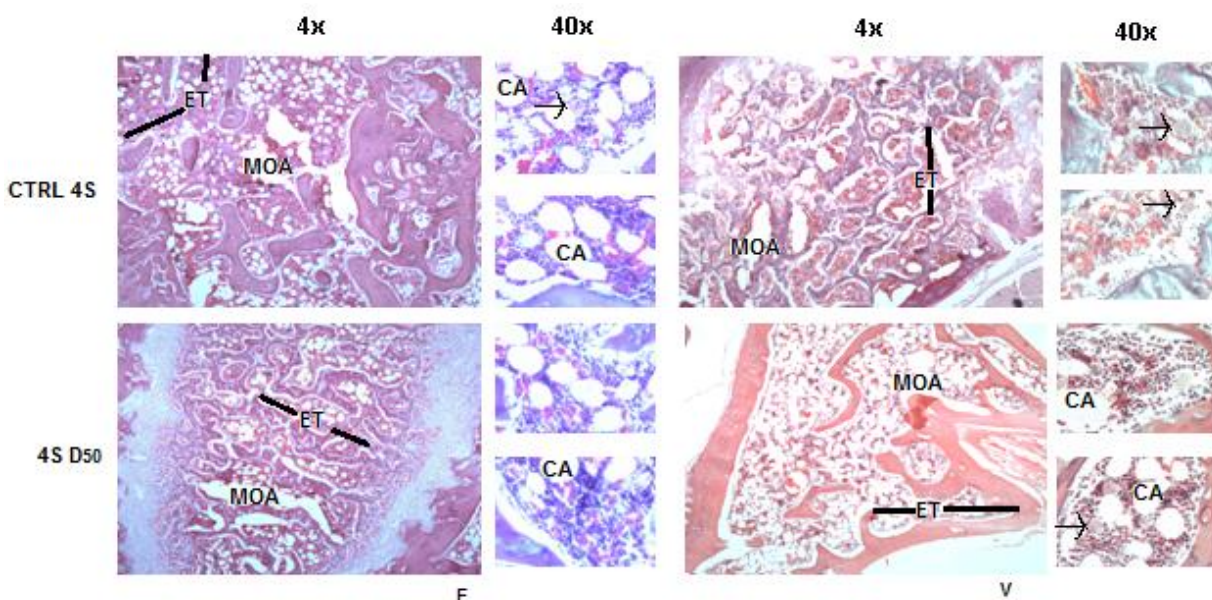


Figura 6. Evaluación de cambios histológicos con los tratamientos de fracción concentrada de lectina en médula ósea de vértebra y fémur a las cuatro semanas de tratamiento. Las secciones de tejido de médula ósea fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). Las imágenes representativas del control a las 4 semanas (Ctrl 4S), y del tratamiento a una dosis de 50 mg/kg de peso (D50), señalan en las imágenes la médula ósea amarilla (MOA), encontrada como células adiposas (CA), así como la celularidad contenida en los espacios trabeculares (ET) y las células megacariocíticas (flechas) para cada caso tanto en vértebra (v) como fémur (f).

Puede observarse en la Figura 6, que para los cortes representativos de fémur a las 4 semanas de tratamiento, donde no hay una tendencia clara que señale un aumento o disminución en la celularidad, los espacios trabeculares son muy

similares en tamaño, así como en la proporción de médula ósea amarilla y roja. Por otro lado, para los cortes realizados en vértebra, con este mismo tratamiento, la médula ósea roja se ve disminuida, los espacios trabeculares son más grandes, así como las células adiposas. Lo anterior sugiere actividad antiproliferativa de la FCL y la descripción es similar para el tratamiento a las 6 semanas (Figura 7).

