



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERÉTARO
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Humana

**ESTUDIO SOBRE LA TOXICIDAD AGUDA Y
SUBCRONICA VIA ORAL DE UNA LECTINA DE
FRIJOL TÉPARI**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra
en Nutrición Humana

Presenta

Claudia López Sánchez

Dirigida por

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Santiago de Querétaro
Noviembre2008



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Humana

**ESTUDIO SOBRE LA TOXICIDAD AGUDA Y SUBCRONICA VIA ORAL DE
UNA LECTINA DE FRIJOL TEPARI**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en
Nutrición Humana

Presenta

Claudia López Sánchez

Dirigido por

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

SINODALES

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Presidente


Firma

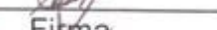
Dr. Alejandro Blanco Labra
Secretario


Firma

M. en C. Marco Alonso Gallegos Corona
Vocal


Firma

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Suplente

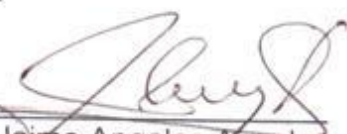

Firma

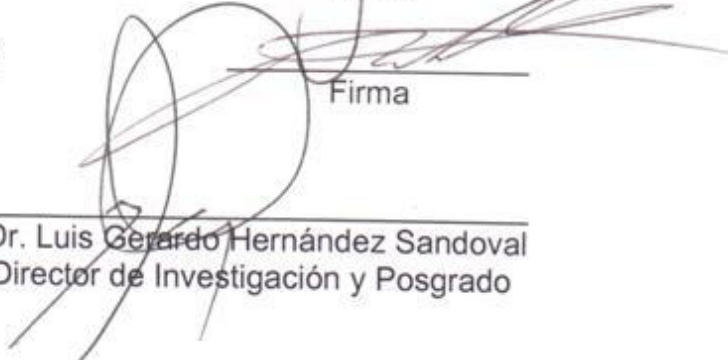
Dra. Adriana Jheny Rodríguez Méndez
Suplente


Firma

M. en C. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Suplente


Firma


Biólogo Jaime Angeles Angeles
Director de la Facultad de
Ciencias Naturales


Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro
Noviembre2008
México

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL BIOTERIO Y EN EL LABORATORIO DE PATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA A CARGO DEL DR. MARCO ALONSO GALLEGOS CORONA Y 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

RESUMEN

Trabajos *in vitro* han mostrado que una fracción concentrada de lectina (FCL) de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) inhibe el crecimiento de células cancerígenas, principalmente de colon. Resulta importante determinar si esta fracción es capaz de afectar a células tumorales *in vivo* sin embargo, es necesario determinar su perfil toxicológico vía oral. El objetivo del presente estudio fue evaluar la toxicidad aguda (TA) y subcrónica (TSC) de la FCL de frijol tépari administrada mediante cánula intragástrica. La FCL (1591 UA/mg proteína), obtenida mediante cromatografía de exclusión de peso molecular fue administrada a ratas Sprague Dawley de 7-8 semanas de edad, con alimentación y agua *ad libitum*. Para el estudio de TA se emplearon hembras nulíparas, con dosis únicas de 5, 50, 300 y 2000 mg de FCL/kg de peso y para el estudio de TSC se utilizaron hembras nulíparas y machos, con dosis de 5, 10 y 50 mg de FCL/kg de peso/día, durante 30 días. En el estudio de TA, las dosis de 2000 y 300 mg/kg provocaron diarrea, aletargamiento y piloerección en las primeras 48 horas así como disminución del consumo de alimento y peso corporal durante la primera semana, con total recuperación. No se observó efecto letal ni alteraciones macroscópicas en los órganos estudiados durante la necropsia, excepto disminución del peso de los riñones en los grupos de 50 y 300 mg/kg ($p \leq 0.05$). Para el caso del estudio de TSC, no se observaron diferencias en el peso corporal, consumo de alimento ni alteraciones macroscópicas durante la necropsia. Los grupos con dosis de 5 mg/kg presentaron disminución ($p \leq 0.05$) en el peso de pulmones e intestino delgado (hembras) y en intestino delgado y riñones (machos). El análisis histopatológico fue normal para todos los casos excepto para pulmones, con alteraciones en todos los grupos incluyendo al control. Dichas lesiones pudieron deberse a algún factor externo que afectó a todos los animales y no se le atribuyó a la FCL. Los resultados sugieren que la FCL administrada por vía oral presenta baja toxicidad. La dosis sugerida para iniciar futuros estudios es de 50 mg/kg ya que no provocó alteraciones bajo los dos esquemas estudiados.

Palabras clave: Frijol tépari, lectina, *Phaseolus acutifolius*, toxicidad aguda, toxicidad subcrónica.

SUMMARY

In vitro studies have shown that a concentrated lectin fraction (CLF) from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) inhibits cancer cells growth, mainly colon cancer cells. It is important to determine if this fraction is able to affect tumor cells *in vivo* however, it is necessary to determine its toxicity profile orally. The aim of this study was to assess the acute toxicity (AT) and subchronic toxicity (SCT) of tepary bean CLF via intragastric cannula. CLF (1591 AU/mg protein), obtained by molecular weight exclusion chromatography was given to 7-8 week old Sprague Dawley rats, with *ad libitum* food and water. For the AT study nulliparous females were used, with single doses of 5, 50, 300 and 2000 mg of CLF/kg and for the SCT study nulliparous females and males were used, with doses of 5, 10 and 50 mg of CLF/kg/day, for 30 days. In the study of AT, doses of 2000 and 300 mg/kg caused diarrhea, lethargy and piloerection in the first 48 hours as well as a decrease of food consumption and body weight during the first week, with full recovery. There was no lethal effect observed or macroscopic abnormalities in the examined organs during necropsy, except for a decrease of kidneys weight in groups of 50 and 300 mg/kg ($p \leq 0.05$). In the case of SCT study, there were no differences in body weight, food consumption or macroscopic alterations during the necropsy. The groups with a dose of 5 mg/kg showed a decrease ($p \leq 0.05$) in lungs and small intestine weight (females) and small intestine and kidneys weight (males). Histopathological analyses were normal for all cases except for lungs, with alterations in all groups including the control. Those lesions could be due to some external factor that affected all animals and was not attributed to the CLF. The results suggest that CLF presented low toxicity by oral administration. The suggested dose for initiating future studies is 50 mg/kg as it did not cause alterations under the two schemes studied.

Key words: Acute toxicity, lectin, *Phaseolus acutifolius*, subchronic toxicity tepary bean.

DEDICATORIAS

A mis padres por haber sabido guiarme hasta aquí, por que gracias a ellos he logrado ser lo que hasta ahora.

A mis hijos Cris y Dany por que son el motor y apoyo más importante en mi vida.

A mi esposo Cris por que siempre me impulsa a seguir adelante.

A mis maestros por su gran ejemplo de ética y trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por que sin ellos no hubiera sido posible realizar este sueño. Gracias por su cariño y por su dedicación, por los viajes en fines de semana y por que todo este tiempo estuvieron a mi lado y por fin terminamos.

A ti Cris gracias por haber estado siempre a mi lado estos años, por dar ese toque de alegría en mi vida..

A mis niños Cris y Dany por amor y su paciencia.

A Eli por estar siempre dispuesta a ayudarme en todo momento. Gracias amiga.

A mis maestros de la Maestría en Nutrición Humana, mi más sincero agradecimiento a todos ellos quienes en distinta forma contribuyeron significativamente a mi formación académica.

Hago una mención muy especial a quien confió en mi desde que el presente trabajo era un proyecto con todos los deseos de ser llevado a cabo: mi directora de tesis Tere, por inspirarme por ese gusto tan especial por la investigación, por haber estado siempre al pendiente, por sus enseñanzas y por el tiempo dedicado a mi formación, Gracias.

A mis compañeros de la Maestría que junto conmigo compartieron un sin número de experiencias.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Josué, Pablo, Chayito, Christopher, Paloma, Bere, a todos ellos mil gracias.

A Dios, por que tengo la sensación de quedarme sin palabras para agradecer todo lo que me ha dado.

INDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimiento	iv
Indice	v
Indice de figuras	vii
Indice de tablas	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Frijol Tépari (<i>Phaseolus acutifolius</i>)	3
2.1.1 Descripción botánica y fitogeografía	3
2.1.2 Usos y valor nutricional del frijol tépari	4
2.2 Lectinas	5
2.2.1 Historia y definición de las lectinas	5
2.2.2 Estructura y clasificación de las lectinas	6
2.2.3 Las lectinas como herramientas en biomedicina	9
2.3 Lectinas como factores antinutricios	11
2.3.1 Métodos de inactivación de lectinas en alimentos	12
2.3.2 Toxicidad de las lectinas vegetales	13
2.3.2.1 Toxicidad de las lectinas: Estudios clínicos	14
2.3.2.2 Toxicidad de las lectinas: Estudios <i>in vivo</i>	15
2.3.2.3 Toxicidad de las lectinas: Estudios <i>in vitro</i>	21
III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo General	26
5.2 Objetivos específicos	26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1 Diseño del estudio	27

6.2 Obtención de la FCL	27
6.3 Estudio de la Toxicidad Aguda Oral	28
6.4 Estudio de la Toxicidad Subcrónica Oral	30
6.5 Análisis estadístico	31
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
7.1 Actividad aglutinante de la Fracción concentrada en lectina de Frijol Tépari	32
7.2 Estudio de la toxicidad aguda oral de la FCL	34
7.3 Estudio de la toxicidad subcrónica oral de la FCL	43
VIII. CONCLUSIONES	56
IX. PERSPECTIVAS	56
X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	Página
Figura 1. Consumo de alimento y peso corporal de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de FCL en el estudio de toxicidad aguda.	36
Figura 2. Análisis histopatológico y peso de intestino delgado y colon de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de FCL en el estudio de toxicidad aguda.	37
Figura 3. Análisis histopatológico y peso de hígado y riñones de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de FCL en el estudio de toxicidad aguda.	38
Figura 4. Análisis histopatológico y peso de bazo y timo de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de FCL en el estudio de toxicidad aguda	39
Figura 5. Peso de corazón y estómago de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de FCL en el estudio de toxicidad aguda	40
Figura 6. Análisis histopatológico y peso de pulmones de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de FCL en el estudio de toxicidad aguda.	42
Figura 7. Consumo de alimento y peso corporal de ratas Sprague Dawley hembras en el estudio de toxicidad subcrónica.	44
Figura 8. Consumo de alimento y peso corporal de ratas Sprague Dawley machos en el estudio de toxicidad subcrónica.	45
Figura 9. Análisis histopatológico y peso de intestino delgado y colon de ratas Sprague Dawley hembras en el estudio de toxicidad subcrónica	46
Figura 10. Análisis histopatológico y peso de intestino delgado y colon de ratas Sprague Dawley machos en el estudio de toxicidad subcrónica.	47
Figura 11. Análisis histopatológico y peso de hígado y riñones de ratas Sprague Dawley hembras en el estudio de toxicidad subcrónica.	49

FIGURA	Página
Figura 12. Análisis histopatológico y peso de hígado y riñones de ratas Sprague Dawley machos en el estudio de toxicidad subcrónica.	50
Figura 13. Análisis histopatológico y peso de bazo y timo de ratas Sprague Dawley hembras en el estudio de toxicidad subcrónica	51
Figura 14. Análisis histopatológico y peso de bazo y timo de ratas Sprague Dawley machos en el estudio de toxicidad subcrónica.	52
Figura 15. Peso de corazón y estómago ratas Sprague Dawley hembras y machos en el estudio de toxicidad subcrónica.	53
Figura 16. Análisis histopatológico y peso de pulmones de ratas Sprague Dawley hembras y machos en el estudio de toxicidad subcrónica.Figura 16	55

INDICE DE TABLAS

TABLA	Página
Tabla 1. Actividad aglutinante de extractos crudos de proteína obtenidos de diferentes variedades de frijol.	33

I. INTRODUCCIÓN

Las lectinas son glicoproteínas de origen no inmune que comparten en común la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos (Hernández *et al.*, 1999). Desde los años cincuenta hasta nuestros días se han identificado cientos de lectinas de origen no inmune y ubicuas en toda la escala evolutiva (virus, microorganismos, plantas, hongos y animales). La ubicuidad de las lectinas refleja su participación decisiva en actividades celulares muy diversas, participando en numerosos procesos intra e intercelulares, lo mismo fisiológicos que patológicos (Gallego del Sol *et al.*, 2006). Poseen interesantes propiedades, por lo que se han utilizado en numerosas investigaciones, considerándoseles como herramientas valiosas en el campo de la genética, la biomedicina y la inmunología (Hernández *et al.*, 1999). Diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* con numerosas lectinas han demostrado que poseen actividad antitumoral y anticarcinogénica (Castillo y Abdullaev, 2005).

Anteriormente existía la idea de que la toxicidad constituía una propiedad intrínseca de las hemaglutininas. Esta idea tuvo que abandonarse en 1907, cuando K. Landsteiner y Raubitschek caracterizaron hemaglutininas inocuas en semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*), chícharo (*Pisum sativum*) y lenteja (*Lens culinaris*) (Gallego del Sol *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha observado que ciertas lectinas presentan diversos efectos tóxicos en los distintos órganos y que algunas de ellas llegan a ser letales si se ingieren en altas concentraciones (Freed, 1999). Además, se sabe que algunas lectinas producen toxicidad en las células de mamíferos, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Reynoso *et al.*, 2003). Las lectinas presentes en el frijol rojo (*Vigna angularis*) son las principales responsables de los efectos tóxicos observados en personas que lo consumen (Nakata y Kimura, 1985; Freed, 1999).

Como las lectinas reaccionan con la superficie epitelial del tracto digestivo, pueden causar efectos antinutricionales, alergias leves y otros efectos subclínicos en animales y en humanos, particularmente cuando se consumen en grandes cantidades. No obstante, algunos estudios del efecto de

las lectinas en el tracto gastrointestinal han revelado que la administración oral de bajas dosis de lectinas puede tener efectos benéficos en la eficiencia de la digestión y absorción del intestino, del sistema inmune y de la flora bacteriana. Algunas lectinas pueden influenciar el sistema endócrino con consecuencias benéficas para el metabolismo, atravesar la pared intestinal y depositarse en órganos distantes (Freed, 1999). Ciertas lectinas son mucho más tóxicas para los insectos que para los animales superiores, por lo que su presencia en plantas se considera como parte del sistema de defensa (Pusztai y Bardocz, 1996).

Los trabajos *in vitro* realizados en nuestro laboratorio con una fracción concentrada de lectina de frijol Tépari (FCL) sobre diferentes líneas celulares de cáncer han demostrado que posee un efecto citotóxico diferencial sobre las células normales y cancerígenas en función de las concentraciones utilizadas (Hernández-Rivera *et al.*, 2007). Además, ha mostrado efecto inhibitorio del crecimiento de diferentes líneas celulares cancerígenas, presentándose mayor sensibilidad sobre las células de cáncer de colon CaCo2 (Castañeda-Cuevas *et al.*, 2007; López, 2007).

Resulta muy importante determinar la capacidad de la FCL para inhibir el crecimiento de células tumorales *in vivo*. Debido a la localización anatómica del colon, las lectinas pueden llegar a las células blanco a través del tracto digestivo. Por lo anterior, es necesario conocer primero la toxicidad de la FCL vía oral ya que hasta ahora solo se ha estudiado la toxicidad de la lectina de frijol Tépari administrada de manera intraperitoneal.

II. ANTECEDENTES

2.1. FRIJOL TÉPARI (*Phaseolus acutifolius*)

2.1.1 Descripción botánica y fitogeografía

Phaseolus vulgaris es el principal tipo de frijol consumido en México y ha sido parte de la dieta tradicional por miles de años. Sin embargo, en el Norte de México se cultiva una variedad particular de frijol conocida como Tépari. Aunque su consumo está todavía limitado a dicha región, esta cosecha es particularmente atractiva debido a sus características agronómicas como la resistencia a plagas y sequía (Córdoba y Martínez, 1997; Reynoso *et al.*, 2003; González de Mejía *et al.*, 2005).

El nombre científico del frijol Tépari es *Phaseolus acutifolius*, pertenece a la familia de las *Fabaceae*. Sus nombres comunes son: tepary bean, inglés; xmayum, maya (Campeche, México); Tépari, español (Sonora, México); frijol piñuelero (nombre de un híbrido), Costa Rica; escomite o escumite (Chiapas, México). Esta especie ha crecido por un largo tiempo en Mesoamérica, principalmente en zonas desérticas o áreas con un periodo largo de sequía (González de Mejía *et al.*, 1989). Crece de forma silvestre en algunas regiones áridas y semiáridas del suroeste de Estados Unidos desde la parte central del estado de Arizona (EUA) hasta el sur de Nicaragua. Su origen se remonta a 5000 a.C., en el Valle de Tehuacán, Puebla, lugar en donde se encontraron las semillas más antiguas. Es una de las cinco especies de *Phaseolus* domesticadas en América en tiempos precolombinos (Debouck, 1994). No se conoce con precisión dónde se empezó a domesticar esta especie pero algunas de las causas del descuido del cultivo de frijol Tépari son la pérdida de consumo tradicional en las comunidades indígenas y la escasez de demanda en los grandes mercados. Su potencial cultivo en áreas desérticas es extenso debido a su resistencia a la sequía, al calor y a su adaptabilidad a altas concentraciones salinas del suelo (Córdoba y Martínez, 1997; González de Mejía *et al.*, 2005).

Es una planta anual, trepadora, de raíz fibrosa y de altura variable (generalmente de 20 cm hasta 1.5 m), de tallos delgados y pilosos, con hojas delgadas y lineales en los tipos silvestres, mientras que en las especies cultivadas son abovedadas. Las vainas son pequeñas, las semillas semejan a los frijoles en miniatura y sus tamaños varían entre 8.6 a 9.1 mm. La inflorescencia es un racimo axilar con 2-5 flores. La vaina recta o falcada, de 5-9 cm de largo por 1 cm de ancho, la cual contiene de 5-7 semillas (Nabham y Felger, 1978., González de Mejía *et al.*, 1989). El producto principal es una semilla seca la cual es comestible, además de poseer un alto contenido de proteínas (17 a 27%) y de carbohidratos (Albores *et al.*, 1987). Al igual que el frijol común, la especie del Tépari es relativamente tóxica para el hombre al ser ingerida bajo condiciones de cocimiento no adecuado y también para los animales, posiblemente por la presencia de fitoaglutininas (González de Mejía *et al.*, 1989).

Su forma de cultivo consiste en un ciclo corto, floreciendo de 27 a 40 días después de su germinación y maduran de 60 a 80 días. Las semillas pueden estar a una temperatura de 35° C en comparación con otras especies de *Phaseolus* que no resisten esta temperatura, es resistente al pulgón y puede crecer en presencia de hierba. El cultivo se ha encontrado de 50 a 1920 m sobre el nivel del mar, requiere de una precipitación anual de 250 a 300 mm, aunque crece en México en regiones con una precipitación de 150 mm (Sonora) a 750 mm (Campeche). Crece en suelos secos, arenosos, lodosos, y algunas veces en suelos orgánicos con un pH 6.7 a 7.1. Su semilla se presenta en dos formas: una medianamente redonda blanca o negra y la otra rómbica que puede ser blanca, verdosa, gris, amarilla oscura, negro o violeta. El promedio en peso de 100 semillas de Tépari cultivados es entre 10 y 20 g y en su forma silvestre, entre 2 y 5 g. Aunque los cultivados y los silvestres no tienen un hábitat definido, es necesario un ambiente desértico (Cordoba y Martínez, 1997).

2.1.2 Usos y valor nutricional del frijol Tépari

El frijol Tépari se utiliza principalmente como alimento para humanos y animales debido a su gran contenido proteínico sin embargo, es poco

consumido por lo que su alto contenido de proteínas y carbohidratos es subutilizado (Osman *et al.*, 2003). Es considerado como una fuente importante de proteínas, a pesar de que presenta deficiencia en aminoácidos azufrados, su contenido es ligeramente mayor a los reportados en otras variedades de frijol cultivadas en condiciones ecológicas menos adversas. Tiene un valor proteínico promedio de 25% en base seca y 23% en base húmeda (Intriago-Ortega, 1985; Idouraine y Yensen, 1991). La concentración de cenizas, grasas y carbohidratos totales del Tépari son similares a otras variedades comunes del género *Phaseolus*. Sin embargo, presenta compuestos antinutricios como son: fitatos, lectinas e inhibidores de proteasas que, aunque relativamente altas en el extracto crudo, desaparecen casi del todo después de la cocción; por lo que al ser consumidos no constituyen un riesgo para la salud (González de Mejía *et al.*, 1989; Idouraine y Yensen, 1991). Respecto al frijol común, el frijol Tépari tiene concentraciones menores de lectinas sin embargo, éstas poseen una actividad biológica mayor (González de Mejía *et al.*, 2005).

