



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

Toxicidad Aguda y Subcrónica de una Fracción de Lectinas e Inhibidor de Proteasas de Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*).

TESIS

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

Presenta:

Héctor Noriega Girón

Dirigido por:

M en C. Roberto Augusto Ferriz Martínez

SINODALES

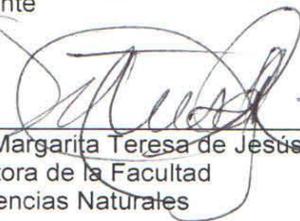
M en C. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Presidente

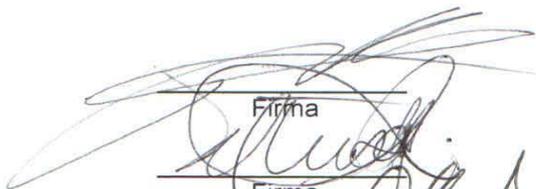
Dra. Margarita Teresa De Jesús García Gasca
Secretario

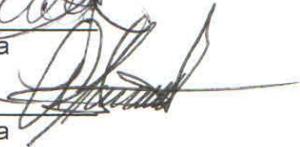
Dr. Alejandro Blanco Labra
Vocal

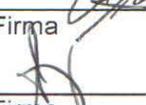
Dra. Adriana Jheny Rodríguez Méndez
Suplente

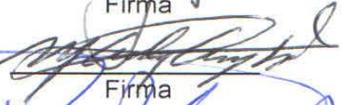
Dra. Miriam Aracely Anaya Loyola
Suplente


Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Directora de la Facultad
de Ciencias Naturales


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre 2014
México

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ 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.**

Dedico este trabajo a las personas que siempre están conmigo, mi familia:

A Dios, por darme la fortaleza de seguir.

A Criseida, mi mamá, por todo su cariño y apoyo incondicional en todo momento.

A Manolo, mi papá, por sus palabras y ejemplo de lucha. "Como sea, como venga".

A Manuel y Daniel, mis mejores amigos y hermanos, por sus palabras, apoyo y nunca dejarme solo.

Especialmente a usted abue, a Aurora, que siempre me hecho porras y sé que en donde esta me cuida.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al CONACyT por brindarme el apoyo económico para realizar este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro en especial a la Maestría en Nutrición Humana por todo el apoyo otorgado para la realización de esta investigación.

A todo el equipo del laboratorio, por brindarme su apoyo y que en ellos encontré muy buenos amigos.

Al boss, Roberto, por guiarme y emprender este proyecto juntos.

A la Dra. Tere, por su apoyo y hacerme parte del equipo.

A mis maestros y sinodales que me orientaron y ayudaron a sacar este trabajo adelante.

Al Dr. Alejandro Blanco y todo su equipo de trabajo por su empeño y apoyo.

Y a los compañeros y amigos de la maestría en nutrición.

¡GRACIAS!

RESUMEN

Estudios previos han mostrado que las lectinas e inhibidores de proteasas (IP) del frijol Tépari presentan efectos independientes sobre líneas celulares de cáncer de colon. Sin embargo, se desconoce el efecto de la combinación de ambos tipos de proteínas. Por lo anterior se obtuvo una fracción combinada (LIP-60) y se determinó la toxicidad aguda, subcrónica y farmacológica en ratas. Se utilizaron ratas Sprague Dawley de 5 semanas de edad a las que se les administró vía intragástrica la fracción LIP-60. En la prueba aguda se administraron por única ocasión dosis de 10, 100, 1000 mg/kg de peso del LIP-60; para la prueba subcrónica se administró diariamente LIP-60 en una concentración de 100 mg/kg de peso, por 28 días; y para la prueba farmacológica se administró LIP-60 (100 mg/kg de peso) dos veces por semana durante 6 semanas. Los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de sangre y órganos para pruebas renales, hepáticas, pancreáticas y del estado nutricional. Se observaron efectos adversos con la dosis más alta de la prueba aguda como letargia en las primeras 12 h y a los 14 días de la prueba subcrónica, como piloerección, hirsuto, diarrea, producción de gases e irritabilidad además de disminución en el consumo de alimento y disminución del 8.6% en la ganancia de peso. En las determinaciones para evaluar el daño renal, hepático, pancreático y estado nutricional no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Los resultados de la prueba farmacológica no mostraron efectos adversos. Los resultados sugieren que la fracción combinada de lectinas e inhibidor de proteasas LIP-60 de frijol Tépari no presenta toxicidad y exhibe buena tolerabilidad en ratas.

Palabras clave: Frijol Tépari, inhibidor de proteasas, lectinas, *Phaseolus acutifolius*, toxicidad.