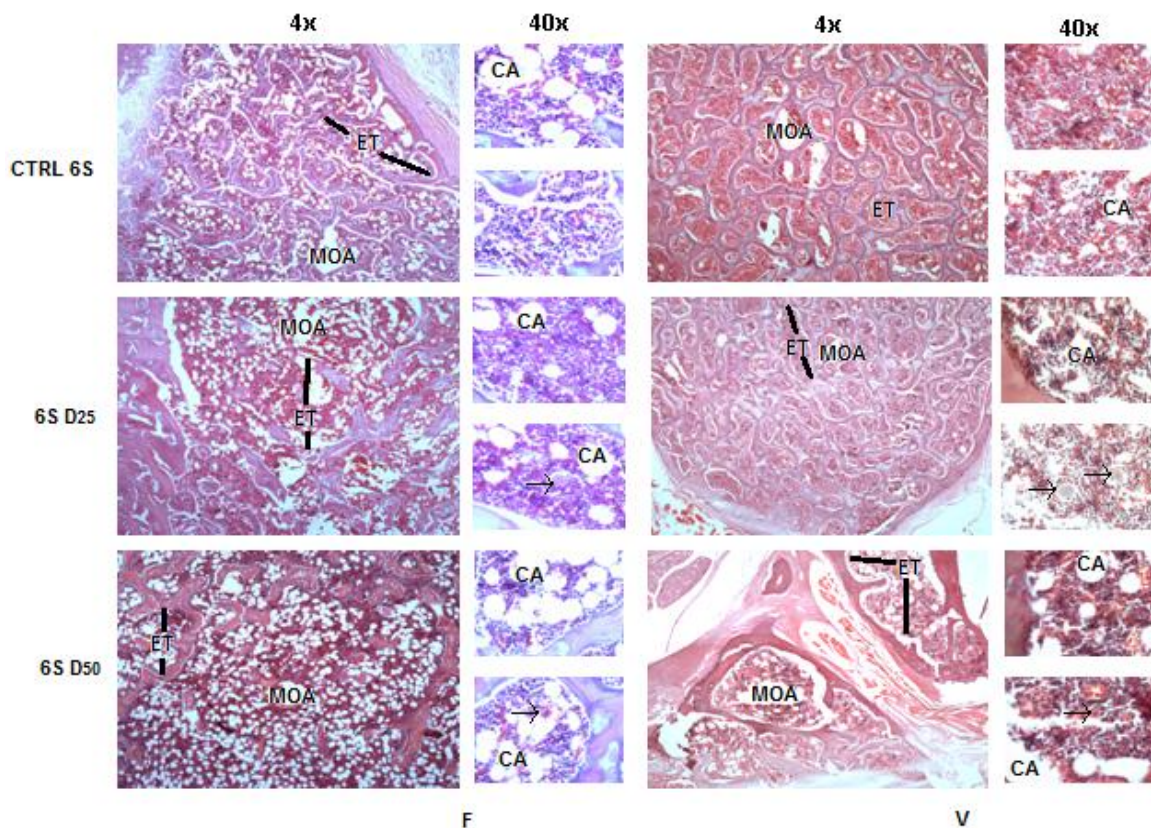


Figura 7. Evaluación de cambios histológicos con los tratamientos de fracción concentrada de lectina en médula ósea de vértebra y fémur las 6 semanas de tratamiento. Las secciones de tejido de médula ósea fueron teñidas con Hematoxilina y Eosina (H&E). Estas son imágenes representativas del control a las 6 semanas (Ctrl 4S), y de los tratamientos a una dosis de 25 mg/kg de peso (D25) y a 50 mg/kg de peso (D50), señalándose en las imágenes la médula ósea amarilla (MOA), encontrada como células adiposas (CA), así como la celularidad contenida en los espacios trabeculares (ET) y las células megacariocíticas (flechas) para cada caso tanto en vértebra (v) como fémur (f).



### 5.3 Recuento de megacariocitos

Se realizó un recuento de megacariocitos, en el que se tomaron al menos cuatro espacios trabeculares para médula ósea de fémur (Figura 8) y de vértebra (Figura 9) de los tratamientos con diferentes dosis de lectina. Posteriormente se procedió a realizar un análisis para determinar si había diferencias significativas entre tratamientos. Se compararon las medias mediante ANOVA por el método de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

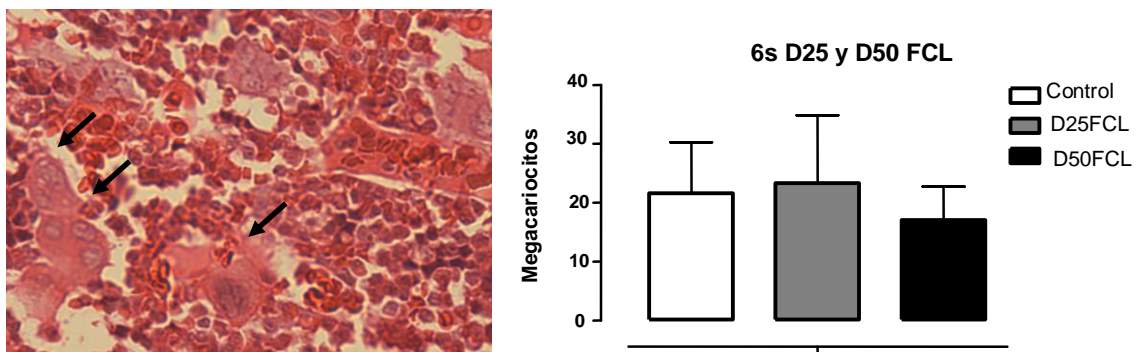


Figura 8. Análisis de megacariocitos en médula ósea de fémur de rata. Recuento de megacariocitos (Izquierda, señalados con flechas los cuales tienen apariencia irregular y en su interior de tres a cinco núcleos basófilos) a dosis D25 y D50 de fracción de lectina utilizada (FCL).