2.2. LECTINAS

2.2.1 Historia y definición de las lectinas

El estudio de las lectinas fue iniciado por Stillmark en 1888 al describir el fenómeno de hemaglutinación con extractos de semillas de castor (*Ricinus communis*). La proteína responsable de la hemaglutinación de los eritrocitos de denominó ricina. Más tarde, Hellín descubrió que el extracto tóxico de semillas *Abrus precatorius* también producía aglutinación de las células rojas, la proteína responsable se denominó abrina. A fines de los años 40, William C. Boyd y Rose M. Reguere reportaron que ciertas semillas contenían aglutininas específicas para antígenos de los grupos sanguíneos humanos. La primera lectina que fue obtenida en forma cristalina fue la concaavalina A del frijol *Canavalia ensiformis* en 1919 por Summer. El término lectinas fue introducido por Boyd y colaboradores en 1954 (Sharon, 1998, Hernández *et al.*, 1999).

Las lectinas son un grupo de proteínas ó glicoproteínas de origen no inmune que comparten la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a los carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras

más complejas. Como característica particular tienden a aglutinar a las células a las cuales se unen (Castillo y Adbullaev, 2005). Se encuentran presentes en la mayoría de los seres vivos, tanto en el reino animal como en el vegetal (Rhodes, 1999). En las plantas, la mayoría de estas moléculas están presentes en los cotiledones y endospermos de las semillas y constituyen del 2-10% del total de proteína (Castillo y Adbullaev, 2005).

2.2.2 Estructura y clasificación de las lectinas

Mediante la secuenciación de genes se ha proporcionado información acerca de la estructura primaria de las lectinas de leguminosas. Se han determinado los productos de la traducción primaria que provienen de los ARNm y su conversión en los polipéptidos maduros de lectinas. Estudios de biosíntesis y topogénesis de una variedad de lectinas de leguminosas han demostrado que las proteínas se sintetizan en el retículo endoplasmático (como pre-proteínas) y subsecuentemente entran a la vía de secreción. El proceso de postraducción incluye la remoción del péptido señal y en algunos casos la N-glicosilación (Lis y Sharon, 1998).

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 (Peumans y Van Damme, 2002). Es interesante hacer notar que existe sólo un grupo limitado de azúcares que las lectinas de las plantas reconocen, que incluye a los monosacáridos D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, L-fucosa (6-deoxi-L-galactosa), a dos azúcares aminados que son el N-acetil-D-glucosamina y el N-acetil-D-galactosamina y a los ceto azúcares D-fructuosa y L-sorbosa. También es importante hacer notar que no ha sido reportada ninguna lectina de planta que se una a un azúcar pentosa (Goldstein, 2002).

Una manera de clasificar a las lectinas es en base a su estructura: a) simples, b) mosaico y c) macromolecular. 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 el grupo de mosaico hay una diversidad de proteínas de

diferentes orígenes, por un lado las lectinas de origen animal y las de tipo I. Las lectinas del grupo de macromoléculas están formadas por las de bacterias, especialmente en la forma de fimbrias o pilis (organelos filamentosos de superficie). Se han encontrado lectinas en una gran diversidad de seres vivos, por lo que pueden clasificarse de la siguiente manera (Lis y Sharon, 1998):

a) Lectinas vegetales, se encuentran principalmente en los cotiledones y endospermos de las semillas de algunos vegetales como el trigo, frijol, soya, entre otros. Entre las lectinas de vegetales mejor conocidas se encuentran las siguientes:

- La Concanavalina A, es una proteína que se obtiene de *Cannavalia ensiformis* 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 los ácidos α -N-acetilneuramínico y α -N-acetilneuramínico.
- La fitohemagutininina (PHA), se encuentra en el frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Se sabe que tiene acción mitogénica (estimuladoras del ciclo celular) y tiene la capacidad de aglutinar específicamente células cancerígenas, lo cual ha desarrollado un gran interés en investigación para utilizarlas como tratamiento para el control de crecimiento de tumores.

Todas las lectinas de leguminosas están constituidas por protómeros (productos maduros de la primera traducción del RNAm de la lectina) de aproximadamente 30 kDa. La mayoría de los protómeros consisten de una cadena polipeptídica simple de aproximadamente 250 residuos y, en algunos casos, están separados en dos pequeños polipéptidos, similares o no en su tamaño. Una lectina de leguminosa nativa contiene de dos a cuatro protómeros que se mantienen unidos por interacciones no covalentes. La formación de los dí o tetrámeros implica que la lectina de la leguminosa puede ocurrir en ocho diferentes formas moleculares (Lis y Sharon, 1998).

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 a carbohidratos. Básicamente, los promotores de las lectinas de leguminosas consisten de una o dos cadenas constituidas de una hoja β de 7 tiras (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 tiras antiparalelas de la hoja β , le proporciona una estructura rígida y fuerte que puede explicar la extrema resistencia de las lectinas de leguminosas al ataque proteolítico (Lis y Sharon, 1998).

Se ha propuesto que, debido a su amplia distribución en vegetales, las lectinas pueden proteger a la planta de ataques de bacterias, hongos y virus patógenos a lo largo de su desarrollo, en diferentes etapas como: absorción, germinación y desarrollo de las semillas. Además se les han atribuido otros usos a las lectinas vegetales como promotoras de adhesión entre diversas células (Machuka *et al.*, 1999).

b) Lectinas animales, se han encontrado en la hemolinfa y órganos sexuales de animales invertebrados como: caracoles, cangrejos, camarones, moluscos, peces y lombrices, y también en animales vertebrados como el cerdo (Lis y Sharon, 1998).

Se cree que las galectinas de origen animal tienen una función en la adhesión celular. Estas lectinas 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. Es por eso que la galectina-1 se expresa en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Altos niveles de galectina-3 en la superficie celular durante la metástasis en células de cáncer se ha relacionado con la adhesión de las células a los órganos blanco (Lis y Sharon, 1998).

c) Lectinas microbianas. Existe un tipo de lectinas que se localizan en la superficie de microorganismos tales como bacterias, virus, hongos y parásitos y se les denomina adhesinas. Juegan un papel importante al colonizar mucosas

produciendo lesiones titulares. Existe otro tipo de lectinas microbianas que se han identificado y se sabe que se unen específicamente con los sialoglicoconjugados de *Bordetella*, y otros microorganismos y se les denomina proteínas Gac-p que significa "proteínas microbianas de unión a glicosaminoglicanos". 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).

También hay varias familias de virus que presentan moléculas de adhesión, 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 las cuales la partícula viral y la hemaglutinina no pueden ser separadas. Contienen una enzima que causa elusión y 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 enzima destructora (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 (Liener, 1997).

2.2.3 Las lectinas como herramientas en biomedicina

De forma general, las lectinas son sustancias biológicamente activas con aplicaciones médicas muy prometedoras debido en parte a sus habilidades

para provocar hiperplasia del intestino delgado, inducir cambios en la flora intestinal, interferir con la secreción de hormonas y entrar a la circulación sistémica (Lajolo y Genovese, 2002).

Las lectinas han llamado la atención de numerosas investigaciones debido a las diversas funciones que pueden realizar, incluyendo la antiproliferación, la antitumorogénesis, como inmunomoduladores, antifúngicos, antivirales e inhibición de la transcriptasa HIV-1 (Wong y Ng, 2002). Tienen efectos potentes sobre la proliferación y diferenciación de diferentes células animales incluyendo linfocitos, osteoblastos y condrocitos (Nishimura *et al.*, 2004). Se consideran herramientas valiosas en el campo de la genética, la biomedicina y la inmunología como por ejemplo (Albores *et al.*, 1987; Hernández *et al.*, 1999):

- Evaluación de la producción de citocinas (interferón e interleucinas).
- Determinación de fenómenos de la respuesta inmune (inmunosupresión).
- La relación que existen entre virus patógenos y su resistencia a ellos.
- Evaluación de terapias antirretrovirales.
- Efectos citotóxicos de algunas drogas en células mononucleares.
- Efectos de la nutrición en la proliferación de linfocitos.
- Inducción de genes en linfocitos.
- Detección de anomalías cromosómicas.
- Caracterización e identificación de grupos sanguíneos

Sus propiedades mitogénicas permiten que se utilicen en estudios que tienen como base la proliferación de linfocitos en los cultivos. Forman parte de conjugados como lectina-lectina, lectina-enzimas y lectina-anticuerpos, lo que ha permitido el desarrollo de técnicas cromatográficas como la cromatografía de afinidad para la purificación de glicoproteínas, enzimas y de las propias lectinas (Hernández *et al.*, 1999, Disni *et al.*, 2008). Además, las lectinas son capaces de inducir la producción de interleucina 2 (IL-2) y la aparición de receptores de IL-2 en células T (Piñols, 1995)

Dentro de los estudios de membrana se ha reportado en la literatura el uso de lectinas para estudiar cambios estructurales en los glicoconjugados

presentes en las superficies celulares. También se emplean para la detección de transformaciones malignas de células, a través de la aglutinación preferencial que muestran las lectinas con las células transformadas (Hernández *et al.*, 1999). Por otro lado, con respecto al cáncer de colon, se ha reportado que las anomalías en las glicosilaciones encontradas en las células malignas se correlacionan con su potencial invasivo y su pronóstico (Rhodes, 1999). La diferenciación celular es regulada por la adhesión de moléculas glicosiladas, siendo éstas un blanco para las lectinas. Se ha observado que la lectina de *Vicia faba* es capaz de estimular la diferenciación de células indiferenciadas de cáncer de colon (Jordinson *et al.*, 1999a)

2.3 Lectinas como factores antinutricios

Las lectinas de los alimentos se han considerado como factores antinutricios (González de Mejía y Priescaru, 2005), ya que estas son capaces de sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal para ejercer su actividad biológica. Estas proteínas presentan alta resistencia a la digestión por las enzimas proteolíticas de los mamíferos ya que presentan una unión efectiva con los receptores de superficie de las células epiteliales del intestino (Rhodes, 1999; Lajolo y Genovese, 2002). Además, resisten la degradación por bacterias (Pusztai y Bardocz, 1996), por lo que sobreviven al paso a través del tracto digestivo y permanecen en su forma biológica e inmunológica intactas (Rhodes, 1999; Lajolo y Genovese, 2002).

Se han reportado estudios en donde estas proteínas se recuperaron con sus propiedades íntegras después de pasar por el tracto digestivo de ratones en un periodo de 24 horas (Nakata y Kimura, 1985). Estudios realizados en ratas muestran que, aproximadamente, un 8% de la aglutinina de soya intacta permaneció en su forma libre, además de la cantidad ligada al epitelio (Lajolo y Genovese, 2002). En otro estudio se observó que la mayor parte de la lectina del frijol Kintoki, administrada a ratones mediante cánula de intubación gástrica, se encontró en el tracto digestivo a niveles de 88.7%, 99.4%, 99.5% y 78.6% después de 0.5, 2, 5 y 24 h posteriores a la intubación, respectivamente (Hara *et al.*, 1984). La concanavalina A fue recuperada en cantidades significativas sin presentar alteraciones en el contenido fecal de ratas 4 h después de su

administración oral. De las heces se recuperó el 90% 4 días posterior a la administración de la misma, indicando que dicha lectina es estable durante su paso por el tracto gastrointestinal (Nakata y Kimura, 1985).

Las lectinas se unen al epitelio intestinal de las ratas e interfieren con la absorción de nutrientes (Lajolo y Genovese, 2002). Al incluirlas en una dieta de 0.73 mg/g de alimento, las lectinas de soya mostraron una reducción en la retención del nitrógeno y un aumento de la excreción de nitrógeno a través de la orina, indicando interferencia con el metabolismo de la proteína (Czerwinski *et al.*, 2005). Además, las lectinas de la soya reducen la producción de insulina de las ratas a las que se les dan dosis orales mayores a 0.02 g/kg de peso corporal (Pusztai y Bardocz, 1996).

2.3.1 Métodos de inactivación de lectinas en alimentos

La destrucción de la toxicidad de las lectinas por el calor fue reconocida desde 1889 por Stillmark. Debido a su naturaleza proteínica, las lectinas son inactivadas bajo ciertas condiciones debido a desnaturalización irreversible. Todas las leguminosas son tratadas mediante calor antes de su consumo por los humanos, por lo que la destrucción de estos factores antinutricionales es esperada debido a la termolabilidad de las lectinas (Lajolo y Genovese, 2002). Sin embargo, se puede encontrar alguna actividad residual cuando no son tratadas con métodos de cocción adecuados y cuando los tiempos a los que se someten son cortos (Lajolo y Genovese, 2002; González de Mejía y Prisecaru, 2005). Las lectinas de frijol son inactivadas mediante el cocimiento por al menos 15 min a presión atmosférica o por 7.5 min bajo presión. Se ha reportado una completa inactivación de la lectina de la soya mediante tratamiento de calor a 100° C durante 10 min. Por lo tanto, aparentemente no existe actividad residual en las leguminosas al ser cocidas de manera adecuada (Lajolo y Genevese, 2002).

El autoclave ha demostrado ser de gran ayuda en mantener los valores nutritivos de las legumbres, su efecto probablemente está relacionado con la destrucción de las hemaglutininas tóxicas y otros factores inhibidores del crecimiento. El uso del autoclave durante 5 min a una temperatura de 92° C es

suficiente para eliminar la actividad de hemaglutinación en el caso del frijol navy (González de Mejía y Prisecaru, 2005). Sin embargo, para una completa eliminación de la toxicidad del frijol rojo y silvestre, se requiere remojarlos previamente (Tareq al-Ati, 2001).

Se ha encontrado que el calor seco es menos efectivo, 30 minutos de calor seco tienen poco efecto sobre la actividad de la hemaglutinina de ciertas variedades de *P. vulgaris*, detectándose actividad aún después de 18 horas de calor (Tareq al-Ati, 2001). El uso del horno de microondas convencional no es un método efectivo para la inactivación de las lectinas, el calor del microondas destruye adecuadamente las hemaglutininas y los inhibidores de tripsina en la mayoría de granos de leguminosas, pero esto no sucede en el caso del frijol común (González de Mejía y Prisecaru, 2005).

2.3.2 Toxicidad de las lectinas vegetales

Diferentes estudios epidemiológicos indican que el consumo de una dieta basada en vegetales se encuentra fuertemente asociada con una disminución en el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer. Esto se puede deber al hecho de que las plantas contienen numerosos componentes activos o fitoquímicos los cuales pueden alterar las vías bioquímicas asociadas con la iniciación, promoción o progresión del cáncer. Entre estos compuestos se encuentran las lectinas, las cuales han sido intensamente estudiadas en su papel de quimiopreención contra el cáncer (González de Mejía y Prisecaru, 2005). La especificidad que poseen las lectinas ha desencadenado numerosas aplicaciones en la ciencia de la medicina experimental básica utilizando diferentes rutas de administración (Hernández *et al.*, 2005). No obstante, es necesario considerar que muchas lectinas son tóxicas y/o inflamatorias, por lo que no sorprende que la ingestión de éstas algunas veces cause envenenamiento (Freed, 1999).

Las leguminosas rara vez son consumidas por los humanos sin un previo tratamiento de calor. En experimentos cortos, las lectinas purificadas de frijoles o de soya afectan el crecimiento de las ratas e inducen un alargamiento del intestino delgado causando daño al epitelio y estimulando la hipertrofia e

hiperplasia del páncreas. Se ha reportado una reducción en la actividad de la maltasa e invertasa en la mucosa intestinal, así como la interferencia con el transporte de glucosa. A niveles elevados, las lectinas de frijoles inducen depleción del músculo esquelético, lípidos y glucógeno (Lajolo y Genovese, 2002).

En estudios *in vivo* e *in vitro* se ha observado que muchas lectinas son tóxicas en células de mamíferos ya que se unen a las glicoproteínas del tracto gastrointestinal, por lo que pueden interferir reduciendo el crecimiento celular, deteriorando la integridad del epitelio intestinal, afectando la absorción y la utilización de los alimentos (Lajolo y Genovese, 2002; González de Mejía y Priescaru, 2005; Hernández *et al.*, 2005). La muerte de los animales causada por lectinas puede ser producida por diferentes mecanismos que incluyen la inhibición de ciertas proteínas vitales, la disminución de la disponibilidad de nitrógeno en el cuerpo y la inducción de sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado, además de la acción de las lectinas sobre las células sanguíneas (Reynoso *et al.*, 2003). También se ha reportado que las lectinas pueden ser altamente alergénicas bajo ciertas condiciones (Tareq al-Ati, 2001).

Sin embargo, no todas las lectinas son tóxicas. Todas las células de mamíferos, células sanguíneas, semillas, granos y bulbos, incluyendo muchos componentes alimenticios no tóxicos contienen lectinas. Algunas de éstas, por ejemplo las del frijol rojo, son tóxicas y necesitan ser destruidas mediante calor antes de ser consumidas, pero otras como la lectina de tomate son aparentemente inofensivas cuando se ingieren crudas (Rhodes, 1999).

2.3.2.1 Toxicidad de las lectinas: Estudios clínicos

Aunque se ha descrito la actividad antitumoral de las lectinas, es importante considerar que la utilización de éstas en algunos casos puede presentar efectos adversos. La toxicidad de las lectinas se caracteriza por su capacidad de inactivar ribosomas y se clasifican como proteínas RIP II (Castillo y Adbullaev, 2005). Se han reportado varios casos de intoxicaciones en humanos a causa de la ingestión de frijoles crudos o parcialmente cocidos (Tareq al-Ati, 2001).

Existen estudios en donde se reportan efectos secundarios en la utilización de algunas lectinas como agentes antitumorales. La ricina, lectina de *Ricinus communis*, ha sido probada en diferentes rutas de administración en pacientes con tumores, reportando una variedad de resultados que van desde una gripa, fatiga, dolor muscular y ocasionalmente náusea y vómito. Dicha sintomatología inicia 4-6 h después de la administración, con una duración de 1-2 días (Castillo y Adbullaev, 2005).

En el caso de la lectina de *Abrus precatorius* (abrina) se reportaron dos muertes en la fase I de ensayos clínicos. Estos pacientes presentaron ataques generales y signos de toxicidad en el sistema nervioso central (Castillo y Adbullaev, 2005). En otro trabajo se reportaron tres casos clínicos en donde hubo reacciones anafilácticas severas después de la inyección de lectina de muérdago, dos de ellos en pacientes con cáncer y un tercero como una propuesta preventiva debido a antecedentes familiares de cáncer (Hutt *et al.*, 2001).

Debido a las propiedades de las lectinas como proteínas RIP, algunos estudios se han enfocado en el uso de éstas para la producción de inmunotoxinas contra el cáncer, donde la lectina o su parte activa es unida a un anticuerpo monoclonal, que posee un sitio receptor específico para células tumorales. Sin embargo, en los estudios clínicos de fase I y fase II se ha reportado que uno de los principales efectos adversos que limita la dosis para la terapia en pacientes con la inmunotoxina formada por la cadena A de la ricina es el síndrome vascular infiltrado, siendo éste el más frecuente y severo en pacientes que previamente fueron tratados con radioterapia (Castillo y Adbullaev, 2005).

2.3.2.2 Toxicidad de las lectinas: Estudios *in vivo*

a) Administración inyectada

Las lectinas en los animales producen un efecto más dañino cuando se suministran en forma inyectada que cuando son administradas de manera oral

(Badui, 1993). Cuando se administran de manera parenteral, pueden alterar la resistencia a infecciones o a tumores (Tareq al-Ati, 2001).