Summary

Studies have shown that a concentrated lectin fraction (CLF) and protease inhibitor (PI) from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) have effects on cell lines, mainly colon cancer cells. However, the effect of the combination of this two proteins is unknown. Therefore, we obtained a combined fraction (LIP-60) and determined the acute, subchronic and long term toxicity in rats. Five weeks aged Sprague Dawley rats were administered with the LIP-60 fraction by intragastric via. A single LIP-60 dose was administered using 10, 100 and 1000 mg/body weight kg in acute test; daily LIP-60 dose was administered using 100 mg/body weight kg for 28 days. For long term scheme LIP-60 dose (100 mg/body weight kg) was administered twice a week for 6 weeks. The animals were sacrificed to obtain organs and blood samples in order to determine renal, hepatic and pancreatic damage markers and also nutritional status. Acute test did not shown adverse effects, only the highest dose provoked lethargy for the first 12 h. Subchronic test shown piloerection, yellow hair pigmentation, diarrhea, abdominal distention, irritability, partial food intake decrease and stationary body weight gain with a 8.6% decrement. Blood markers for toxicity or nutritional status did not shown significant alterations. The long-term scheme did not shown adverse effects neither before sacrifice nor blood markers. The results suggest that the combined lectin fraction and protease inhibitor from Tepari bean LIP-60 do not shown toxicity and present high tolerability in rats.

Keywords: Tepary bean, Protease inhibitor, lectins, *Phaseolus acutifolius*, toxicity

INDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Índice	iii
Índice de tablas y cuadros	iv
Índice de figuras	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	21
IV. JUSTIFICACIÓN	21
V. HIPOTESIS	21
VI. OBJETIVO GENERAL	21
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	22
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
IX. CONCLUSIÓN	46
X. LITERATURA CITADA	47

INDICE DE TABLAS Y CUADROS

Cuadro/Tabla		Página
1	Familias de Inhibidores de Proteasas en plantas	15
2	Determinación de marcadores sanguíneos de ratas Sprague Dawley tratadas con 100 mg/kg de LIP-60 en prueba subcrónica.	41
3	Determinación de marcadores sanguíneos de ratas Sprague Dawley tratadas con 100 mg/kg de LIP-60 en prueba farmacológica.	44

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Consumo de alimento de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de LIP-60 en el estudio de toxicidad aguda.	34
2	Peso corporal de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de LIP-60 en el estudio de toxicidad aguda.	34
3	Consumo de alimento de ratas Sprague Dawley tratadas con LIP-60 en dosis de 100 mg/kg de peso corporal en el estudio de toxicidad subcrónica.	36
4	Peso corporal de ratas Sprague Dawley tratadas con LIP-60 en dosis de 100 mg/kg de peso corporal en el estudio de toxicidad subcrónica.	36
5	Peso ajustado de los órganos de ratas Sprague Dawley tratadas con 100 mg/gk de peso de LIP-60 en el estudio de toxicidad subcrónica.	37
6	Análisis histopatológico de colon, intestino delgado, hígado, riñón y páncreas de Ratas Sprague Dawley es el estudio de toxicidad subcrónica.	38
7	Recuento de glóbulos rojos y glóbulos blancos de ratas tratadas con LIP-60 en el estudio de toxicidad subcrónica.	40
8	Recuento de linfocitos y granulocitos de la serie blanca de ratas tratadas con LIP-60 en el estudio de toxicidad subcrónica.	40
9	Consumo de alimento de ratas Sprague Dawley tratadas con LIP-60 en dosis de 100 mg/kg de peso corporal en el estudio de toxicidad farmacológica.	42
	Peso corporal de ratas Sprague Dawley	

10	tratadas con LIP-60 en dosis de 100 mg/kg de peso corporal en el estudio de toxicidad farmacológica.	43
11	Peso ajustado de los órganos de ratas Sprague Dawley tratadas con 100 mg/kg de peso de LIP-60 en el estudio de toxicidad farmacológica.	43
12	Recuento de glóbulos rojos y glóbulos blancos de ratas tratadas con LIP-60 en el estudio de toxicidad farmacológica.	44
13	Recuento de linfocitos y granulocitos de la serie blanca de ratas tratadas con LIP-60 en el estudio de toxicidad farmacológica.	45

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se sabe que existen componentes en los alimentos con efectos benéficos para la salud, tal es el caso de las lectinas de leguminosas de las cuales se han reportado sus efectos anticancerígenos. Sin embargo se ha demostrado que ciertas lectinas de plantas tienen efectos tóxicos que causan alteraciones en el crecimiento, pérdida de peso y diarrea, consideradas de tal forma como factores antinutricios, tanto en animales como en humanos. Las lectinas constituyen un grupo de proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que comparten en común la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas (Hernández *et al.*, 1999). La importancia de éstas yace en su propiedad de interacción con grupos sanguíneos específicos, aglutinación de linfocitos, eritrocitos, espermatozoides, plaquetas, bacterias y células tumorales, inducción de la mitosis en linfocitos, sus efectos citotóxicos y la detección de transformaciones malignas en las células (Ferriz-Martínez *et al.*, 2010).