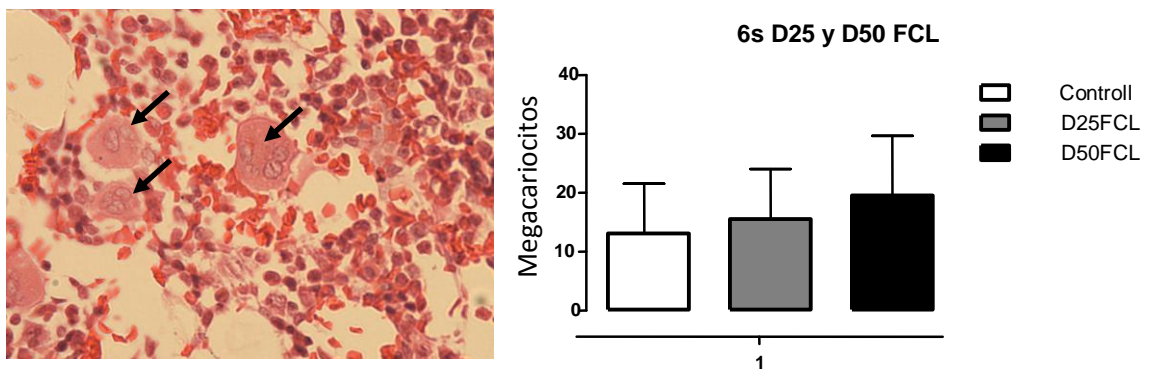


Figura 9. Análisis de megacariocitos en médula ósea en vértebra de rata. Recuento de megacariocitos (Izquierda, señalados con flechas los cuales tienen apariencia y tamaño irregulares y en su interior de tres a cinco núcleos ligeramente basófilos) a dosis D25 y D50 de fracción de lectina utilizada (FCL).

En la figura 9 se observan cambios en el recuento de megacariocitos. Para la médula ósea de fémur se observó un ligero aumento de la celularidad a dosis menores (D25) que disminuyó con el aumento de la concentración de la fracción de lectina (D50), en comparación con la médula ósea de vértebra, en la cual siempre se observó un aumento de celularidad megacariocítica al aumentar la concentración de la fracción concentrada de lectina (D50) sin embargo, en ninguno de los dos casos se obtuvo una diferencia significativa.

#### 5.4 Inmunohistoquímica

Se tomaron dos laminillas con tejidos que presentaban una mayor proporción de médula ósea roja, tanto para fémur como para vértebra (con base en la histología), de las dos dosis empleadas de la FCL (25 mg/Kg y 50 mg/Kg de peso) y se incubaron con el anticuerpo contra PCNA, como se describe en materiales y métodos. Posteriormente se realizó una composición fotográfica comparando las mismas zonas en la tinción de H&E, así como con los respectivos controles (Figura 10 y 11). No se observó evidencia significativa de efecto proliferativo de las células de la médula ósea en vértebra o en fémur, sino solamente una tendencia en fémur.

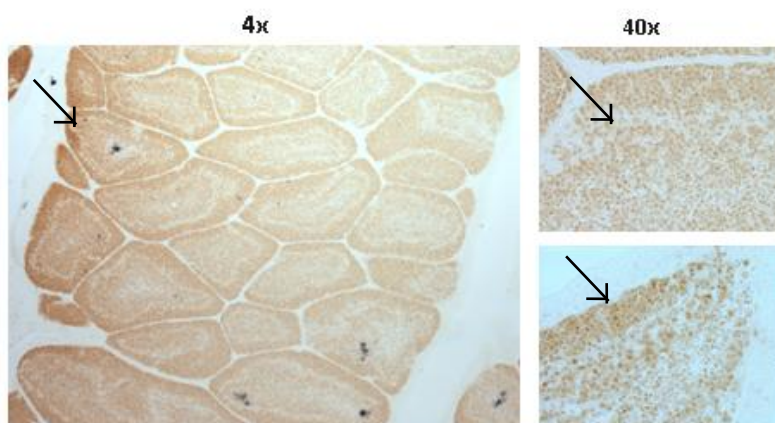


Figura 10. Control positivo de la Inmunohistoquímica para PCNA. La coloración café (flechas) del tejido indica la presencia del PCNA, como control positivo se empleó bolsa de Fabricio, tejido con elevada tasa de proliferación de células B. Amplificación 4x y 40x.