La ricina, abrina, crotina y toxinas relacionadas producen lesiones patológicas macroscópicas y microscópicas similares. La intensa inflamación con destrucción de las células epiteliales, edema, hiperemia y hemorragias en los tejidos linfáticos son muy comunes. Algunos signos de toxicidad pueden incluir degeneración grasa y necrosis hepática, lesiones degenerativas en el miocardio y la extensión y presencia de coágulos en los capilares de todos los órganos. En el sitio de la aplicación de la lectina frecuentemente se observan hemorragias locales. La ricina es mucho más tóxica cuando se inyecta que cuando se administra oralmente. Después de la inyección intravenosa de ricina, el tejido intestinal y el jugo intestinal de los conejos se vuelve altamente tóxico, indicando que se concentra en este tejido y en su secreción a la luz intestinal sin embargo, no se puede encontrar en la orina. Se ha descrito que la ricina inyectada posterior al nacimiento de los lechones puede aparecer en la leche de los cerdos de guinea que se encuentran lactando y después de la inyección de ricina en gatos se observó una disminución en los niveles de magnesio (Tareq al-Ati, 2001).

En animales inyectados con extracto de frijol rojo se ha observado la presencia de lesiones patológicas, además varios tejidos sufren de parenquimatositis, degeneración grasa y edema. En el hígado se puede observar necrosis local y cambios grasos. Se observan hemorragias en estómago, pared intestinal y otros órganos. La distensión de los vasos capilares puede estar presente en los riñones y en el miocardio con numerosos trombos (Tareq al-Ati, 2001).

En otro estudio en ratas mantenidas en nutrición parenteral total (NPT), se observó que la administración intravenosa de fitohemaglutinina (PHA) y de la aglutinina de cacahuate (PNA) revierten de manera consistente la atrofia gastrointestinal y el crecimiento pancreático asociado con la NPT (Jordinson *et al.*, 1999b)

En un estudio realizado por Reynoso y colaboradores en el 2003, se evaluó la toxicidad aguda *in vivo* de la lectina de frijol Tépari vía intraperitoneal en ratones hembras y machos de la cepa CD-1, encontrándose que con dosis de 20, 40 y 50 µg de lectina/g de peso corporal no se presentó ningún efecto adverso. Al incrementarse la dosis de lectina por arriba de 200 µg/g de peso corporal se presentó una disminución significativa del peso, además de mostrar inflamación abdominal severa y crecimiento hiperplásico del intestino; este efecto fue reversible y dependiente de las concentraciones de lectina. Esta alteración pudo ser causada por la presencia de la lectina en este órgano como fue sugerido por Ramsden y colaboradores en 1989, quienes encontraron un 10-12% de la dosis de ricina en el intestino después de 12 h. de haberse administrado por vía intravenosa. La aparente infección en el área de inyección de los ratones tratados pudiera estar relacionada con el hecho de que uno de los efectos tóxicos de las lectinas es la tendencia a contaminación bacteriana (Reynoso *et al.*, 2003).

Los cambios anatómicos más importantes producidos por la lectina de frijol Tépari se observaron en el timo y en el bazo. El timo presentó una disminución significativa de su peso mientras que el incremento en el tamaño del bazo concuerda con las observaciones previas realizadas por Soni y colaboradores en 1991, al estudiar la toxicidad de las lectinas de lenteja y de chícharo vía intraperitoneal. El incremento en el peso del bazo pudiera deberse a un estímulo de linfocitos requerida por el sistema de defensa del cuerpo para contrarrestar la administración intraperitoneal de la lectina de frijol Tépari (Reynoso *et al.*, 2003). Otra posibilidad pudiera atribuirse al efecto mitogénico que presentan las lectinas sobre los linfocitos por ejemplo, lectinas de *Phaseolus vulgaris* y de *Canavalia ensiformis* inducen mitogenicidad en células T, mientras que el mitógeno de carmín estimula ambos tipos de células (Hernández *et al.*, 1999)

La dosis letal media (LD₅₀) observada para la lectina de frijol Tépari administrada por vía intraperitoneal fue de 1100 y 1120 mg/kg de peso corporal para machos y hembras, respectivamente. En comparación con otras leguminosas como la ricina con una LD₅₀ de 0.028 mg/kg, se puede concluir

que la lectina de frijol Tépari tiene una toxicidad relativamente baja, por lo tanto podría ser utilizada en estudios que pueden potencialmente conducir a terapias contra el cáncer (Reynoso *et al.*, 2003). La inyección intraperitoneal del extracto crudo de frijol Tépari presentó efectos tóxicos sin embargo, al someter al autoclave un extracto crudo de proteína se produjo la pérdida de la toxicidad por vía intraperitoneal (Osman *et al.*, 2003).

b) Administración oral

La mayoría de los conocimientos de los efectos antinutricionales de las lectinas se derivan de experimentos en animales (Lajolo y Genovese, 2002). Diversos estudios en animales de laboratorio muestran que las lectinas ingeridas tienen un rango muy amplio de efectos que pueden ser relevantes en la formulación de nuevos tratamientos contra el cáncer, ya que muestran efectos de crecimiento-promoción sobre el intestino debido a que pueden afectar el crecimiento de células tumorales, producir cambios en la diferenciación, así como en la proliferación de células intestinales y colónicas, además de poseer una potente actividad antimetastásica (González de Mejía y Prisecaru, 2005). La inclusión de la fitohemaglutinina de frijol purificada en la dieta de ratones redujo el grado de crecimiento tumoral de una manera dependiente de la dosis, sugiriendo una competencia por los nutrientes entre el epitelio intestinal normal y el desarrollo del tumor (Lajolo y Genovese, 2002).

Debido a que ciertas lectinas son letales si se ingieren en altas concentraciones, es necesario evaluar su toxicidad sistémica para que las lectinas de nuevas fuentes se administren con propósitos terapéuticos (Reynoso *et al.*, 2003). Muchos de los efectos tóxicos de las lectinas son dependientes de su interacción con la flora intestinal (Rhodes, 1999) debido a que dichas proteínas son resistentes a la digestión, lo que puede causar lesiones e interferencia con la absorción de nutrientes (Tareq al-Ati, 2001). Además, las lectinas de la dieta pueden ser internalizadas y circular intactas en la sangre periférica (Rhodes, 1999). Al ser administradas de manera oral a los animales de experimentación causan síntomas gastrointestinales agudos, falta de crecimiento e incluso la muerte (Tareq al-Ati, 2001). Diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que el daño celular intestinal causado por lectinas de

frijol es debido a que la invertasa intestinal es fuertemente inhibida (Tareq al-Ati, 2001; Lajolo y Genovese, 2002). También se presenta una disminución en la actividad de la maltasa así como la interferencia con el transporte de glucosa (Lajolo y Genovese, 2002) y afección en la absorción de la vitamina B. Ha sido posible observar niveles elevados de urea, glucosa, bilirrubinas, transaminasas y deshidrogenada láctica en ratas alimentadas con ricina (Tareq al-Ati, 2001).

En experimentos cortos, las lectinas purificadas de frijol o de soya afectaron el crecimiento de ratas e indujeron alargamiento del intestino delgado causando daño al epitelio y estimulando hipertrofia e hiperplasia del páncreas. A dosis altas, las lectinas de frijoles pueden inducir pérdida de masa muscular (Lajolo y Genovese, 2002). Una dieta rica en soya cruda tiene un efecto de bocio. Esto se indica por el hecho de que las pérdidas fecales de tiroxina desde el intestino fueron mayores en animales alimentados con soya cruda que en los controles. La alimentación con soya cruda redujo la grasa y la absorción de ácidos grasos en pollos jóvenes. Se encontró que el frijol kidney crudo interfirió con la utilización de vitamina E en pollos (Tareq al-Ati, 2001).

La lectina PHA parece influenciar el tamaño, metabolismo y función de tracto gastrointestinal entero de las ratas. Puede inducir un crecimiento del intestino delgado dependiente de la dosis y del tiempo (alargamiento del tejido y adelgazamiento de la pared intestinal), incrementando el número de células de las criptas, además de producir hipertrofia del intestino grueso y del páncreas. Cuando se encuentra presente en la dieta de ratas jóvenes causa disminución del crecimiento además de cambios en la composición corporal, el peso dependiente de grasa es el más afectado siendo independiente de la dosis de lectina (Lajolo y Genovese, 2002). Otros autores señalaron que la exposición a PHA oral en ratas a dosis elevadas de 0.5-1 g/kg de peso corporal durante un periodo de 10 días resultó en una pérdida de músculo esquelético de aproximadamente el 30%. Además se produjeron cambios atróficos en el timo y bazo y una moderada reducción en el peso del hígado, principalmente a causa de la pérdida de lípidos y glucógeno, además de un ligero agrandamiento de los riñones (Pusztai y Bardocz, 1996).

La ingestión de una dieta con frijol rojo en ratas produjo disminución en el peso corporal (Radberg *et al.*, 2001), indujo el crecimiento del epitelio del intestino delgado, hiperplasia de las criptas y síntesis de DNA (Tareq al-Ati, 2001). La administración de altas dosis de la lectina purificada de frijol rojo produjo daños a la mucosa intestinal sin embargo, al administrarse a dosis menores (0.01 a 0.2 g/kg de peso corporal) no presentó manifestaciones o efectos antinutricionales en los animales y condujo a un crecimiento hiperplásico reversible dosis-dependiente de la pared intestinal. Se ha observado que la exposición durante 3 días a la preparación cruda del frijol rojo, que contiene aproximadamente el 25% de lectina, afectó a cerdos provocando la disminución del crecimiento y algunos desarrollaron diarrea posterior a la primera administración, recuperándose rápidamente al cabo de 24 h. Experimentos preliminares en ratas, en los que se comparó el efecto de la preparación cruda y la lectina pura de frijol rojo no mostraron ninguna diferencia entre ambos (Radberg *et al.*, 2001).

En ratas alimentadas con frijol navy se han observado diversos cambios morfológicos que incluyen un incremento de peso en los riñones y el corazón, atrofia pancreática acinar e hígado graso. Dichos cambios pueden ser atribuidos a la baja disponibilidad de aminoácidos esenciales y a la baja ingesta de alimento de los animales que consumieron la dieta de frijol crudo. Por ejemplo, las ratas alimentadas con frijol crudo desarrollaron múltiples lesiones histológicas (Tareq al-Ati, 2001).

Otros estudios han reportado que el frijol Tépari es muy tóxico en su estado crudo causando gran pérdida de peso, proporción de eficiencia negativa de proteínas, utilización neta negativa de proteínas, pobre digestión de proteínas y la muerte de ratas y ratones al cabo de 10 días (Osman *et al.*, 2003). Sotelo y colaboradores en 1983 reportaron que la administración intragástrica de un extracto salino de frijol Tépari a ratas causó destrucción extensa de las microvellosidades de las células intestinales además de romper el contorno del retículo endoplásmico. Estos autores atribuyen la toxicidad y el pobre valor nutritivo del frijol Tépari a las altas concentraciones de la fitohemaglutinina (Osman *et al.*, 2003).

Se observó que la absorción de glucosa estuvo muy disminuida al utilizar un asa intestinal ligada en ratas anestesiadas previamente, alimentadas con una dieta de frijol o habiéndoles dado la aglutinina de frijol negro mediante intubación estomacal. La hipoglicemia observada en ratas alimentadas con una dieta de frijol puede indicar una disminución en la absorción intestinal de glucosa. Además pequeñas cantidades de la aglutinina del frijol negro mostraron baja absorción de nutrientes y baja retención de nitrógeno (Tareq al-Ati, 2001).

Una alta ingesta de ciertas lectinas provoca cambios atróficos en el timo y el bazo, algunos de estos son irreversibles, con consecuencias potencialmente serias para el sistema inmune, especialmente la inmunidad mediada por células T. Similar a lo que sucede con el músculo esquelético, las lectinas también pueden afectar al corazón al reducir su peso y la síntesis de proteínas (Pusztai y Bardocz, 1996). Dentro de las lesiones patológicas que se describen con la ingesta o administración de lectinas en animales o en humanos se observa la presencia de parenquimatosis, degeneración grasa y edema de varios tejidos. También se describe que las lectinas se unen a los grupos glicosilados de las membranas de las células epiteliales del tracto digestivo impidiendo la absorción de nutrientes, además de la presencia de coágulos en los capilares de todos los órganos y hemorragias locales en el sitio de aplicación (Tareq al-Ati, 2001; Vasconcelos y Oliveira, 2004; Castillo y Adbullaev, 2005).

2.3.2.3 Toxicidad de las lectinas: Estudios *in vitro*

El efecto antitumoral *in vitro* e *in vivo* de las lectinas de las plantas aparentemente está asociado con la habilidad de las lectinas para modular el crecimiento, diferenciación, proliferación y apoptosis ya que la mayoría de estos procesos están mediados por receptores de superficie. Los efectos bioquímicos que se han reportado de las lectinas de las plantas en células malignas son la inhibición de la síntesis de DNA, RNA y proteínas (Castillo-Villanueva A., 2005).

Las lectinas de las plantas pueden producir mitogénesis de linfocitos, agregación de inmunoglobulinas e inducir la liberación de histamina desde los basófilos y mastocitos (Tareq al-Ati, 2001). Dichas propiedades mitogénicas permiten que se utilicen en estudios que tienen como base la proliferación de linfocitos en los cultivos (Hernández *et al.*, 1999). Sin embargo, a pesar de que en estudios *in vitro* se ha demostrado que poseen la capacidad para interactuar con células de la respuesta inmune, se ha observado que algunas lectinas poseen efectos inmunosupresores (Hernández *et al.*, 2005).

Se cree que la reacción que se presenta entre la aglutinina y la membrana celular da como resultado la alteración de la función celular, produciendo de este modo el efecto tóxico. Sin embargo, solo son afectadas aquellas células que presenten grupos específicos de receptores para las lectinas correspondientes. Por ejemplo, se sabe que se inducen cambios significativos en las propiedades de las membranas de las células hepáticas de ratas diabéticas. Los cambios pueden influir en propiedades celulares tales como la agregación y la deformación de eritrocitos, permeabilidad, resistencia eléctrica y propiedades de unión a mitógenos, hormonas y receptores de lipoproteínas. La unión de la concanavalina A y de la ricina puede estar disminuida en un 20-25% como resultado de una reducción en el contenido de glicoproteínas en la membrana celular (Tareq al-Ati, 2001).

Muchos estudios han mostrado una fuerte correlación entre ciertos modelos de unión a lectinas y su acción biológica en varios tumores. Fik y colaboradores en el 2001 describieron el efecto *in vitro* de las lectinas sobre células normales y cancerígenas. Las lectinas de leguminosas inhiben la adhesión celular, la proliferación y la formación de colonias, causan hemaglutinación y tienen efectos citotóxicos en células tumorales humanas (González de Mejía y Prisecaru, 2005).

Se ha encontrado que la lectina de trigo (WGA) induce citotoxicidad mediada por macrófagos en contra de las células de cáncer de vejiga T-24. Los macrófagos alveolares son fagocitos, que se encuentran principalmente en los alveolos pulmonares, son un importante mecanismo de defensa antitumoral de los pulmones, debido a que se pueden unir a las células blanco, sin embargo,

son incapaces de inducir histólisis. Algunos estudios han revelado que la actividad antitumoral de los macrófagos alveolares puede ser inducida por la WGA. Otro hallazgo resultó al determinar que la sensibilidad de 6 líneas tumorales humanas dependía del número de receptores en la superficie para WGA. El mecanismo por el cual se lleva a cabo es aún desconocido, la unión inducida por WGA entre los macrófagos alveolares con las células tumorales puede incrementar la sensibilidad a la citotoxicidad (Tareq al-Ati, 2001). Otros autores señalan que la WGA ha probado ser altamente tóxica en estudios *in vitro* sobre las células de carcinoma pancreático humano, en las cuales se ha observado la internalización de la lectina. La exposición a la WGA indujo la condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y liberación del DNA, la cual es consistente con apoptosis (González de Mejía y Prisecaru, 2005). La actividad antitumoral de los monocitos sanguíneos puede ser inducida por la WGA, siendo capaces de producir citotoxicidad a 4 diferentes líneas celulares tumorales humanas: carcinoma de vejiga T-24, melanoma A-375, carcinoma renal ACHN, y glioblastoma U373MG (Tareq al-Ati, 2001). Además, se ha encontrado que la WGA incrementa la habilidad citotóxica de los macrófagos peritoneales de murino. Sin embargo, la concanavalina A, PHA, PWM y SBA no fueron capaces de producir monocitos con actividad en contra de tumores (Tareq al-Ati, 2001).

Se han realizado estudios con la VFA (aglutinina de haba, *Vicia faba*) en la proliferación celular, la incorporación de aminoácidos y en la diferenciación de 3 líneas celulares derivadas de adenocarcinoma colorrectal (LS174T, SW1222 y HT29). En las 3 líneas celulares se observó agregación e incremento en la diferenciación morfológica. También se describe la diferenciación de las líneas celulares de una manera dosis-dependiente y reversible, que no está asociada a citotoxicidad, con un aumento de la incorporación de aminoácidos (Castillo-Villanueva A., 2005).

García-Gasca (2002), mostró que una fracción proteica semipura proveniente del frijol Tépari, obtenida mediante cromatografía de filtración en gel presentó efectos importantes sobre la proliferación celular de fibroblastos transformados 3T3/v-mos asociados a la presencia de una lectina en la fracción

proteínica estudiada. Los estudios con lectina de frijol Tépari han demostrado que posee un efecto citotóxico diferencial sobre células normales y cancerígenas en función de las concentraciones utilizadas (Hernández-Rivera *et al.*, 2007). Posee un efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células cancerosas SW 480 y se sabe que dicha inhibición continúa aún después de 48 h de que las células fueron expuestas a la lectina. Asimismo, se observó un efecto inhibitorio de las lectinas sobre la capacidad de formar colonias (Valadez-Vega *et al.*, 2007). La lectina de frijol Tépari es capaz de afectar de manera diferencial la sobrevivencia de las células de cáncer humano, las células más sensibles al efecto citotóxico de esta lectina son las células de cáncer de colon CaCo2 y de cáncer de mama glandular MCF-7 (Castañeda-Cuevas *et al.*, 2007; López-Martínez *et al.*, 2006)

III. JUSTIFICACIÓN

La lectina de frijol Tépari estudiada en nuestro laboratorio ha mostrado un efecto citotóxico diferencial, afectando especialmente a células de cáncer de colon *in vitro*. Una de las siguientes etapas del proyecto para evaluar el potencial de la lectina como agente terapéutico contra el cáncer de colon consiste en la realización de estudios *in vivo*, sin embargo, es necesario realizar primero pruebas de toxicidad. Actualmente no existen estudios sobre la toxicidad aguda y subcrónica por vía oral de la lectina de frijol Tépari por lo tanto, la obtención de estos parámetros de toxicidad es de gran importancia para su utilización en estudios posteriores de investigación sobre cáncer.

IV. HIPÓTESIS

La administración de una fracción concentrada en lectina (FCL) de frijol Tépari por vía intragástrica presenta baja toxicidad y es posible obtener una dosis segura para pruebas *in vivo*.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estudiar la toxicidad aguda y subcrónica de la administración oral de una fracción concentrada en lectina (FCL) de frijol Tépari en ratas Sprague Dawley.

5.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la actividad aglutinante de la FCL de frijol Tépari obtenida por cromatografía de exclusión molecular.
2. Evaluar la toxicidad aguda de diferentes dosis de la FCL de frijol Tépari en ratas Sprague-Dawley.
3. Evaluar la toxicidad subcrónica de la dosis inocua más alta obtenida en el ensayo de toxicidad aguda en ratas Sprague-Dawley, con énfasis en sus efectos sobre tracto digestivo.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio

Estudio longitudinal, comparativo y observacional.

6.2 Obtención de la FCL.

El frijol Tépari fue adquirido en un mercado local de la ciudad de Hermosillo, Sonora en el año 2006. La FCL liofilizada se obtuvo mediante cromatografía de exclusión de peso molecular en el Laboratorio de Mecanismos de Defensa de Plantas del CINVESTAV Irapuato a cargo del Dr. Alejandro Blanco Labra.

Con la finalidad de comparar la actividad hemaglutinante del frijol Tépari respecto a frijol común se determinó la actividad de lectinas de 7 variedades diferentes de *Phaseolus vulgaris*, 4 variedades comerciales (Flor de Mayo, Negro, Peruano y Bayo) y 3 variedades experimentales proporcionadas por el INIFAP-Celaya (Negro 8025, Higuera y Pinto Durango) así como una variedad de *Phaseolus acutifolius*. Brevemente, las semillas de frijol se molieron, se desengrasaron con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1) en relación de 1 gramo de harina por 4 mL de solución desengrasante y a partir de la harina seca y tamizada se obtuvo el extracto crudo de proteína mezclando 1 g de harina en 4 mL de agua tridestilada en agitación constante durante 12 h a 4^o C. La actividad de lectina de la FCL de frijol Tépari se determinó a partir de una solución de 1 mg de liofilizado/mL de agua tridestilada.

A cada extracto y a la FCL se les determinó la concentración de proteína a 595 nm por el método de Bradford (1976). La cuantificación de la actividad aglutinante de la lectina se realizó mediante el método de Jaffé (1980). Brevemente; se colocaron 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 μ L de suspensión de eritrocitos de conejo al 2% previamente fijados con glutaraldehído (Turner y Liener, 1975) y se incubó a 37° C durante 3 h. 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.

6.3 Estudio de toxicidad aguda oral

Las pruebas de toxicidad en animales se basan en dos principios fundamentales. Primero, los efectos de las sustancias químicas que se observan en los animales de laboratorio, con las debidas limitaciones, se aplican a la toxicidad en humanos. En el segundo principio se señala que la exposición de los animales de experimentación a los agentes tóxicos en dosis elevadas es un método necesario y válido para describir posibles peligros para los seres humanos (Klaassen, 1991). Todas las pruebas toxicológicas en animales fueron llevadas a cabo observando los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” y de la FDA S1B “Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals”.

La primera prueba para determinar la toxicidad de una sustancia es la prueba de toxicidad aguda para la estimación de la dosis letal media (LD₅₀) (Klaassen, 1991). La LD₅₀ fue introducida inicialmente en 1927 por Trevan para probar sustancias utilizadas por humanos como la insulina y el digital. En 1970 fue definida como la prueba cuyo objetivo es encontrar la dosis letal única de una sustancia, la cual provoca la muerte del 50% de los animales en un grupo

de prueba. De esta forma se ha aceptado como la base de la clasificación y comparación de sustancias tóxicas y se ha convertido en un requisito para varias corporaciones regulatorias que conciernen a nuevas drogas, aditivos de alimentos, entre otros (Botham, 2004). La sustancia en cuestión generalmente se administra a ratones o ratas (por vía oral o intraperitoneal) en distintas dosis, usualmente cuatro o cinco. Se registra el número de animales que mueren durante los 14 días posteriores a la administración única de las dosis estudiadas. Los animales se examinan para detectar signos de intoxicación, letargia, alteraciones de la conducta y morbilidad (Klaassen, 1991).

En este caso, se utilizaron las dosis previamente establecidas de acuerdo a la guía clásica de la toxicidad aguda (OECD 423, 2001) y a la disponibilidad de lectina. Se incluyeron 1 grupo control y 4 grupos con tratamiento (5, 50, 300 y 2000 mg/kg de peso). Se utilizaron 3 ratas Sprague Dawley por cada grupo, hembras sanas, nulíparas y no embarazadas, de 8 semanas de edad. Se mantuvieron a una temperatura aproximada de 22° C con una humedad relativa de al menos el 30%. La iluminación fue artificial con ciclos de luz-oscuridad de 12 h cada uno. Los animales se colocaron en jaulas individuales. La alimentación fue en base a una dieta convencional para roedores de laboratorio y agua *ad libitum*. Se seleccionaron los animales al azar y se marcaron para permitir su identificación individual. Los animales permanecieron en sus jaulas por al menos 5 días previos a la administración de la dosis para aclimatarlos a las condiciones del laboratorio.

Los animales fueron puestos en ayuno durante toda la noche previa a la administración de la dosis y se dejó el agua a libre demanda. Posterior al periodo de ayuno, cada uno de los animales fue pesado y se calculó la dosis a administrar en base al peso corporal. El concentrado de lectina se administró como dosis única por vía intragástrica en un volumen constante (el volumen máximo de líquido que se administró en una sola dosis no excedió de 1 mL/100 gr de peso corporal). La alimentación se reinició en un periodo de 3-4 h posterior a la administración. Los animales se observaron de manera individual por al menos una vez durante los primeros 30 min posteriores a la administración y periódicamente durante las primeras 24 h (con especial

atención durante las primeras 4 h) y posteriormente diariamente hasta completar un total de 14 días. Todas las observaciones fueron registradas sistemáticamente de forma individual.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se les realizó una necropsia gruesa en la que se observaron, se disectaron y se pesaron los siguientes órganos: hígado, riñones, bazo, timo, estómago, corazón, pulmones, intestino delgado y colon. En el caso de estómago, intestino delgado y colon, previo al registro de peso, se colocaron en recipientes con solución salina fría, se disectaron longitudinalmente para realizar la limpieza (eliminar restos de alimento y heces), se pesaron y se colocaron en frascos de formol al 10% para su procesamiento. Posteriormente, las muestras fijadas fueron incluidas en parafina con el fin de permitir su corte y teñidas con hematoxilina y eosina para permitir su estudio al microscopio.

6.4 Estudio de toxicidad subcrónica oral

Después de haber obtenido la LD₅₀ se estudia el efecto del compuesto tóxico a través de la exposición subcrónica durante 30-90 días. Durante este periodo se siguen una variedad de parámetros y al final los órganos y tejidos de los animales son examinados histopatológicamente. Este estudio provee información sobre los efectos tóxicos principales que se presenten tras la exposición de dosis repetidas en un periodo de tiempo prolongado, indicando los órganos blanco y la posible acumulación en el organismo (Botham, 2004).

Para el estudio de toxicidad subcrónica se incluyó un grupo control y 3 grupos con tratamiento. Se utilizó la dosis máxima obtenida en el estudio de toxicidad aguda que no haya ocasionado efectos tóxicos y dos dosis inferiores (5, 10 y 50 mg/kg de peso). Se utilizaron 20 ratas Sprague Dawley de 8 semanas de edad (10 hembras sanas, nulíparas y no embarazadas y 10 machos) para cada grupo experimental. Se mantuvieron a una temperatura aproximada de 22°C, con una humedad relativa de al menos el 30%. La iluminación fue artificial con ciclos de luz-oscuridad de 12 h cada uno. Los animales se colocaron en jaulas individuales, la alimentación fue una dieta convencional para roedores de laboratorio y agua *ad libitum*. Se seleccionaron

a los animales al azar y se marcaron para permitir su identificación individual. Los animales permanecieron en sus jaulas por al menos 5 días previos a la administración de la dosis para aclimatarlos a las condiciones del laboratorio (OECD 407, 2006).

El concentrado de lectina se administró diariamente en un volumen constante por vía intragástrica. Cada uno de los animales fue pesado semanalmente y se determinó diariamente el consumo de alimento. Los animales se observaron de manera individual hasta completar un periodo de 30 días. Fueron sacrificados por dislocación cervical y sujetos a una necropsia gruesa, en donde se disectaron los diferentes órganos (hígado, riñones, bazo, timo, estómago, corazón, pulmones, intestino delgado y colon), se registró el peso de cada uno de ellos y posteriormente se colocaron en frascos de formol al 10%. En el caso de estómago, intestino delgado y colon, previo al registro de peso, se colocaron en recipientes con solución salina fría, se disectaron longitudinalmente para realizar la limpieza (eliminar restos de alimento y heces), posteriormente se pesaron y se colocaron en frascos de formol al 10%. En el laboratorio de patología se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente en el estudio de toxicidad aguda para la observación al microscopio.

En los estudios de toxicidad aguda y subcrónica se tomaron en cuenta las siguientes variables: peso semanal, consumo de alimento diario, alteraciones macroscópicas, alteraciones internas *post mortem* y peso de órganos, disección de intestino delgado y grueso y análisis histopatológicos. En el estudio de toxicidad aguda, además de lo descrito anteriormente, se tomó en cuenta la sintomatología durante el estudio y la tasa de sobrevivencia.

6.5 Análisis estadístico

Se realizó una ANOVA para comparación de medias entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) o cada tratamiento respecto a su control (Dunnett, $p \leq 0.05$) utilizando el programa SPSS versión 14.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 ACTIVIDAD AGLUTINANTE DE LA FRACCIÓN CONCENTRADA DE LECTINA DE FRIJOL TEPARI

Previo a las pruebas de toxicidad se cuantificó la proteína y la actividad específica de aglutininas de diferentes variedades de frijol, entre ellas 3 variedades experimentales, 4 variedades comerciales y una variedad de frijol Tépari. En la Tabla 1 se observa que los extractos crudos de frijol Flor de Mayo, Tépari y Negro comercial presentaron las mayores actividades aglutinantes. Lo anterior muestra que el frijol Tépari es una variedad con altas cantidades de lectina y/o con lectinas con alta actividad biológica (Sheerens *et al.*, 1983; González de Mejía *et al.*, 2005). Este tipo de frijol muestra mayor resistencia a plagas que el frijol común y se sabe que las lectinas son proteínas de defensa en las plantas, sin embargo, se desconoce si el grado de resistencia puede relacionarse con la cantidad o el tipo de lectina que contiene (Pratt *et al.*, 1990). Además, este frijol contiene una mayor cantidad de proteína, 25% en promedio (Albores, *et al.*, 1987; Intriago-Ortega, 1985; Idouraine y Yensen, 1991; Hamama y Bhardwaj, 2002) comparado con frijol común con un 19% (Instituto Nacional de Cancerología e Instituto Nacional de Nutrición, 1996). Considerando que el contenido de lectina en frijol es del 2 al 10% del total de proteína (Castillo y Adbullaev, 2005), el frijol Tépari pudiera presentar mayores cantidades de lectina que otras variedades. Es interesante hacer notar que las variedades experimentales Higuera y Pinto Durango presentaron las menores actividades aglutinantes ($p \leq 0.05$), posiblemente por las condiciones agronómicas en las que se cultivan. Por su contenido de lectinas, será importante considerar el estudio de frijol Flor de Mayo y Negro como fuentes de dicha glicoproteína.

Posteriormente se determinó la actividad aglutinante específica promedio de la FCL obtenida mediante cromatografía de exclusión de peso molecular, la cual fue de 10,578 UA/mg de proteína. En estudios previos se han observado actividades aglutinantes de hasta 12339 UA/mg de proteína (datos no reportados), lo que muestra que en la FCL se concentra aproximadamente 8 veces el contenido de lectina. Es importante mencionar que la determinación

Tabla 1. Actividad aglutinante de extractos crudos de proteína obtenidos de diferentes variedades de frijol.

VARIEDAD DE FRIJOL	UA/mg PROTEÍNA
FLOR DE MAYO	1428.14 \pm 401.02 b
TEPARI	1422.17 \pm 28.22 b
NEGRO	1377.89 \pm 192.41 b
PERUANO	845.68 \pm 95.86 a, b
NEGRO 8025	829.5 \pm 126.55 a, b
BAYO	795.48 \pm 58.71 a, b
HIGUERA	696.1 \pm 13.52 a
PINTO DURANGO	535.85 \pm 47.89 a

Las letras minúsculas indican diferencia estadística significativa (Tukey, $p \leq 0.05$)

de la actividad aglutinante característica de las lectinas se basa en la afinidad que presente la glicoproteína por proteínas de membrana de los eritrocitos utilizados. Dicha afinidad puede cambiar entre eritrocitos de especies distintas e, incluso, de individuos diferentes, por lo que las actividades reportadas para una misma lectina pueden variar. En este estudio se utilizaron eritrocitos de conejo de un mismo individuo y lote, lo que hace posible la comparación entre los resultados obtenidos. Sin embargo, es importante hacer notar la necesidad de implementar métodos específicos para la cuantificación de la lectina de frijol Tépari, como aquellos basados en inmunodetección.

7.2 ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA ORAL DE LA FCL.

Se ha observado que algunas lectinas administradas por vía oral a animales de experimentación causan síntomas gastrointestinales agudos, falta de crecimiento (Lajolo y Genovese, 2002) e incluso la muerte (Tareq al-Ati, 2001). Después de la administración oral de las diferentes dosis únicas de la FCL se observaron signos clásicos de toxicidad por lectinas, como aletargamiento, piloerección y diarrea durante las primeras 48 horas con las dosis más altas probadas (300 y 2000 mg/kg de peso corporal) sin embargo, posteriormente los animales presentaron una recuperación total. En este caso se presentaron los signos de toxicidad a nivel gastrointestinal pero no se observó falta de crecimiento ni la muerte de los animales en estudio, lo que sugiere baja toxicidad de la lectina estudiada con respecto a otras. Por ejemplo, la ricina por vía oral, al cabo de 12 horas, presenta síntomas como náusea, vómito, diarrea y dolor abdominal y puede progresar a hipotensión, falla hepática, disfunción renal y muerte a causa de falla orgánica múltiple o colapso cardiovascular (Audi *et al.*, 2005). La ingestión de ricina provoca hemorragias del tracto gastrointestinal con necrosis del hígado, bazo y riñones. La LD₅₀ por vía oral se ha determinado en 20 mg/kg a 85 horas (Patocka, <http://www.asanltr.com>).

Es bien sabido que un mismo agente tóxico puede producir efectos muy diferentes dependiendo de la ruta por la cual el sistema biológico lo absorba (Valle y Lucas, 2000). La lectina de frijol Tépari por vía intraperitoneal en dosis de 700 µg de lectina/g de peso corporal produjo diarrea en ratones CD-1,

además de que por esta vía de administración la LD₅₀ fue de 1100 y 1120 mg de lectina/kg de peso corporal para machos y hembras, respectivamente (Reynoso *et al.*, 2003). Lo descrito previamente sugiere que la FCL administrada de manera oral es menos tóxica que por vía intraperitoneal. Asimismo, al comparar con otras lectinas, se observa que la lectina de frijol Tépari es poco tóxica. Por ejemplo, la ricina ha mostrado un LD₅₀ de 3 a 5 µg/kg en 60 horas por inhalación, 5 µg/kg en 90 horas por vía intravenosa, 22 µg/kg en 100 horas por vía intraperitoneal, 24 µg/kg en 100 horas por vía subcutánea. La abrina, por su parte, es 75 veces más potente que la ricina (Patocka, <http://www.asanltr.com>).

El consumo diario de alimento no presentó variaciones significativas ($p \leq 0.05$) entre los grupos de estudio. El peso corporal de las ratas tampoco mostró cambios ($p \leq 0.05$) aún con las dosis más altas probadas (300 y 2000 mg/kg de peso corporal) (Figura 1). La administración de esta lectina en un estudio de toxicidad aguda por vía intraperitoneal mostró que, conforme la dosis se incrementó, se presentó una disminución significativa en el peso de los animales, pero para algunas de las dosis utilizadas los animales fueron capaces de recuperarse (Reynoso *et al.*, 2003).

Al realizarse la necropsia no se observaron alteraciones macroscópicas. Se determinó estudiar el efecto de la FCL sobre órganos blanco de lectinas (sistemas digestivo e inmune) y de detoxificación (hígado y riñón). Se tomó el peso de los órganos y se realizaron análisis histopatológicos en: colon e intestino delgado (Figura 2), hígado y riñones (Figura 3) y timo y bazo (Figura 4). Asimismo se registró el peso de corazón y estómago (Figura 5). No se observaron diferencias en el peso de los órganos, excepto en riñones en los que se observó una disminución ($p \leq 0.05$) en los grupos de 50 y 300 mg con respecto al grupo control. Algunos autores han señalado que con la administración oral de PHA a dosis de 0.5-1 g/kg se presenta un ligero agrandamiento de los riñones, además de una moderada reducción en el peso de hígado (Pusztai y Bardocz, 1996). Sin embargo, aún a dosis elevadas dichos efectos no fueron observados para la toxicidad aguda de la FCL.

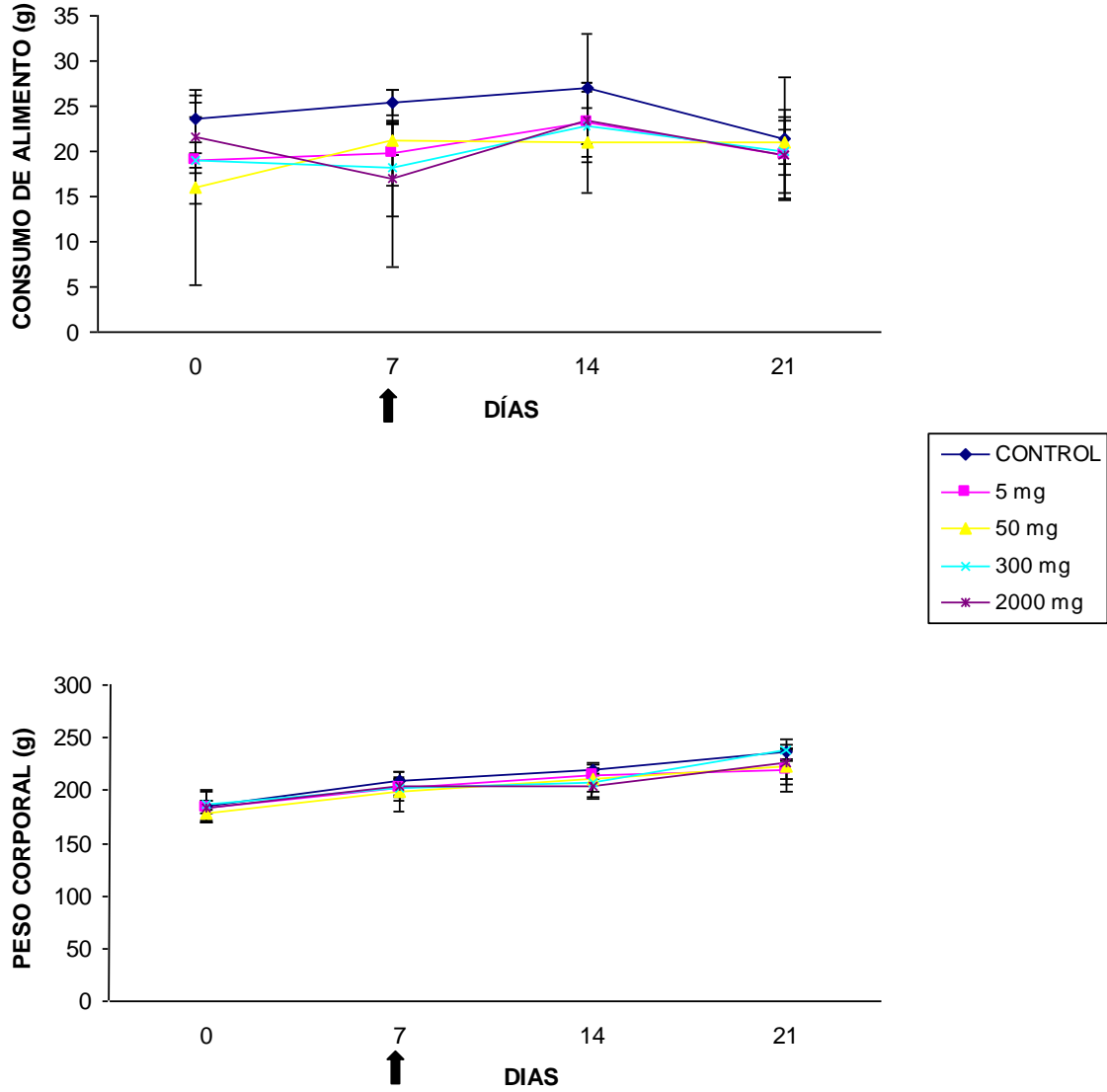


Figura 1. Consumo de alimento y peso corporal de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de FCL en el estudio de toxicidad aguda. El consumo de alimento (A) y el peso de los animales (B) fue registrado semanalmente. La flecha indica el momento en el que se administraron las diferentes dosis de FCL por lo que los animales permanecieron en ayuno de 12 horas. No se observaron diferencias estadísticas del consumo de alimento o peso de los animales entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) o respecto al control (Dunnett $p \leq 0.05$).