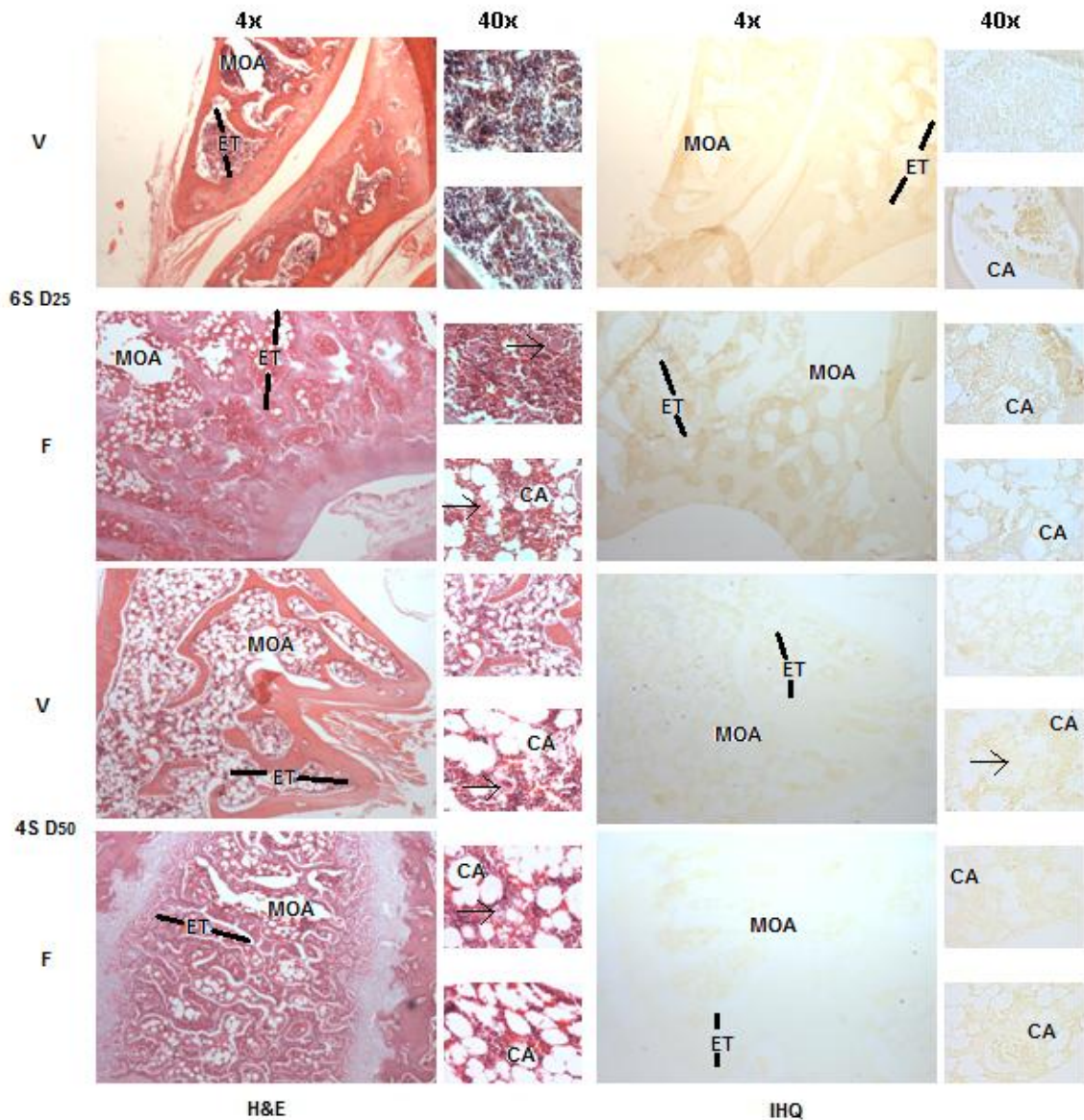


Figura 11. Cambios histológicos en la médula ósea de fémur y vértebra con tinciones de Hematoxilina y Eosina (H&E) e Inmunohistoquímica (IHQ). Para determinar a proliferación celular se utilizó el Antígeno de Proliferación Nuclear Celular (PCNA) y un anticuerpo policlonal secundario dirigido contra ratón, marcado con peroxidasa de rábano picante. Estas imágenes son representativas a los tratamientos de 6 semanas con una dosis de 25 mg/kg de peso (D25) y 4 semanas a una dosis de 50 mg/kg de peso (D50), en las cuales se muestran zonas de interés como lo es la médula ósea amarilla (MOA) que incluye células adiposas (CA), así como los megacariocitos (flechas) formando parte de la médula ósea roja. Amplificación 4x y 40x.