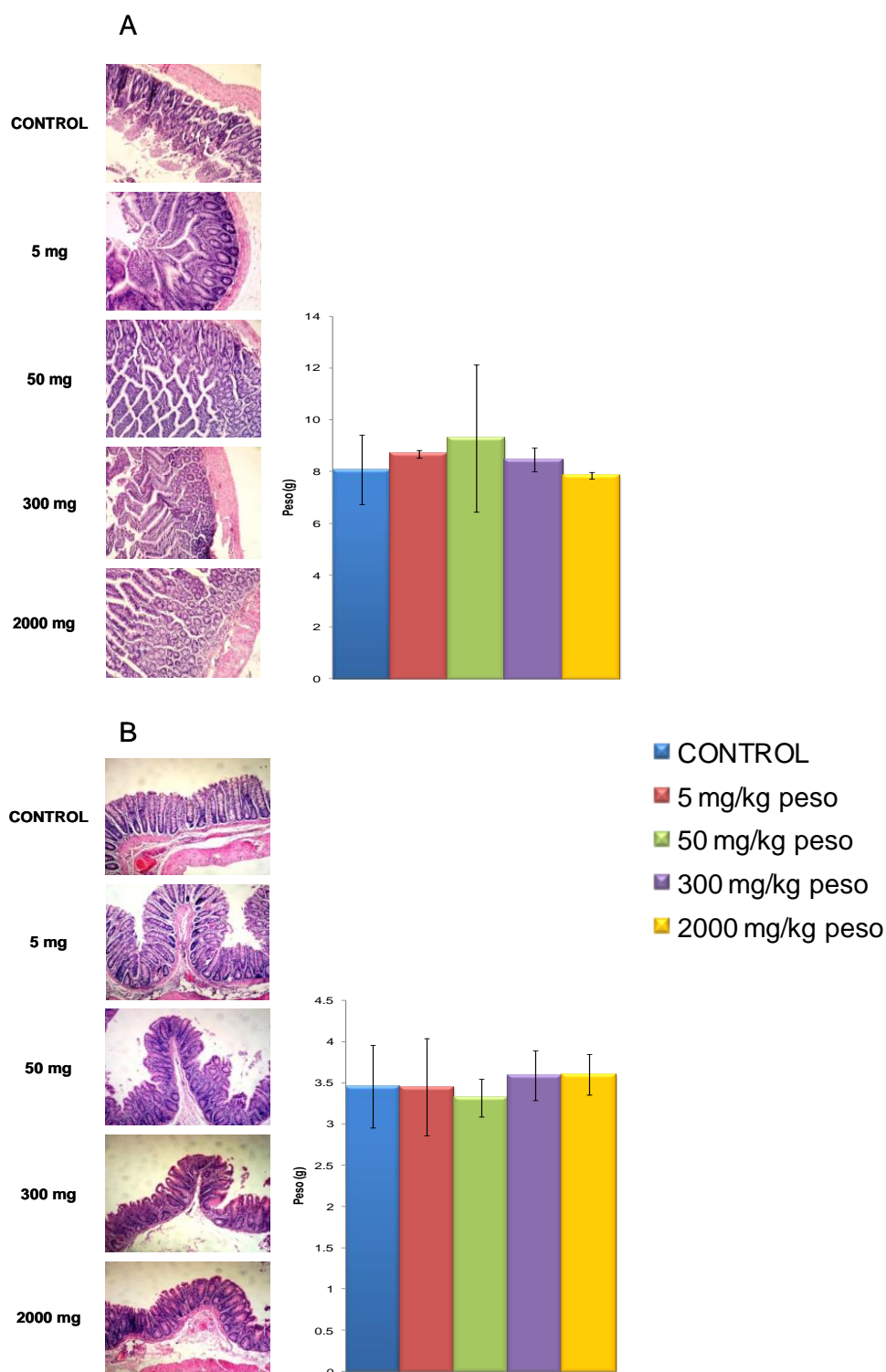


Figura 2. Análisis histopatológico y peso de intestino delgado y colon de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de FCL en el estudio de toxicidad aguda. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico de intestino delgado (A) y colon (B), se pesaron y se fijaron el formol. Posteriormente se realizaron los cortes histopatológicos y se observaron a un aumento de 40x. No se observaron diferencias estadísticas del peso de los órganos entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) o respecto al control (Dunnnett $p \leq 0.05$).

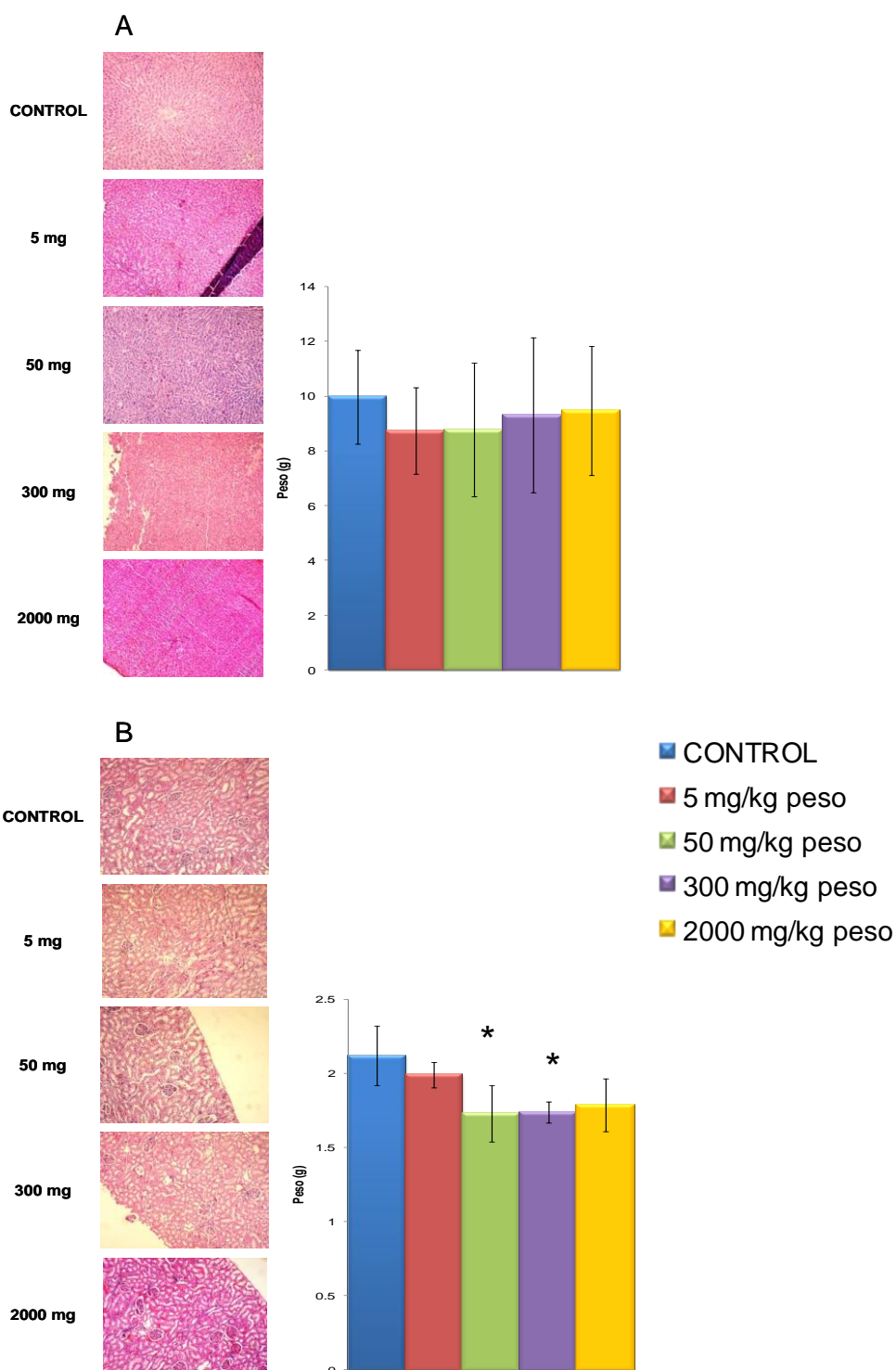


Figura 3. Análisis histopatológico y peso de hígado y riñones de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de FCL en el estudio de toxicidad aguda. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico de hígado (A) y riñones (B), se pesaron y se fijaron el formol. Posteriormente se realizaron los cortes histopatológicos y se observaron a un aumento de 40x. No se observaron diferencias estadísticas del peso de los órganos entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). Los asteriscos muestran diferencias estadísticas del peso de los órganos respecto al control (Dunnett $p \leq 0.05$).

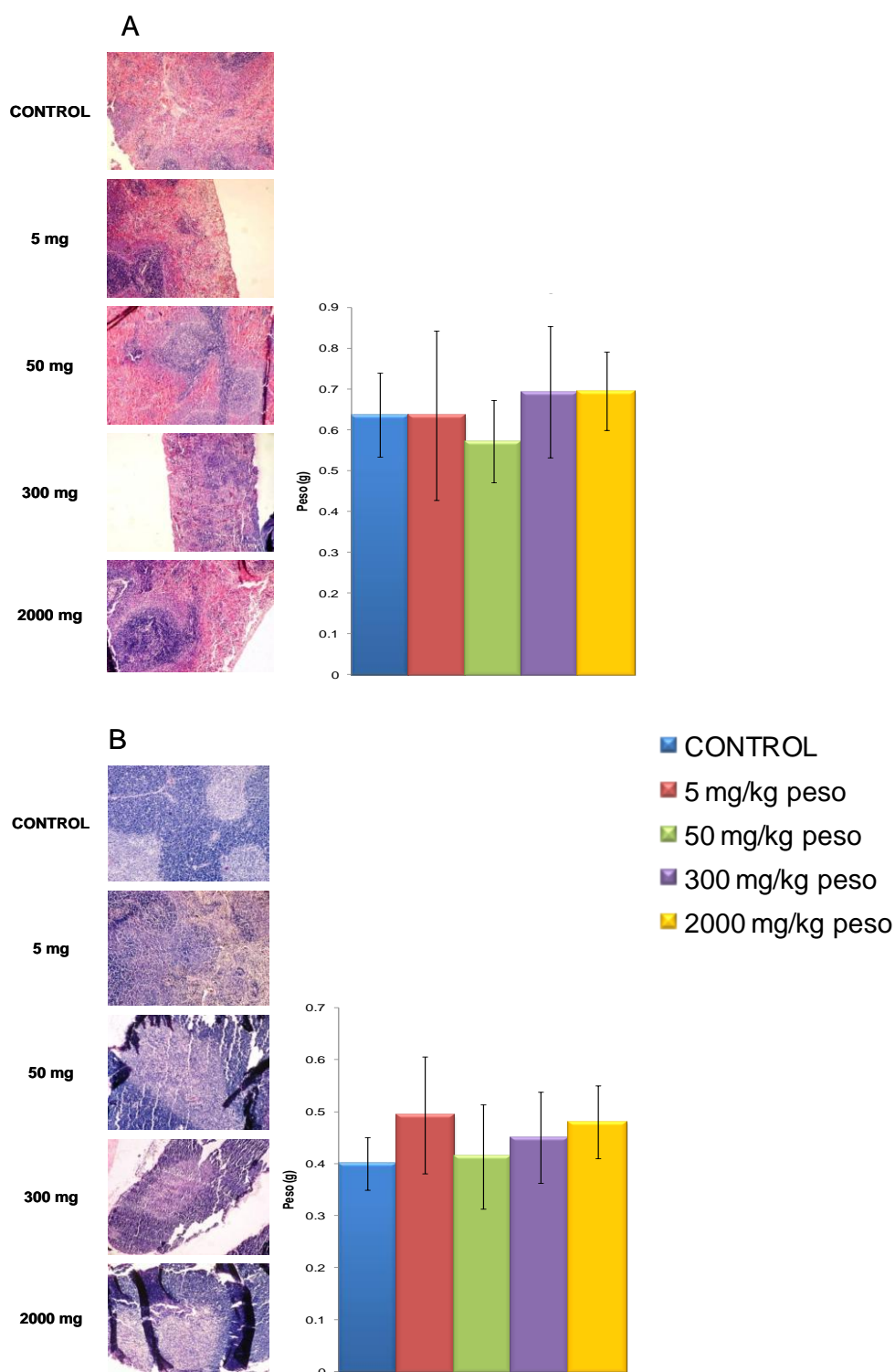


Figura 4. Análisis histopatológico y peso de bazo y timo de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de FCL en el estudio de toxicidad aguda. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico del bazo (A) y timo (B), se pesaron y se fijaron el formol. Posteriormente se realizaron los cortes histopatológicos y se observaron a un aumento de 40x. No se observaron diferencias estadísticas del peso de los órganos entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) o respecto al control (Dunnett $p \leq 0.05$).

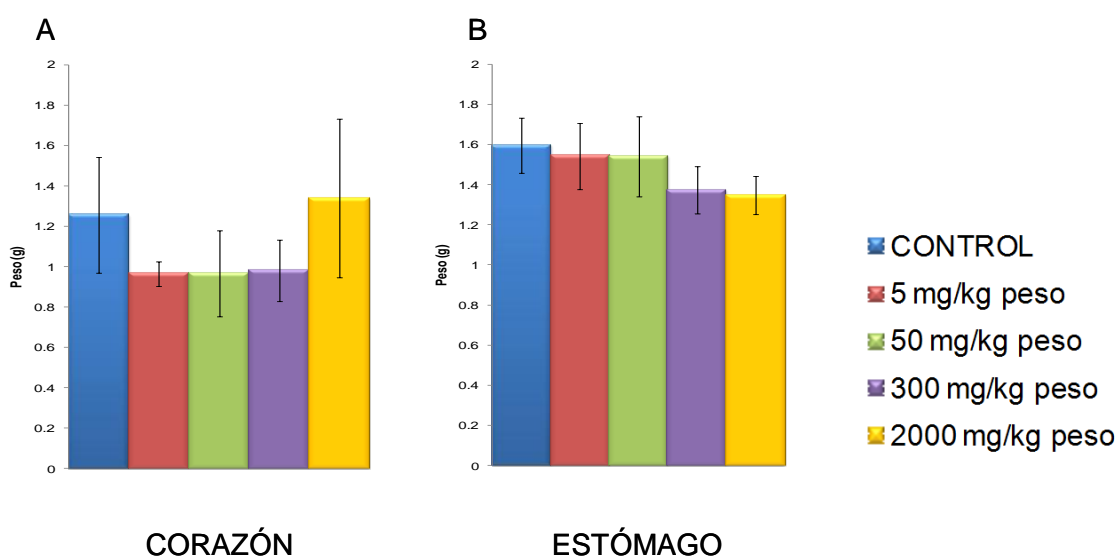


Figura 5. Peso de corazón y estómago de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de FCL en el estudio de toxicidad aguda. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico de corazón (A) y estómago (B) y se pesaron. No se observaron diferencias estadísticas del peso de los órganos entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) o respecto al control (Dunnnett $p \leq 0.05$).

En el caso de la toxicidad aguda de la lectina de frijol Tépari por vía intraperitoneal, se ha reportado un aumento del peso del bazo (grupo de hembras y machos), una marcada disminución en el peso del timo (grupo de los machos) y una disminución del peso del hígado y riñones en los animales tratados con la lectina (Reynoso *et al.*, 2003). En este caso también se presentó una disminución del peso de los riñones y será necesario confirmar si este efecto se debe a alguna alteración funcional o sólo a variación individual.

Respecto al efecto sobre epitelio intestinal, se sabe que las lectinas que se unen fuertemente a las membranas celulares del borde en cepillo actúan como factores de crecimiento intestinales muy potentes (Pusztai y Bardocz, 1996). Estudios con segmentos de intestino aislados de ratas han demostrado que la PHA interfiere con la absorción de glucosa y que puede unirse a las membranas de las células epiteliales del intestino delgado, dependiendo del patrón de glicosilación, provocando severos daños en la mucosa intestinal de ratas y cerdos (León Toro *et al.*, 2007). Por otro lado, algunas lectinas no resisten el proceso hidrolítico de las enzimas digestivas, por lo tanto no presentan propiedad tóxica, como es el caso de las lectinas de garbanzo (Valle y Lucas, 2000). En este caso, la FCL no mostró alteraciones en intestino grueso y delgado, será necesario determinar si la baja toxicidad está relacionada con una pobre unión al epitelio intestinal (Pusztai y Bardocz, 1996) así como su resistencia a la digestión y tiempo de permanencia en el tracto intestinal.

El estudio histopatológico mostró alteraciones en pulmón (Figura 6) tales como focos neumónicos en mayor o menor grado. Sin embargo, dichas alteraciones no pueden atribuirse al efecto de la FCL ya que se observaron en el todos los animales en estudio, incluidos los animales control. Lo anterior pudo deberse a algún agente externo que afectó a todos los animales antes o durante el estudio. Será importante determinar la fuente que propicia dicho efecto a fin de controlarla.

Por otro lado, resultados recientes obtenidos por nuestro grupo de investigación han encontrado que la FCL en dosis de 50 mg/kg de peso aumenta significativamente el número de leucocitos en más del 50%, mientras

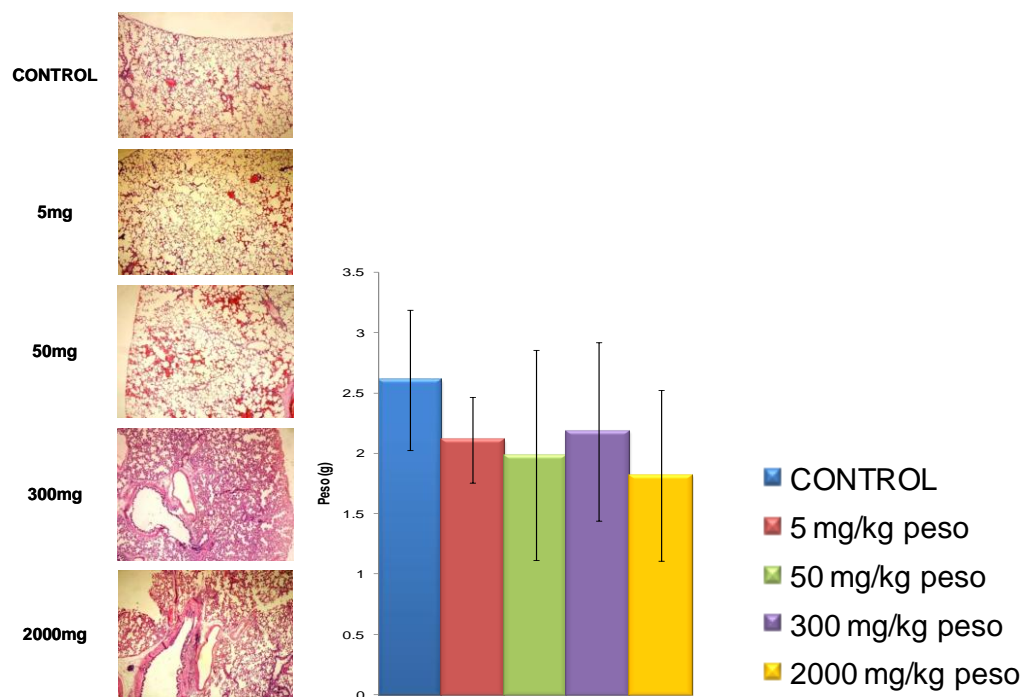


Figura 6. Análisis histopatológico y peso de pulmones de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de FCL en el estudio de toxicidad aguda. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico de los pulmones, se pesaron y se fijaron el formol. Posteriormente se realizaron los cortes histopatológicos y se observaron a un aumento de 40x. No se observaron diferencias estadísticas del peso de los órganos entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) o respecto al control (Dunnett $p \leq 0.05$).

que la dosis más alta probada (2000 mg/kg de peso) provocó una disminución del 25% (datos no reportados). Lo anterior sugiere un efecto directo de la FCL sobre sistema inmune, que sugiere que la dosis de 50 mg/kg de peso presenta efectos biológicos típicos de algunas lectinas, tal como el efecto mitogénico sobre células del sistema inmune (Hernández *et al.*, 1999; Tareq al-Ati, 2001). Por lo anterior, y debido a que la dosis de 50 mg/kg de peso no presentó efectos tóxicos o adversos, se determinó utilizarla como dosis máxima en el estudio de la toxicidad subcrónica por vía oral.

7.3 ESTUDIO DE LA TOXICIDAD SUBCRONICA ORAL DE LA FCL

Se administraron 3 dosis de la FCL (5, 10 y 50 mg/ kg de peso corporal) para el estudio de toxicidad subcrónica. Únicamente se observó una disminución ($p \leq 0.05$) al séptimo día con la dosis más baja probada para el caso del consumo de alimento de machos. En todos los demás casos no se observaron diferencias en el consumo de alimento y peso corporal en hembras (Figura 7) y machos (Figura 8). Se ha observado que la exposición oral a diferentes tipos de lectinas de plantas tales como PHA (*Phaseolus vulgaris*), SBL (*Glycine maxima*), SNA I y SNA II (*Sambucus nigra*), GNA (*Galanthus nivalis*) y VLF (*Vicia faba*) durante el transcurso de 10 días, puede retardar el crecimiento de las ratas y producir crecimiento del intestino delgado pero este efecto no se observó con la lectina de *Vicia faba* (VLF) (Pusztai *et al.*, 1990). Por otro lado, en algunos estudios del efecto de las lectinas sobre el intestino han revelado que la administración oral de dosis bajas de lectinas pueden tener efectos benéficos sobre la eficiencia en la digestión y absorción del intestino (Pusztai y Bardocz, 1996).

Al realizar la necropsia no se observaron alteraciones macroscópicas evidentes en ninguno de los órganos estudiados en las ratas de ambos sexos. No se observaron alteraciones histológicas en colon e intestino delgado de las ratas hembra (Figura 9) sin embargo, el peso del intestino delgado presentó una disminución ($p \leq 0.05$) en el grupo de 5 mg/kg con respecto a los diferentes tratamientos. El mismo efecto fue observado para el grupo de ratas macho (Figura 10).

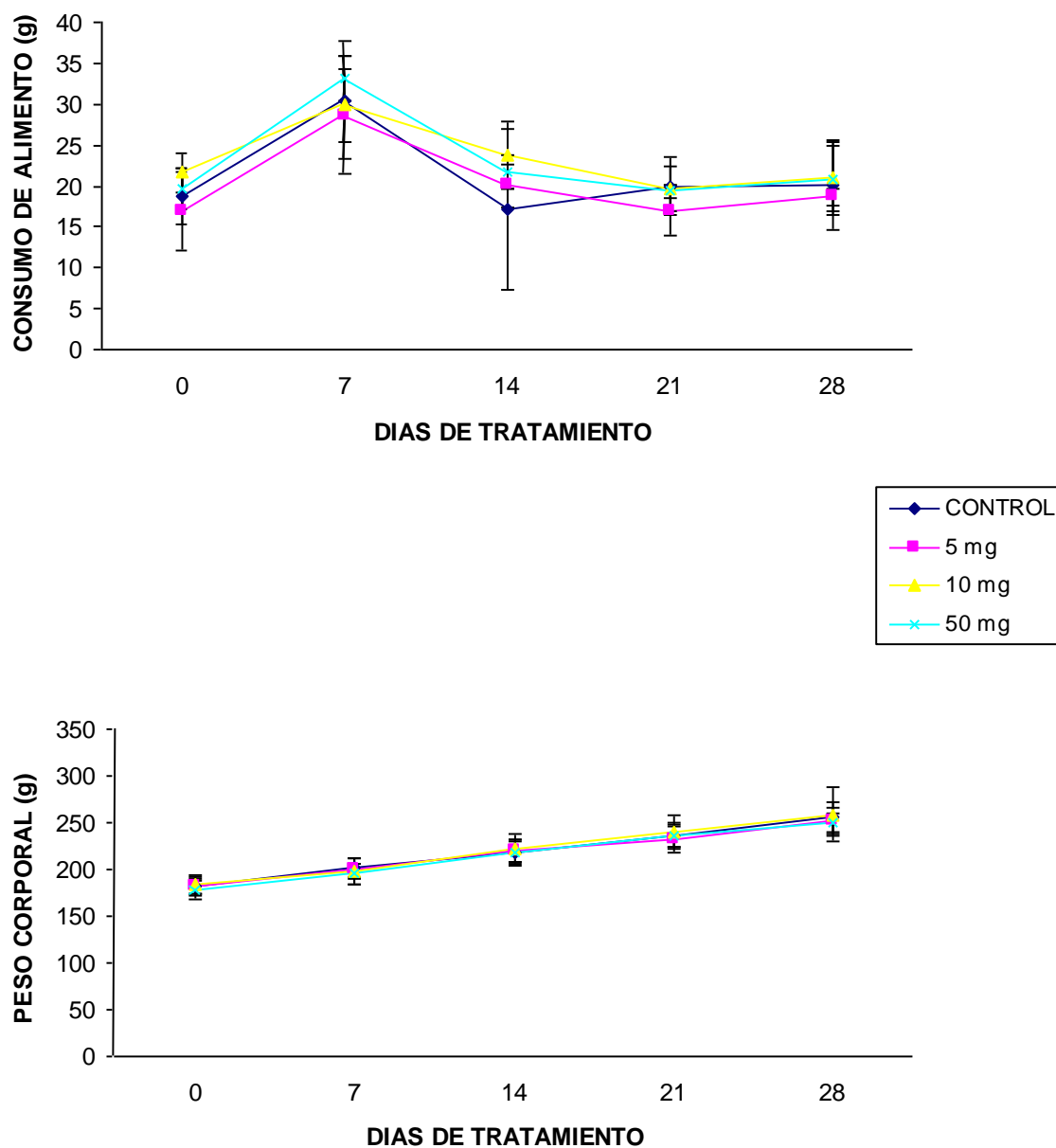


Figura 7. Consumo de alimento y peso corporal de ratas Sprague Dawley hembras en el estudio de toxicidad subcrónica. El consumo de alimento (A) y el peso de los animales (B) fue registrado semanalmente. No se observaron diferencias estadísticas del peso de los órganos entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) o respecto al control (Dunnett $p \leq 0.05$).

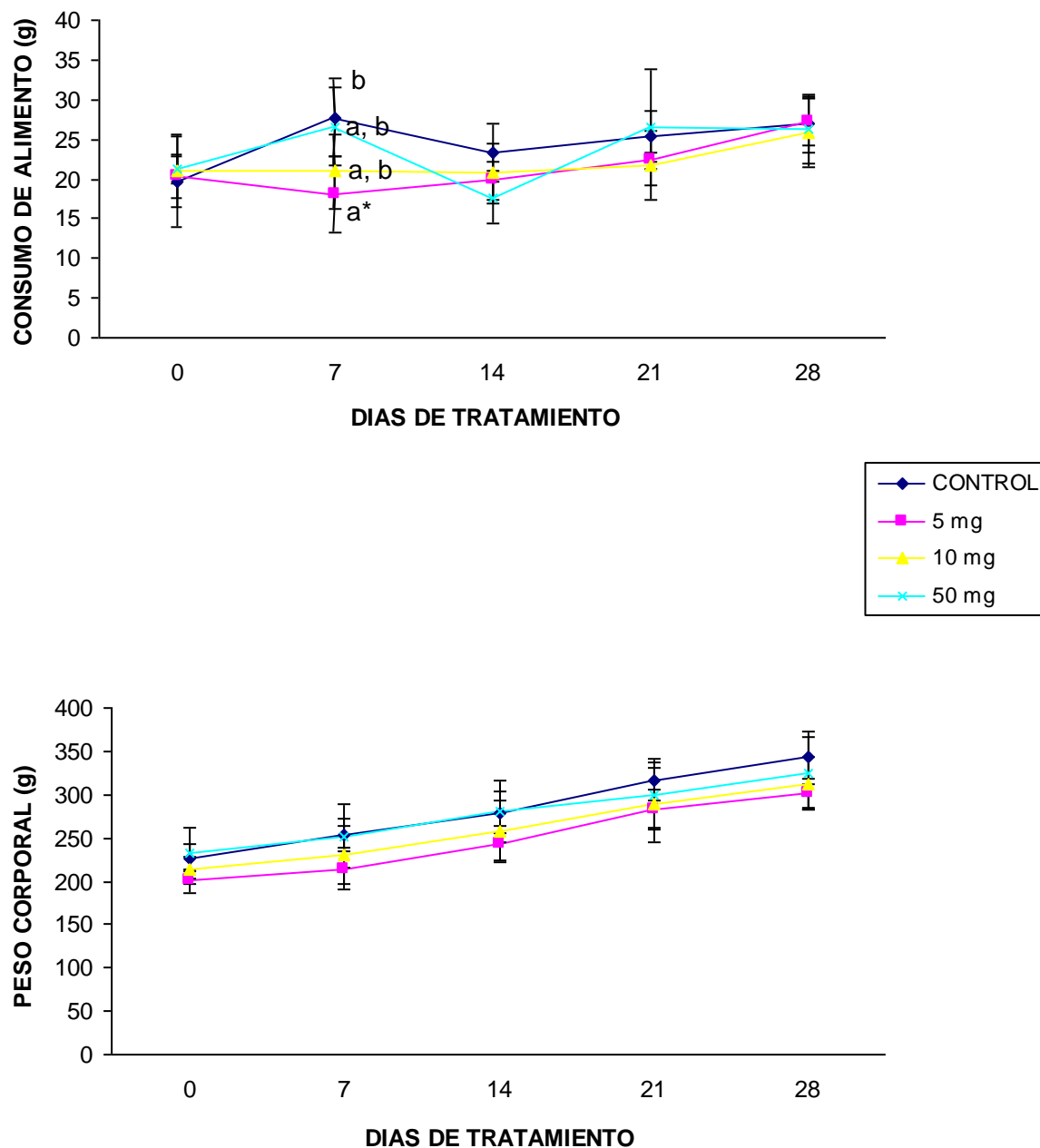


Figura 8. Consumo de alimento y peso corporal de ratas Sprague Dawley machos en el estudio de toxicidad subcrónica. El consumo de alimento (A) y el peso de los animales (B) fue registrado semanalmente. No se observaron diferencias estadísticas del peso de los órganos entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) o respecto al control (Dunnett $p \leq 0.05$).

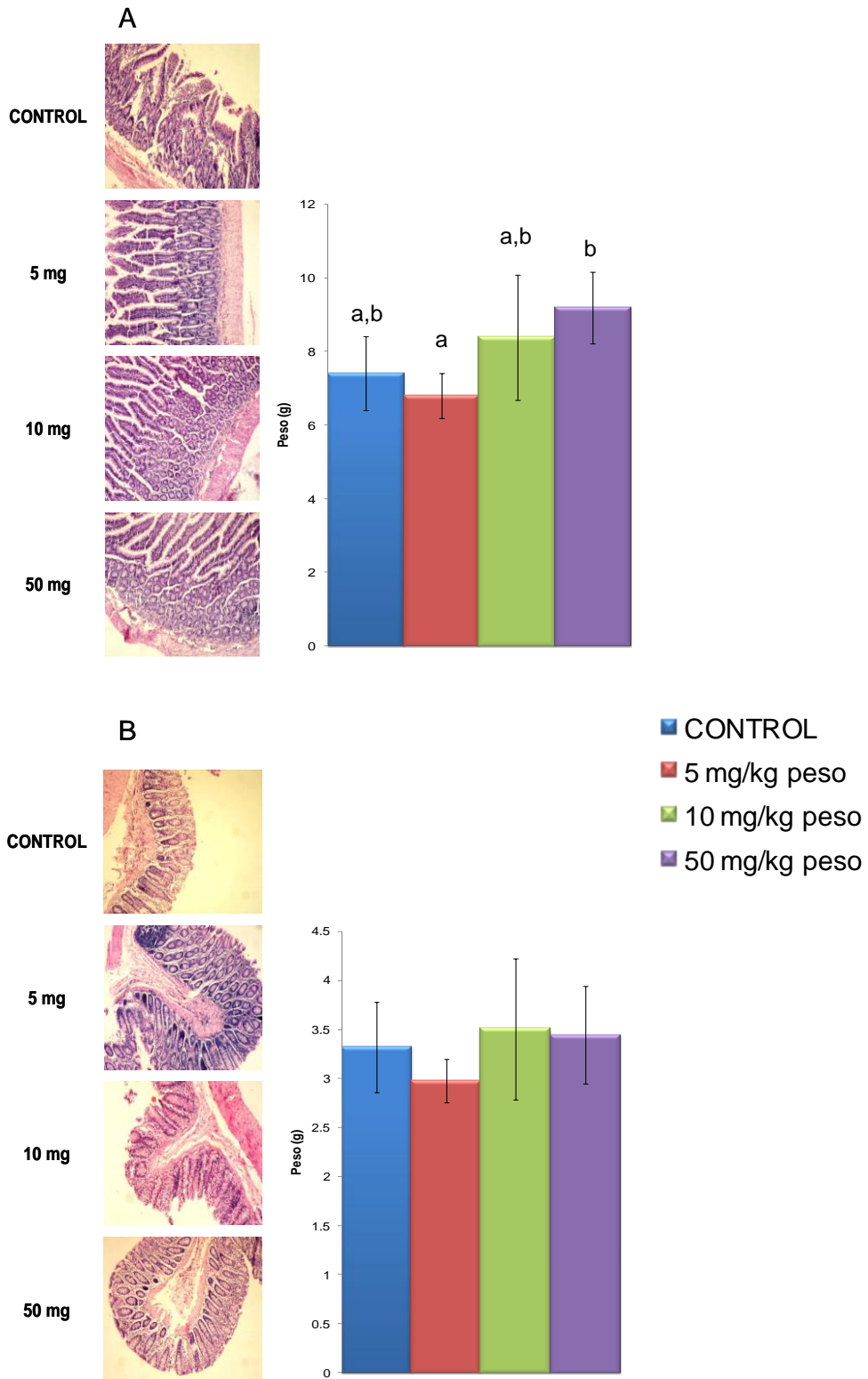


Figura 9. Análisis histopatológico y peso de intestino delgado y colon de ratas Sprague Dawley hembras en el estudio de toxicidad subcrónica. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico de intestino delgado (A) y colon (B), se pesaron y se fijaron el formol. Posteriormente se realizaron los cortes histopatológicos y se observaron a un aumento de 40x. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticas del peso de los órganos entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$). No se observaron diferencias estadísticas respecto al control (Dunnett $p \leq 0.05$).

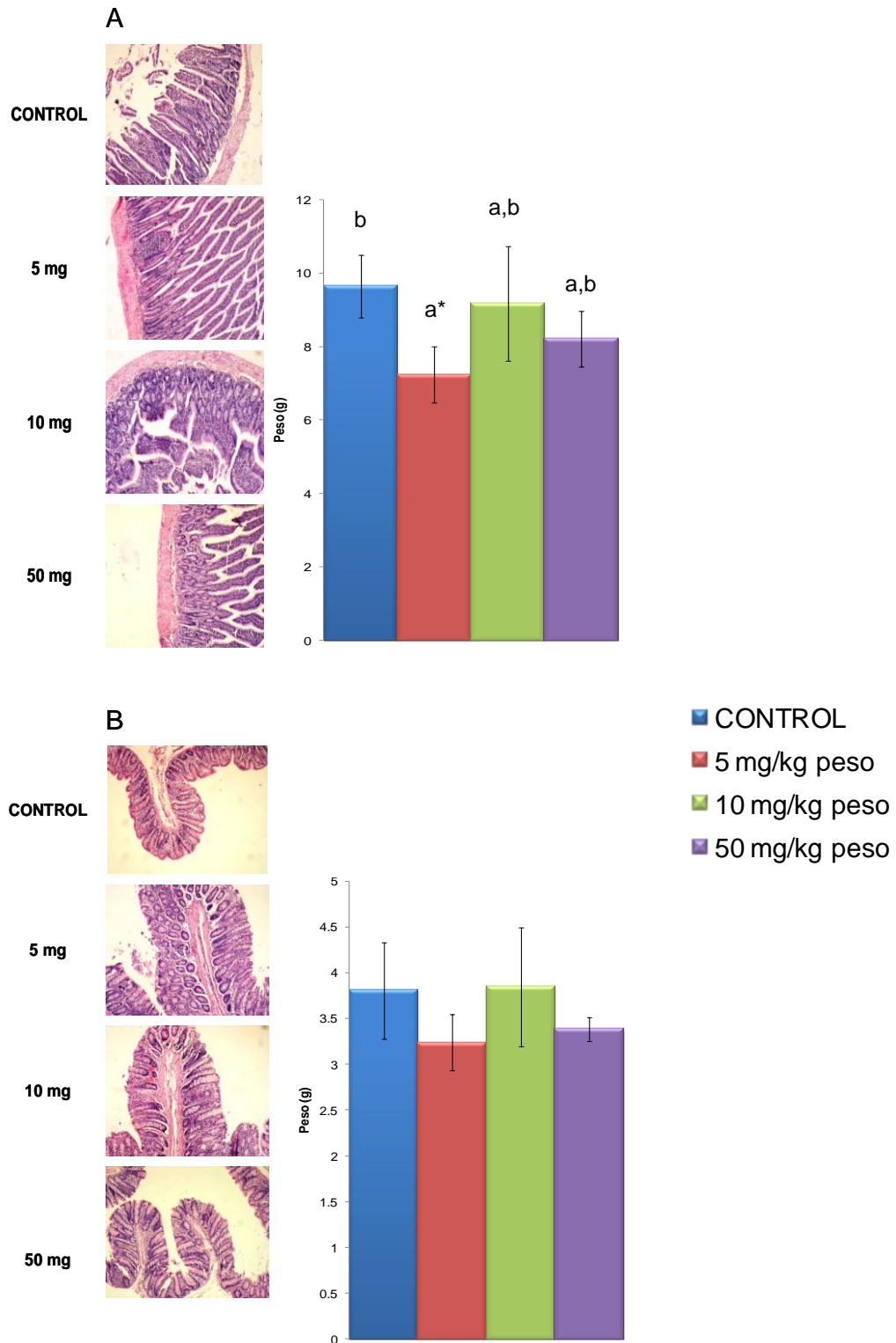


Figura 10. Análisis histopatológico y peso de intestino delgado y colon de ratas Sprague Dawley machos en el estudio de toxicidad subcrónica. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico de intestino delgado (A) y colon (B), se pesaron y se fijaron en formol. Posteriormente se realizaron los cortes histopatológicos y se observaron a un aumento de 40x. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticas del peso de los órganos entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$) y los asteriscos indican diferencia estadística respecto al control (Dunnnett $p \leq 0.05$)

Se ha observado que la inclusión de proteína de *Phaseolus vulgaris* en la dieta de ratas provoca un aumento del doble del peso del intestino delgado (Greer *et al.*, 1985). Algunos autores han reportado que la unión de la lectina al epitelio es obligatoria para la estimulación del crecimiento y la actividad del factor de crecimiento está determinada por la duración e intensidad de su unión. Aún cuando las uniones sean débiles, las lectinas pueden alterar la organización de las membranas epiteliales e inducir un ligero crecimiento intestinal o, en algunos casos, no presentar cambios (Pusztai y Bardocz, 1996). En este caso, se observó una disminución del peso del intestino delgado con la dosis más baja, y en las hembras se observó solo una tendencia no significativa a incrementar en función de la concentración.

Los análisis histopatológicos y el peso de hígado y riñones para hembras (Figura 11) y para machos (Figura 12) no mostraron alteraciones excepto para los riñones del grupo de machos con la dosis de 5 mg/kg ya que se observó disminución del peso ($p \leq 0.05$). Nuevamente llama la atención que el efecto se haya presentado con la dosis de 5 mg/kg de peso, será importante determinar si dosis bajas de la FCL presentan alguna alteración a nivel de función renal. No se observaron alteraciones en los análisis histopatológicos y de peso de timo y bazo en hembras (Figura 13) ni en machos (Figura 14). De igual forma, no se observaron efectos en el peso de corazón y estómago en ambos grupos (Figura 15).

Entre los efectos adversos presentados por algunas lectinas se ha observado que dietas que contienen proteína de *Phaseolus vulgaris* afectan el peso de algunos órganos internos, tales como atrofia de timo (Greer *et al.*, 1985). Algunas lectinas administradas oralmente, como la de frijol navy crudo, pueden provocar también un incremento de peso en el corazón e hígado graso así como múltiples lesiones histológicas (Tareq al-Ati, 2001). Sin embargo, algunos estudios han mostrado que las lectinas también pueden reducir el peso del corazón (Pusztai y Bardocz, 1996). Lo anterior muestra que el efecto dependerá de la lectina estudiada, ya que su mecanismo de acción dependerá a su vez de su especificidad a órganos blanco.