## 6. DISCUSIÓN

### Control del peso

El peso se mantuvo con diferencias mínimas durante la administración de la fracción concentrada de lectinas (FCL) a las dosis ensayadas (25 mg/kg de peso y 50 mg/kg de peso) así como para los diferentes tiempos de exposición (cuatro y seis semanas), descartando algún efecto anti nutricio. Dicho efecto se manifiesta en fracciones semipuras de la lectina del frijol Tépari, debido a la presencia de algunos inhibidores de tripsina, así como las hemaglutininas que estas contienen y que le confieren toxicidad a dosis superiores a los 200mg/kg de peso (Osman y col., 2003). Además en experimentos realizados por el grupo de trabajo, se observó que a un tiempo mayor de exposición la lectina proveniente del frijol Tépari genera una disminución del consumo de alimento y peso corporal (14 semanas de dieta), el cual se recupera sin que haya diferencia significativa al final del experimento (García y col., 2010).

### Análisis histológico.

En primera instancia, se esperaba que la FCL generara un tipo de respuesta antigénica que se revelara en la histología, en un órgano tan sensible a la exposición de sustancias tóxicas como lo es la médula ósea, mostrándose ya sea en un linaje en particular o en una respuesta global.

Se realizó un recuento de megacariocitos los cuales son las primeras células que señalan una degeneración vascular (relacionada con trombosis) y por consecuencia generan en la médula ósea una interrupción en la producción de la celularidad. La lectina no generó necrosis ni liberación de enzimas granulocíticas que afectaran áreas de la médula ósea. Tampoco se observaron eosinófilos amorfos, que se presentan en mayor cantidad cuando se lleva a cabo un proceso inflamatorio, todos estos cambios pueden identificarse mediante este análisis (Travlos, 2006).



En exposiciones agudas a fitoquímicos tóxicos, pueden encontrarse macrófagos con pigmentos de hemosiderina en la médula ósea debido a lesiones en los vasos y en el caso particular de las ratas puede apreciarse fácilmente la emperipolesis de neutrófilos con megacariocitos dentro de éstos, cuando las ratas se sujetan a una dieta estricta de dos semanas con el tóxico de exposición. Sin embargo, probablemente la concentración dada a los animales no generó un estímulo o un daño en la médula ósea a nivel histológico con la tinción empleada (H&E). Se observó un resultado similar al tratar a las ratas con dosis de 25 y 50 mg/kg de peso, en diferentes órganos (timo, bazo, colon, hígado, riñones). En estudios previos, hubo una disminución significativa en el peso del intestino a una concentración de 5 mg/kg de peso, mas no para los demás órganos (López y col., 2010). No obstante, se encontró en otros experimentos que en bazo hay proliferación de centros germinales a las cuatro semanas de tratamiento con la fracción concentrada de lectinas a una dosis de 50 mg/kg de peso. El diámetro del timo también presentó un aumento a las dos semanas de tratamiento con la fracción concentrada de lectinas a la misma dosis (Reyes, 2011). Por otro lado, cuando las ratas se someten a dosis superiores a los 200 mg de FCL por 100 g de alimento, puede observarse una hipertrofia del páncreas y un aumento en el peso de éste órgano (Osman, 2003), así como una importante disminución en células del epitelio intestinal (López y col., 2010).

Por el análisis de los antecedentes y la comparación con los resultados obtenidos, se sugiere que posiblemente la lectina pudiera ejercer efecto en la mucosa asociada al tejido linfático (MALT). En este tejido podrían medirse marcadores específicos para comprobar el efecto, pues el órgano en el que se presenta una diferencia significativa a dosis bajas de FCL es el intestino, y que puede ser una vía interesante de investigación.

Por otro lado el otro efecto que la FCL podría haber causado es la neoplasia de células en la médula ósea, que puede observarse como agregados celulares, tumores y un aumento en la celularidad general. Principalmente en las células del

sistema inmune, ya que la inflamación induce a cambios sistémicos sobre todo en la fase aguda. Sin embargo al evaluar el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) mediante inmunohistoquímica no se observaron diferencias con respecto al control.

Otra señal de una respuesta inflamatoria es la mediada por citocinas como la interleucina 1 (IL-1), los interferones (INF- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ). Se podría realizar la medición de estas citocinas mediante la técnica de ELISA, la cual tiene mayor sensibilidad, por lo que podrían detectarse cambios pequeños en sus niveles séricos.