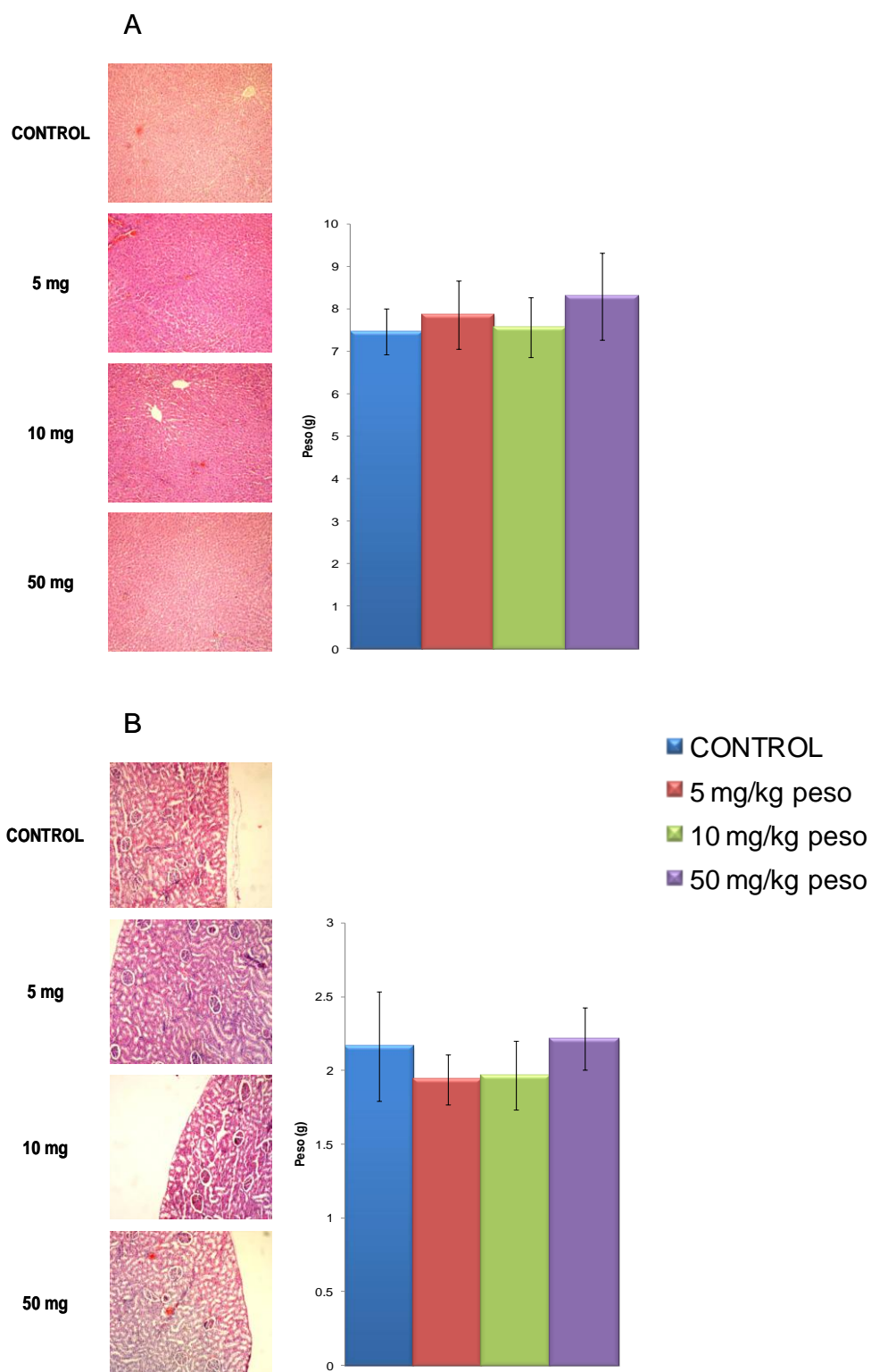


Figura 11. Análisis histopatológico y peso de hígado y riñones de ratas Sprague Dawley hembras en el estudio de toxicidad subcrónica. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico de hígado (A) y riñones (B), se pesaron y se fijaron en formol. Posteriormente se realizaron los cortes histopatológicos y se observaron a un aumento de 40x. No se observaron diferencias estadísticas del peso de los órganos entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$) o respecto al control (Dunnnett $p \leq 0.05$).

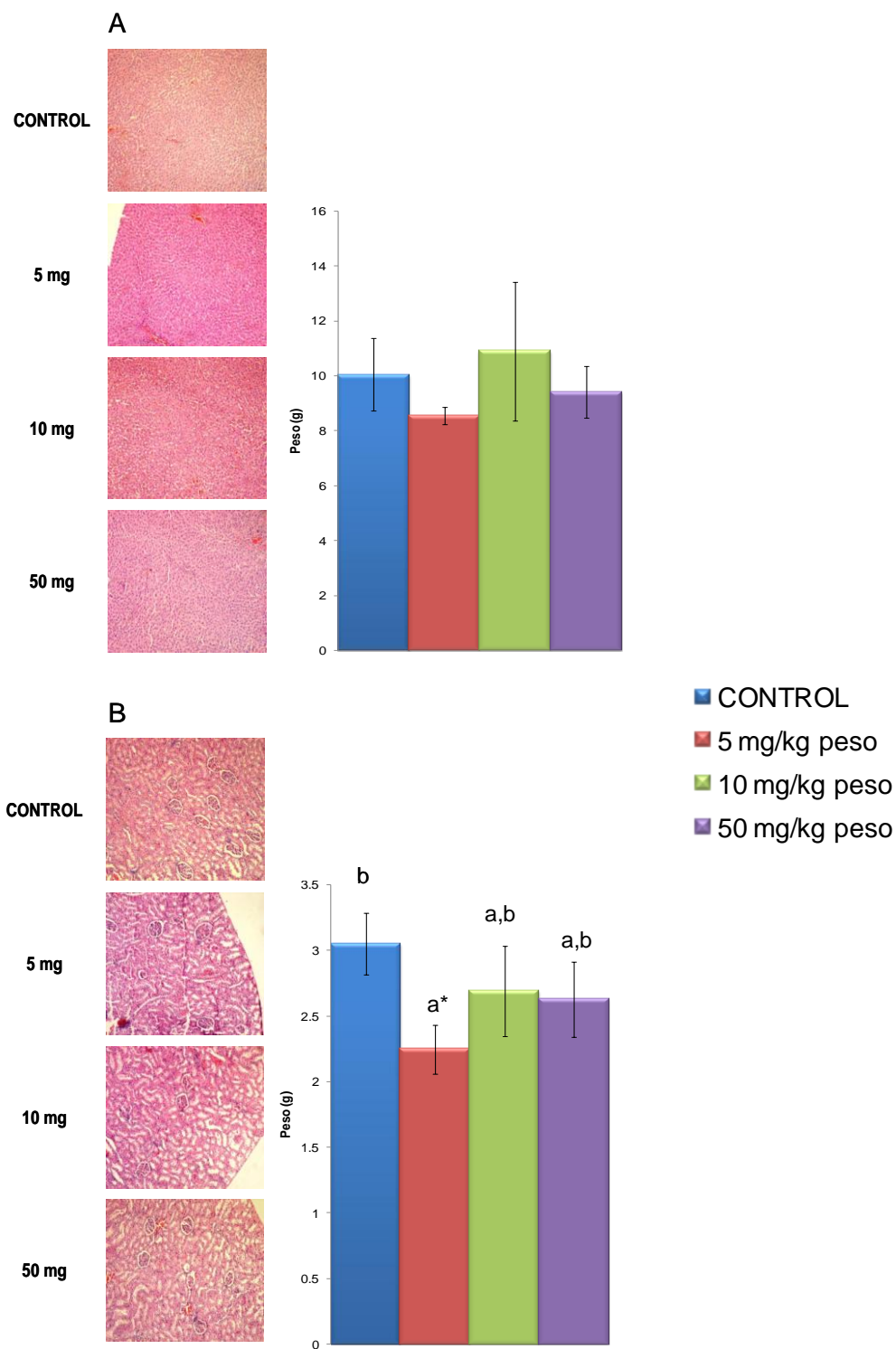


Figura 12. Análisis histopatológico y peso de hígado y riñones de ratas Sprague Dawley machos en el estudio de toxicidad subcrónica. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico de hígado (A) y riñones (B), se pesaron y se fijaron en formol. Posteriormente se realizaron los cortes histopatológicos y se observaron a un aumento de 40x. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticas del peso de los órganos entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$) y los asteriscos indican diferencia estadística respecto al control (Dunnett $p \leq 0.05$).

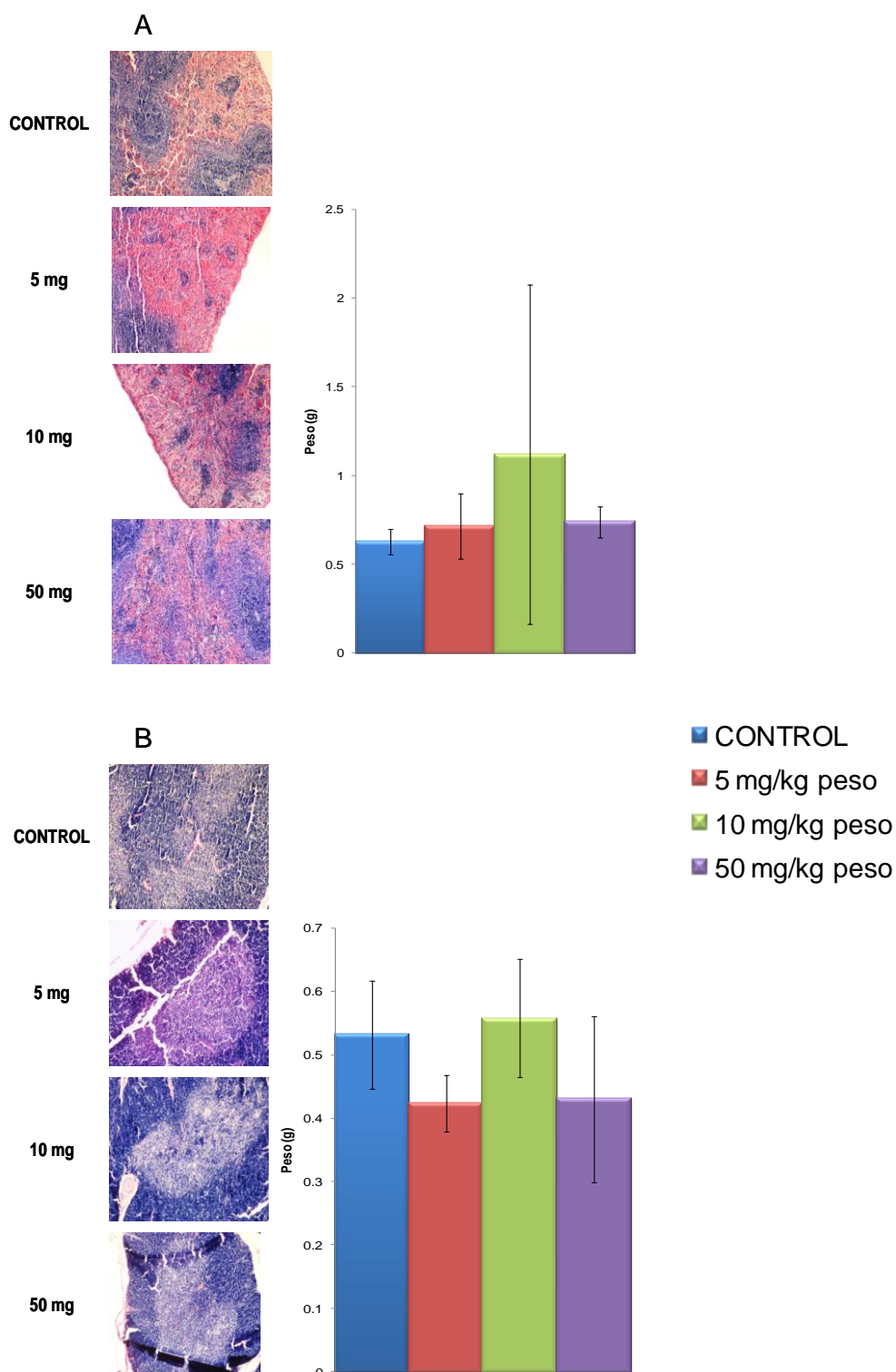


Figura 13. Análisis histopatológico y peso de bazo y timo de ratas Sprague Dawley hembras en el estudio de toxicidad subcrónica. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico del bazo (A) y timo (B), se pesaron y se fijaron en formol. Posteriormente se realizaron los cortes histopatológicos y se observaron a un aumento de 40x. No se observaron diferencias estadísticas del peso de los órganos entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$) o respecto al control (Dunnett $p \leq 0.05$).

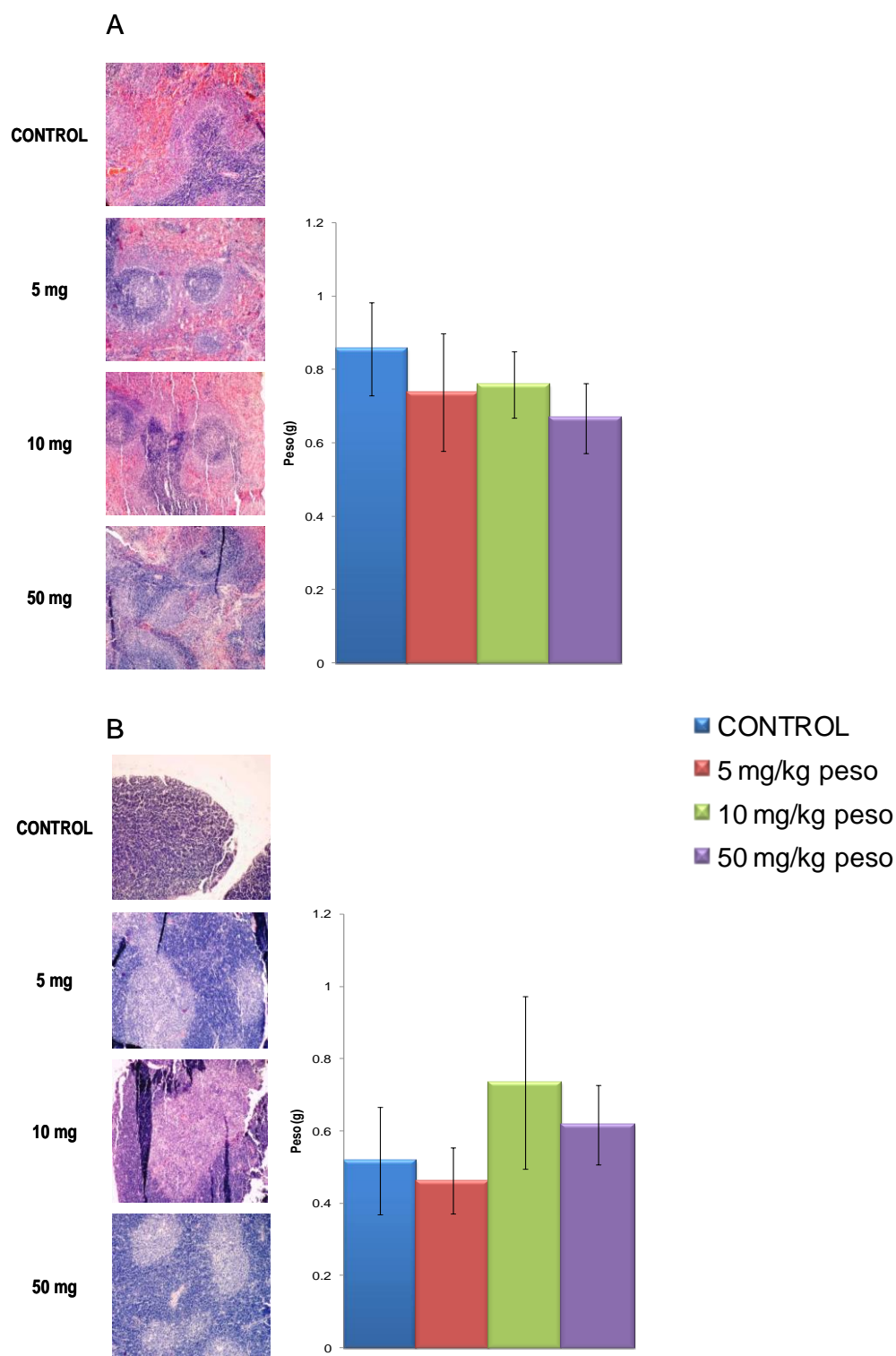


Figura 14. Análisis histopatológico y peso de bazo y timo de ratas Sprague Dawley machos en el estudio de toxicidad subcrónica. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico del bazo (A) y timo (B), se pesaron y se fijaron en formol. Posteriormente se realizaron los cortes histopatológicos y se observaron a un aumento de 40x. No se observaron diferencias estadísticas del peso de los órganos entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$) o respecto al control (Dunnett $p \leq 0.05$).

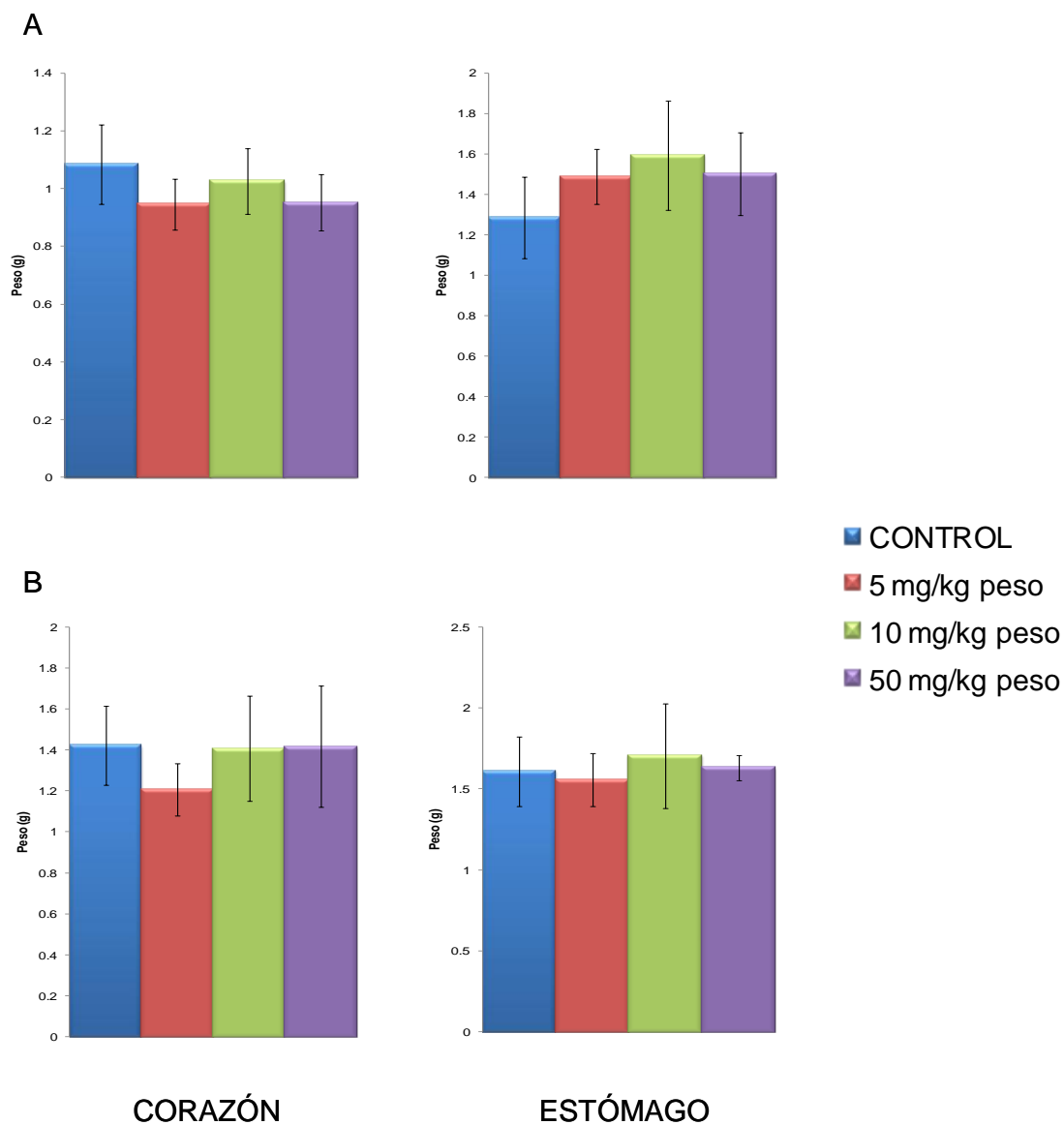


Figura 15. Peso de corazón y estómago ratas Sprague Dawley hembras y machos en el estudio de toxicidad subcrónica. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico del corazón y estómago de hembras(A) y machos (B) y se pesaron y se fijaron en formol. No se observaron diferencias estadísticas del peso de los órganos entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$) o respecto al control (Dunnnett $p \leq 0.05$).