Por otra parte, es importante mencionar que la lectina podría ser un estimulador de la proliferación en células maduras, es decir células circulantes del sistema inmune, para lo cual pudiese realizarse un diseño experimental *in vitro* con linfocitos maduros, que se expongan a distintas dosis la FCL y así evaluar su efecto sobre la proliferación.

## 7. CONCLUSIONES

Pese a la magnitud prometedora de algunos megacariocitos y su concentración en algunos campos que sugieren proliferación, y la diferencia que otros cortes mostraron para la médula ósea amarilla, la cual indica una disminución de la celularidad, no se encontró una diferencia significativa que señale una actividad proliferativa o inhibitoria. Lo anterior no compromete a la lectina a generar un cambio en la histología de la médula ósea en vértebra y fémur de rata bajo las condiciones ensayadas.

En la evaluación de la proliferación celular, los valores se mantienen constantes, es decir que no se encontró una diferencia que proponga que la lectina estimula la proliferación de la celularidad en la médula ósea respecto a su control, sin embargo es conveniente ampliar el estudio a la mucosa asociada al tejido linfático (MALT), así como en células maduras del sistema inmunitario, mediante experimentación *in vitro*.

La determinación de TNF- $\alpha$  y INF- $\gamma$  en suero puede demostrar si está efectuándose un proceso inmunomodulador en los animales tratados con la lectina, por lo que se plantea realizar a futuro su determinación mediante la técnica de ELISA, lo que permitirá dar continuidad a experimentos posteriores y comprender mejor el efecto de esta lectina.

## 8. REFERENCIAS

**Abbas** AK, Lichtman AH, Pillai S. Inmunología celular y molecular. 6a. ed. Madrid: Editorial Elsevier Saunders, **2008**; Cap.1;19-47.

**Agrawal** BBI, Goldstein J. Specific binding of concanavalin to crosslinked dextran gels. *Biochem J.* **1967**; 96:15C–23C.

**Baintner** KZ, Bodnar S, Kiss PS, Kiss A, Lukats A. Effect of intraperitoneally administered plant lectins on leukocyte diapedesis and visceral organ weight in rats and mice. *Pathol Oncol R.* **2007**; 13:2-9.

**Boldt** DH, Macdermott RP, Jorolan EP. Interaction of plant lectins with purified human lymphocyte populations: Binding characteristics and kinetics of proliferation. *J Immunol.* **1975**; 114:5-10

**Citterio** S, Sgorbati S, Levi M, Colombo BM, Sparvoli E. PCNA and total nuclear protein content as markers of cell proliferation in pea tissue. *J of Cell Science.* **1992**; 102:71-78.

**Chrispeels** MJ, Raikhelb N V. Lectins genes and their role in plant defense. *The Plant Cell.* **1991**; 3:1-9.

**Crennel**, S., Garman, E., Laver, G., Vimr, E., and Taylor, G. Crystal structure of *Vibrio cholerae* neuraminidase reveals dual lectin-like domains in addition to the catalytic domain. *Structure.* **1994**; 2:535–544.

**Debouck** DG. *Phaseolus acutifolius*. Plant production and protection series. [monografía de internet]. *Compendium of Transgenic Crop Plants*, **2004** [Consultado: enero-2010]. Disponible en:

<http://www.hort.purdue.edu/newcorp/1492/beans.html/>.

**Ebensberger** U, Pohly, Filippi A. PCNA-expression of cementoblasts and fibroblasts on the root surface after extraoral rinsing for decontamination. *Dent Traumatol* **2002**; 18:262-266.

**Edelman**, G.M., Cunningham, B.A., Reeke, G.N. Jr., Becker, J.W., Waxdal, M.J., Wang, J.L. The covalent and threedimensional structure of concanavalin A. Proc. Natl Acad. Sci. USA. **1972**;69: 2580–2584.

**Etzler** ME, MacMillan S, Scates S, Gibson DM, James DW, Cole D, Thayer S. Subcellular localization of two *Dolichos biflorus* lectins. Plant Physiol. **1984**;76: 871–778.

**Fraile** ME, García D. Nutritivas y apetecibles: conozca de leguminosas comestibles. Parte I. Hojas, vainas y semillas. Contacto S. **2007**; 66: 27–35.

**Freier** T, Fleischmann G, Rüdiger H. Affinity chromatography on immobilized hog gastric mucin and ovomucoid. A general method for the isolation of lectins. Biol Chem Hoppe-Seyler . **1985**;366:1023–1028.

**García** L.N K. Estudio del efecto antinutricio y daño fisiológico de una fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari en ratas. Querétaro. **2011**. Presentada en la Facultad de Ciencias naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro para la obtención del grado en Maestro en Nutrición Humana.

**Hamama**, Anwar A, Bhardwaj HL  
**2002**. [www.hort.purdue.edu/newcrop/ncnu02/pdf/bhardwaj-429.pdf](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/ncnu02/pdf/bhardwaj-429.pdf)

**Hammarström** S, Kabat EA. Purification and characterization of a blood-group A reactive hemagglutinin from the snail *Helix pomatia* and a study of its combining site. Biochemistry. **1969**; 8:2696–2705.

**Hara-Nishimura** I, Shimada T, Hiraiwa N, Nishimura M. Vacuolar processing enzymes responsible for conversion of several proprotein precursors into mature forms. J Plant Physiol. **1995**;145:632–640.

**Hart** DA. Lectins in biological systems: applications to microbiology. American J Clin Nut. **1980**;33: 2416-2425.

**Harley** SM, Beevers H. Ricin inhibition of *in vivo* protein synthesis in castor beans. Plant Sci Lett. **1984**;36:1–5

**Herman** EM, Shannon LM, Chrispeels MJ. Concanavalin A is synthesized as a glycoprotein precursor .Planta. **1985**;165:23–29.

**Hernández** DP, González MO. Aplicaciones de las lectinas. Rev Cub de Hemat, Inmunol y Hemoter. **1999**;15:91-95.

**Kindt** TJ, Golsdby RA, Osborne BA. Inmunología de Kuby. 6a ed. México. Mc Graw Hill. **2007**;340-346.

**Kopitz** J, Reitzenstein C, André S, Kaltner H, Uhl J, Ehemann V, Cantz M, Gabius HJ. Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3. *J Biol Chem.* **2001**;276:35917–35923

**Kostrominova** TY. Application of WGA lectin staining for visualization of the connective tissue in skeletal muscle, bone and ligament/tendon studies. *Microsc Res Tech.* **2011**; 74:18–22.

**Laemmli** UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature.* **1970**;227: 680-685.

**López** S.C., López M.F.J., Castañeda C.AL., Yllescas G.L., Ferriz M.RA., Torres AIC., García G.T, Gallegos C.MA., Rodríguez M.AJ., Mendiola O.E., Blanco L.A, Evaluación de la Toxicidad In Vitro e In Vivo de Lectinas de Frijol Tépari. *CIENCIA@UAQ.* **2010**: 3;3-13.

**Maga** G, Hübscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J of Cell Sci.* **2003**;116:3051-3060.

**Mansfield** MA, Peumans WJ, Raikhel NV. Wheat-germ agglutinin is synthesized as a glycosylated precursor. *Planta.* **1988**;173:482–489.

**Malkas** LH, Herbert BS, Aziz WA, Dobrolecki LE, Yang L, Agarwal B, Hoelz D, Badve S, Schnaper L, Arnold RJ, Mechref Y, Novotny MV, Loehrer P, Goulet RJ, Hickey RJ. A cancer-associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker. *PNAS.* **2006**; 103:19472–19477.

**Marchalonis** JJ, Edelman GM. Isolation and characterization of a hemagglutinin from *Limulus polyphemus*. *J Mol Biol* **1968**;z2:453–465.

**Masaoka** H, Shibata K, Yamaguchi H. Topological and functional characterization of the N-glycans of soybean (*Glycine max*) agglutinin. *J Biochem.* **1999**;126:212–217.

**Melo-Jr.** MR; Araújo J L, Vasco J R, Patu M, Machado MCF, Beltrão EIC, Carvalho LB. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumour differential diagnosis. *Brazil Patology Med Lab.* **2006**;42:455-460.

**Michael** JL. The use of cytotoxic plant lectins in cancer therapy. *Plant Physiol.* **1987**;85:1-3

**Min** W, Jones DH. Stability and expression of recombinant prepro-concanavalin A after cytoplasmic expression in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **1992**;301:315–318.

**Morgan** DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science.* **1976**;193:1007–1008.

**Münz** K. Intracellular protein sorting and the formation of protein reserves in storage tissue cells of plant seeds. *Biochem Physiol .* **1989**;185:315–335.

**Norma Oficial Mexicana** NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.  
Disponible en:<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>

**Osman** MM, Reid P, Weber C. The effect of feeding Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) proteinase inhibitors on the growth and pancreas of young mice. *Pak J Nut.* **2003**; 2:111-115.