En un estudio en donde se alimentaron ratas con frijol crudo se desarrollaron múltiples lesiones histológicas, además se ha encontrado que la lectina del frijol rojo induce crecimiento epitelial del intestino delgado e hiperplasia de las células de las criptas. La ricina, abrina, crotina, y algunas toxinas relacionadas producen lesiones patológicas macroscópicas y microscópicas similares (Tareq al-Ati, 2001). Algunas lectinas se pueden considerar como auténticas enterotoxinas, el efecto dañino de éstas es una intensa inflamación de la mucosa intestinal, con la posterior destrucción del epitelio y edema. Reaccionan con las criptas y vellosidades intestinales, pero en diferentes regiones de acuerdo a la especificidad de la hemaglutinina, lo que ocasiona una interferencia no específica con la absorción de los nutrimentos con un efecto drástico en la nutrición del organismo que las ingiere. Otros autores han sugerido que la toxicidad de estas sustancias se debe a que en las lesiones epiteliales del intestino se puede favorecer la proliferación bacteriana que es la causante de la no biodisponibilidad de nutrimentos (Valle y Lucas, 2000). En el caso de la FCL no se observaron alteraciones macroscópicas que sugieran toxicidad.

De la misma forma que en el estudio de la toxicidad aguda, el pulmón fue el único órgano en el cual se observaron alteraciones histopatológicas tales como focos neumónicos en mayor o menor grado en todos los grupos, incluyendo a los grupos control en machos y hembras. Por lo anterior dichas alteraciones no son atribuibles al efecto de la FCL.

Algunos estudios han reportado que el frijol Tépari es muy tóxica en su estado crudo causando gran pérdida de peso, proporción de eficiencia negativa de proteínas, utilización neta negativa de proteínas, pobre digestión de proteínas y la muerte de ratas y ratones al cabo de 10 días (Osman *et al.*, 2003). No obstante lo anterior, en este estudio no se observaron las alteraciones mencionadas. Las únicas alteraciones observadas se presentaron en el estudio de toxicidad aguda con las dosis más altas y dichos efectos fueron reversibles después de 48 horas, lo que muestra que la lectina contenida en la FCL presentó baja toxicidad a las dosis estudiadas.

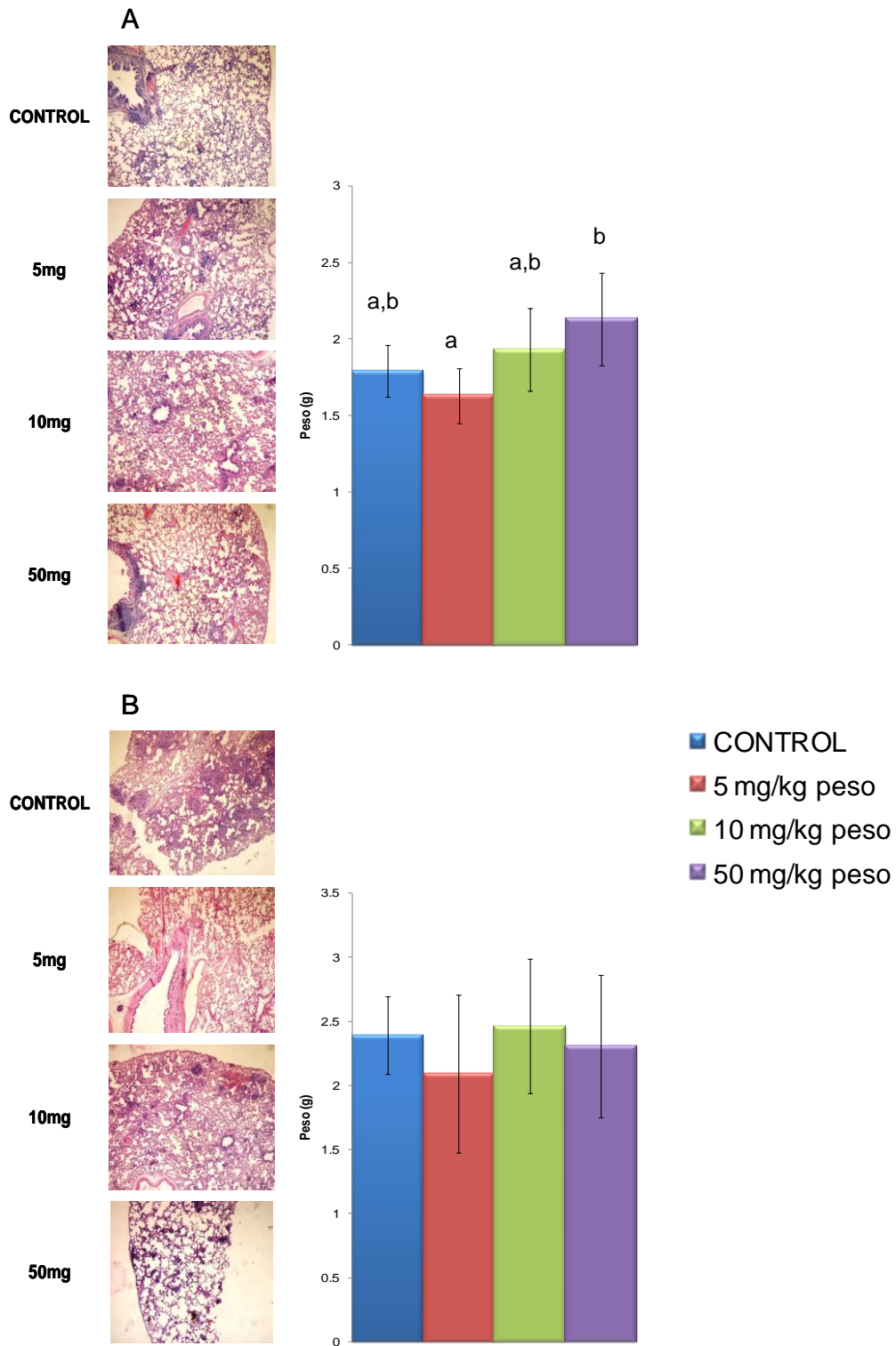


Figura 16 Análisis histopatológico y peso de pulmones de ratas Sprague Dawley hembras y machos en el estudio de toxicidad subcrónica. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico de los pulmones de hembras (A) y machos (B) los órganos, se pesaron y se fijaron en formol. Posteriormente se realizaron los cortes histopatológicos y se observaron a un aumento de 40x. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticas del peso de los órganos entre tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$). No se observaron diferencias estadísticas respecto al control (Dunnnett $p \leq 0.05$).

VIII. CONCLUSIONES

- La FCL de frijol Tépari mostró signos clásicos de toxicidad por lectinas con las dosis más altas (300 y 2000mg/kg de peso corporal) administradas en el estudio de la toxicidad aguda oral, siendo estos reversibles en el transcurso de las primeras 48 horas.
- No se logró establecer la LD₅₀ debido a que no se presentó un efecto letal con las dosis administradas de FCL frijol Tépari en el estudio de la toxicidad aguda.
- En el estudio de la toxicidad subcrónica no se observaron signos de toxicidad con las dosis utilizadas, a excepción de la disminución de peso de intestino y riñones en algunos de los grupos con la dosis más baja estudiada. Será necesario determinar si dicho efecto tiene implicaciones funcionales o se debe a una variación individual.
- Debido a que no se observaron efectos tóxicos significativos con la dosis de 50 mg/kg de peso corporal en ambos estudios y a evidencias que sugieren que a esta dosis se estimula el sistema inmune, se sugiere su utilización para estudios *in vivo* contra cáncer.
- Se sugiere confirmar que la dosis de 50 mg/kg de peso corporal no presente alteraciones metabólicas hepáticas y renales, así como efectos antinutricios con la finalidad de asegurar su inocuidad en estudios *in vivo*.
- La FCL de frijol Tépari contiene al menos una lectina citotóxica cuya toxicidad vía oral es baja. Futuros estudios se enfocarán en determinar su potencial efecto anticancerígeno.

IX. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitirán continuar con los estudios *in vivo* contra cáncer de colon. Será necesario realizar estudios con marcadores bioquímicos para determinar la inocuidad de la dosis a emplear así como establecer su efecto antinutricio. Lo anterior permitirá conocer si la FCL presenta efectos secundarios a dosis útiles contra células cancerígenas.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albores VF, de la Fuente G, Agundis C, Córdoba F. 1987. Purification and characterization of a lectin from *Phaseolus acutifolius* var. latifolius. Preparative Biochemistry: 17:379-396

Audi J., Belson M., Patel M. et al 2005. Ricin Poisoning: A comprehensive Review. Journal of the American Medical Association. 294 (18):2343-2351

Badui S. 1993. Soya. Química de los alimentos. Editorial Alambra Mexicana. 3ª Edición. México. pp 632-633

Botham P. 2004. Acute systemic toxicity-prospects for tiered testing strategies. Toxicology *in vitro* 18:227-230

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

Castañeda-Cuevas AL, Yllescas-Gasca L, López-Martínez J, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A, García-Gasca T. 2007. Efecto Antiproliferativo *In Vitro* de una Lectina De Frijol Tépari sobre Diferentes Tipos de Cáncer Humano. Memorias 2º Congreso Nacional de Química Médica. Dedicado a la investigación en cáncer y diabetes. RESPYN Edición especial No. 7-2007 <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007/index.html>

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

Cordoba F, Martínez M. 1997. Estudio Bioquímico de la Evolución de la lectina de coleoptilo de maíz. <http://www.laboratorio.com.mx/ito00007.html> Última consulta Abril 2008

Czerwinski JH, Leontowicz M, Gralak MA. 2005. Response of rats to a moderate intake of soybean lectin. Journal of Animal and Feed Sciences. 14 (suppl 1):537-540

Debouck DG. 1994. *Phaseolus acutifolius*. Plant production and protection series. 26: 47-62. <http://www.hort.purdue.edu/newcorp/1492/beans.html> Última consulta 27 enero 2008

Disni MK, Dayarathna R, Hancock WS, Hincapie M. 2008. A two step fractionation approach for plasma proteomics using immunodepletion of abundant proteins and multi-lectin affinity chromatography: Application to the analysis of obesity, diabetes, and hypertension diseases. *Journal of Separation Science*. 31:1156-1166

FDA S1B. Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals. <http://www.fda.gov/cder/Guidance/index.htm#Investigational%20New%20Drug%20Applications> Última consulta, septiembre 2008

Freed D. 1999. Do dietary lectins cause disease? *British Medical Journal*. 318:1023-1024.

Gallego del Sol F, Nagano Celso S, Calvete J. 2006. Lectinas. *Revista Investigación y Ciencia*. 361: 58-68

García-Gasca T. 2002. Efectos biológicos de una fracción proteínica de frijol Tépari con actividad antiproteolítica y citoaglutinante sobre fibroblastos murinos transformados. Tesis de doctorado. Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC). Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

Goldstein I. 2002. Lectin Structure-Activity: The story is never over. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:6583-6585.

González de Mejía E, Hankins CN, Paredes-López O, Shannon ML. 1989. The lectins and lectin-like proteins of tepary beans (*Phaseolus acutifolius*) and tepary-common bean (*Phaseolus vulgaris*) hybrids. *Journal of Food Biochemistry*: 14:117-126

González de Mejía E, Prisecaru V. 2005. Lectins as bioactive plant proteins: A potencial in cancer treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:425-445.

González de Mejía E, Valadez-Vega M, Reynosos-Camacho R, Loarca-Pina G. 2005. Tannins, trypsin inhibitors and lectin Cytotoxicity in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) beans. *Plant Foods for Human Nutrition* 60:137-145

Greer F, Brewer AC, Pusztai A, 1985. Effect of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) toxin on tissue weight and composition and some metabolic functions of rats. *British Journal of Nutrition*. 54(1):95-103

Hamama AA, Bhardwaj HL. 2002. Tepary bean: A short duration summer crop in Virginia. In: Trends in new crops and new uses. J. Janick and A. Whipkey (eds). ASHS Press, Alexandria, VA. pp429-431

Hara T, Mukunoki Y, Tsukamoto I, Miyoshi M, Hasegawa K. 1984. Susceptibility of Kintoki bean lectin to digestive enzymes *in vitro* and its behavior in the digestive organs of mouse *in vivo*. Journal of Nutrition Science and Vitaminology 30(4):381-94

Hernández P, Martín O, Rodríguez de Pablos Y, Ganem F. 1999. Aplicaciones de las lectinas. Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 15(2):91-95

Hernández P, Perez E, Martínez L, Ortiz B, Martínez G. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. Revista de Educación Bioquímica. 24(1):21-27.

Hernandez-Rivera E, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A, Garcia-Gasca T. 2007. Efecto Citotóxico Diferencial de una Fracción Rica en Lectinas de Frijol Tépari (*Phaseolus Acutifolius*) sobre Células Cancerígenas. Memorias 2º Congreso Nacional de Química Médica. Dedicado a la investigación en cáncer y diabetes. RESPYN Edición especial No. 7-2007 <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007/index.html>

Hutt N, Kopferschmitt-kubler MC, Cabalio J, Purohit A, Alt M, Pauli G. 2001. Anaphylactic reactions after therapeutic injection of mistletoe (*Viscum album* L.) Allergy and Immunopathology. 29(5):201-3

Idouraine A, Yensen S. 1991. Tepary bean flour, albumin and globulin fractions functional properties compares with soy protein isolate. Journal of Food Science. 56:1316-1318.

Instituto Nacional de Cancerología e Instituto Nacional de Nutrición. 1996. Características nutricionales del frijol. Editorial Pax México. <http://www.siap.gob.mx/modelos/Cadenas/frijol/infcons.pdf> Última consulta, octubre 2008

Intriago-Ortega MP. 1985. Aislamiento y parcial caracterización de las principales proteínas de semillas de frijol de las especies *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus acutifolius* y *Phaseolus coccineus*. Tesis de Licenciatura en Biología. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza. UNAM.

<http://132.248.67.65:8991/F/4V4XGLEDX62VRS6F69YFCX3U7TEPED2YQQ17368HLALICYE4YD-02070?func=full-set-selected> Última consulta octubre 2008

Jaffé W. 1980. Hemagglutinins (lectins). In: Toxic constituents of plant foodstuffs. Academic Press New York, N.Y. pp73-102

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

Jordinson M, Goodlad R, Brynes A., Bliss P, Ghatei M, Bloom S, Fitzgerald A, Grant G, Bardocz S, Puzstai A, Pignatelli M, Callam J. 1999b. Gastrointestinal responses to a panel of lectins in rats maintained on total parenteral nutrition. American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology. 276:1235-1242.

Klaassen C. 1991. Principios de toxicología. Las Bases farmacológicas de la terapéutica Médica. Editorial Médica Panamericana. 8^o edición, México. pp64-75

Lajolo F, Genovese M. 2002. Nutricional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. Journal of Agricultural Food and Chemistry. 50:6592-6598.

León Toro MV, Rueda de Arévalo EE, Castaneda Delgado MV, Méndez Ochoa A, Michelangeli Betancourt C. 2007. Efecto de la concanavalina A sobre la actividad de las enzimas α -amilasa pancreática y tripsina en pollos de engorde. Revista Científica (Maracaibo).17(1):83-88.

Liener IE. 1997. Plant lectins. Properties, nutritional significance and function. *En* ACH (Ed) Antinutrients and Phytochemicals in Food. American Chemical Society, USA. p31

Lis H, Sharon N. 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins that mediate cellular recognition. Chemistry Reviews. 98:637-674

López Martínez J, Castañeda Cuevas AL, Yllescas Gasca L, Mendiola Olaya E, Blanco Labra A, García Gasca T. 2006. Efecto de una lectina de frijol Tépari sobre la sobrevivencia de diferentes tipos de cáncer humano *in vitro*. Memorias XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007/index.html> Última consulta septiembre 2008

López Martínez J. 2007. Efecto *in vitro* de una lectina de frijol Tépari sobre células de cáncer de colon humano. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.

Machuka SJ, Okeola GO, Van Damme JM, Chrispeels JM, Leuven VF, Peumans JW. 1999. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochemistry*: 51:721-728

Nabham GP, Felger RS. 1978. Teparies in southwestern North America: A biogeographical and ethnohistorical study of *Phaseolus acutifolius*. *Economic Botany*. 32:2-19.

Nakata S, Kimura T. 1985. Effect of ingested toxic bean lectins on the gastrointestinal tract in the rat. *Journal of Nutrition*: 115(12):1621-9

Nishimura H, Nishimura M, Oda R, Yamanaka K, Matsubara T, Ozaki Y, Sekiya L, JaMada T, 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. *Experimental Cell Research*: 295:119-127.

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. <http://148.243.71.63/default.asp?doc=743> Última consulta septiembre 2008

OECD 407, 2006. OECD Guideline for testing chemicals. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. [www.oecd.org/document/55/0,2340.en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html) Última consulta, abril 2008

OECD 423, 2001. OECD Guideline for testing chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. [www.oecd.org/document/55/0,2340.en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html) Última consulta, abril 2008

Osman M, Reid P, Weber Ch. 2003. The effect of feeding Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) proteinase inhibitors on the growth and pancreas of young mice. *Pakistan Journal of Nutrition* 2 (3):111-115

Patocka J. Abrin And Ricin - Two Dangerous Poisonous Proteins. Department of Toxicology, Military Medical Academy, Hradec Kralove, Czech Republic.

<http://www.asanltr.com/newsletter/01-4/articles/Abrin&RicinRev.htm>
consulta, octubre 2008

Última

Peumans JW, Van Damme JM. 2002. Seed Lectins. *Seed Proteins*: 42:657-683

Piñols C. 1995. Estudio de los cambios de la mucosa colónica de rata y cinética celular durante la carcinogénesis experimental inducida con 1,2-dimetilhidracina. www.cervantesvirtual.com/FichaObra.html?Ref=2313 Última consulta abril 2008

Pratt RC, Singh NK, Shade RE, Murdock LL, Bressan RA. 1990. Isolation and partial characterization of a seed lectin from Tepary Bean that delays bruchid beetle development. *Plant Physiology*. 93:1453-1459.

Pusztai A y Bardocz S. 1996. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. *Trends Glycosilation and Glicotechnology*. 8:149-165

Pusztai A, Ewen SW, Grant G, Peumans WJ, van Damme EJ, Rubio L, Bardocz S. 1990. Relationship between survival and binding of plant lectins during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors. *Digestion* 46 Suppl 2:308-316

Radberg K, Biernat M, Linderoth A, Zabielski R, Pierzynowski GS, Westrom BR. 2001. Enteral exposure to crude red kidney bean lectin induces maturation of the gut in suckling pigs. *Journal of Animal Science*. 79:2669-2678

Reynoso R, González de Mejía E, Loarca-Piña G. 2003. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food and Chemical Toxicology* 41(1): 21-27

Rhodes JM. 1999. Beans means lectins. *Gut*. 44: 593-594.

Sharon N. 1998. Lectins: From obscurity into the limelight. *Protein Science* 7:2042-2048.

Sheerens JC, Tinsley AM, Abbas IR, Weber CW, Berry JW. 1983. The nutritional significance of tepary bean consumption. *Desert Plants*. 5: 11.

Tareq al-Ati, 2001. Plant lectins. Poisonous Plants Homepage: Animal Science at Cornell University. <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/lectins.html> Última consulta Septiembre 2008.

Turner RH, Liener IE. 1975. The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. *Analytical Biochemistry*. 68:651-653

Valadez-Vega M.C, Riverón Negrete L, Abdulaev F, Alvarez Manilla D, García Carrancá A. 2007. Efecto antitumoral de la lectina de frijol sobre células cancerosas SW 480. Memorias 2° Congreso Nacional de Química Médica. Dedicado a la investigación en cáncer y diabetes. RESPYN Edición especial No. 7-2007 <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007/index.html>

Valle Vega P, Lucas Florentino B. 2000. Toxicología de Alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública. Centro Nacional de Salud Ambiental. México, DF. p9-12

Vasconcelos IM, Oliveira JT. 2004. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*. 44(4):385-403

Wong HJ, Ng GB. 2002. Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 301:545-550.