**Pratt** RC, Singh NK. Isolation and partial characterization of a seed lectin from Tepary bean that delays bruchid beetle development. *Plant Physiolol.* **1990**;93:1453-1459.

**Peumans** WJ, Hause B, Damme EJ. The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments .*FEBS Lett.* **2000**; 477: 186–192.

**Pont** LRF, Taylor R, Varner JE. *Solanum tuberosum* agglutinin accumulation during tuber development. *J Plant Physiol.* **1991**;137:453–458.

**Reem** GE, Cook L A, Henriksen DM, Vilcek J. Gamma interferon induction in human thymocytes activated by lectins and B cell lines. *Infect and immun.* **1982**;37: 216-221.

**Regueiro** JR, López LC, Segundo GR, Martínez NE. *Inmunología biología y patología del sistema inmune.* 3a ed. Madrid. Médica Panamericana. **2006**;1-5, 15-19.

**Reuter** G, Gabius HJ. Sialic acids. Structure, analysis, metabolism, and recognition. *Biol Chem Hoppe Seyler.* **1996**;377:325–342.

**Reuter** G, Gabius HJ. Eukaryotic glycosylation: Whim of nature or multipurpose tool. *Cell Mol LifeSci*.**1999**; 55:368–422.

**Reyes** BL. Efecto de la administración de la fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre el sistema inmune de rata. Querétaro. **2011**. Presentada en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro para la obtención del grado en Doctor en Ciencias de la Salud.

**Roberts** LM, Lamb FI, Pappin DJC. The primary sequence of *Ricinus communis* agglutinin in comparison with ricin. *J Biol Chem*.**1985**;260:15682–15686

**Rougé** P, Piere D, Bourne Y, Cambillau C, Richardson M. Single and two-chain legume lectins: A revisited question in Lectins. *Clin Biochem*. **1990**,7:105–112.

**Rüdiger** H, Freier T, Fleischmann G. Affinity chromatography on immobilized hog gastric mucin and ovomucoid. A general method for the isolation of lectins. *Biol Chem Hoppe Seyler* .**1985**;366:1023–1028.

**Rüdiger** H, Hans JG. Lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glyco J*. **2002**;18:589–613

**Savoie** A, Lavastre V, Pelletier M, Hajto T, Hostanska K, Girard D. Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of *de novo* protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *J Leu Biol*.**2000**;68: 845–853.

**Sharon** N, Lis H. Lectins: Cell-agglutinating and sugar specific proteins. *Science*. **1972**;177:949–959.

**Sharon** N, Lis, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. **2004**,14:53R–62R

**Sheldon** PS, Keen JN, Bowles DJ. Posttranslational peptide bond formation during concanavalin A processing in vitro. *Biochem J*.**1996**;320:865–870.

**Shutov** AD, Braun H, Chesnokov YV, Baumlein H A. Evolutionary pathway of seed storage globulins, gene encoding a vicilin-like protein is specifically expressed in fern spores. *Euro J Biochem*.**1998**;252:79–89

**Singh** P, Bhaglal P, Bhullar SS. Differential levels of wheat germ agglutinin (WGA) in germinating embryos of different wheat cultivars in response to osmotic stress. *Plant Physiol Biochem*.**1996**;34:547–552.



**Springer** GF, Desai PR. Monosaccharides as specific precipitinogens of eel anti-human blood group H (O) antibody. *Biochem.* **1971**;10:3749–3760.

**Srinivasan**, N., Rufino, S.D., Pepys, M.B., Wood, S., and Blundell, T.L.A. A superfamily of proteins with the lectin fold. *Chemtracts Biochem. Mol. Biol.* **1996**;6:149–164.

**Teichberg** VI, Silman I, Beitsch DD, Resheff G. A b-Dgalactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. *Proc. Natl Acad. Sci.* **1975**;72:1383–1387.

**Travlos** G. Histopathology of Bone Marrow. *Toxicol. Pathol.* **2006**; 34:566- 598.

**Valadez** VC, Guzmán PAM. Purification, biochemical characterization, and bioactive properties of a lectin purified from the seeds of white Tepary bean (*Phaseolus Acutifolius* variety *Latifolius*). *Mol.* **2011**;16:2561-2582.

**Vitale** A, Chrispeels MJ. Sorting of proteins to the vacuoles of plant cells, *BioEssays.* **1992**;14:151-160.

**Xiang** Y, Song M, Wei Z, Tong J, Zhang L, Xiao L, Wang Y. A jacalin-related lectin-like gene in wheat is a component of the plant defense system. *J of Exp. Botany.* **2011**;62: 5471–5483.