Trabajos *in vitro* han mostrado que una fracción concentrada de lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) inhibe el crecimiento de células cancerígenas, principalmente de colon. Por otra parte este frijol también posee otras proteínas que son los inhibidores de proteasas (IP), estos son polipéptidos que tienen la habilidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas por lo que participa en su regulación, lo que garantiza la proteólisis como evento fisiológico. Se ha observado que IP de origen vegetal inhiben enzimas relacionadas con la digestión de la matriz extracelular relacionada con invasión carcinogénica (Castro-Guillen *et al.*, 2010)

El frijol Tépari es una variedad que se cultiva al norte de México esta cosecha es particularmente atractiva debido a sus características agronómicas como la resistencia a sequía, al calor y a su adaptabilidad a altas concentraciones salinas del suelo (Córdoba y Martínez, 1997; Reynoso *et al.*, 2003; González de Mejía y

Prisecaru, 2005). 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 y Prisecaru, 2005). Según algunos autores (Duffus y Slaughter, 1885; Belmar, 2001; Muzquiz *et al.*, 2006), los inhibidores de proteasas son los factores antinutricios más conocidos; encontrados principalmente en semillas crudas de leguminosas.

Nuestro grupo de trabajo ha encontrado que fracciones de lectinas e inhibidores de proteasas, por separado presentan efectos sobre el proceso cancerígeno, tanto *in vitro* como *in vivo*

Resulta importante el estudio de estas proteínas en conjunto siendo necesario determinar su perfil toxicológico *in vivo*, antes de estudiarlo con un modelo *in vivo* sobre cáncer químicamente inducido. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la toxicidad aguda y subcrónica de la administración oral de una fracción de lectinas e inhibidor de proteasas de Frijol Tépari *in vivo*.

II. ANTECEDENTES

2.1 LECTINAS

2.1.1 Definición de las Lectinas.

Iniciado por Stillmark los estudios con lectinas en 1888 describió el fenómeno de hemaglutinación con extractos de semillas de castor (*Ricinus communis*). La proteína responsable de la hemaglutinación de los eritrocitos se 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 concanavalina 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 órganos de reserva y constituyen del 2-10% del total de proteína (Castillo y Adbullaev, 2005).

2.1.2 Estructura y clasificación de las Lectinas.

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 importante 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-desoxi-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).

De acuerdo a su distribución en la naturaleza, las lectinas se pueden clasificar de la siguiente manera:

a) 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 (Hernandez-Cruz, 2005).

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. 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 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 (Micucci y Camps, 1987):

- La Concanavalina A, es una proteína que se obtiene de *Canavalia 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 fitohemagutinina (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.

Se ha descrito que las lectinas pueden proteger a la planta de ataques de bacterias, hongos y virus patógenos a lo largo de su crecimiento, 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, así como la selectividad y citotoxicidad (Machuka *et al.*, 1999; Ferriz-Martínez *et al.*, 2010)

2.1.3 Lectinas como factores antinutricios

Las lectinas vegetales 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). La concanavalina A fue recuperada en cantidades significativas sin presentar alteraciones en el contenido fecal de ratas 4 horas 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 las proteínas (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).

2.1.4 Toxicidad de las Lectinas vegetales

Las lectinas de leguminosas han sido intensamente estudiadas en su papel de quimioprevención 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 algunas veces la ingestión de esta causa envenenamiento (Freed, 1999).

Las leguminosas rara vez son consumidas por el ser humano 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). Sin embargo, no todas las lectinas son tóxicas. Mientras que unas como las del frijol rojo 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).

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).

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 (Brown, 2014). 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 (Liener, 1974; Pusztai *et al.*, 1979; Lajolo y Genovese, 2002). Ha sido posible observar niveles elevados de urea, glucosa, bilirrubinas, transaminasas y deshidrogenasa láctica en ratas alimentadas con ricina (Brown, 2014). 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, 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 (Brown, 2014). 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 fracción 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 horas. 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 blanco 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.

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. 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 parenquimatosi, degeneración grasa y edema de varios tejidos.

Estudios utilizando lectinas de frijol común (*Phaseolus vulgaris L*) muestran que interfiere con la función intestinal, causando cambios en el metabolismo y afectando el crecimiento de las ratas, disminuye la glucosa, lípidos, vitamina B12 y absorción de nitrógeno (Donatucci *et al.*, 1987, Marzo *et al.*, 2002). 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 (Pusztai *et al.*, 1990; Vasconcelos y Oliveira, 2004; Castillo y Adbullaev, 2005).

2.2 PROTEASAS.

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de proteínas. Las cuatro clases más importantes son las que contienen en su sitio activo un residuo aspártico, serina o cisteína y las metaloproteasas, que requieren la participación de un metal. Unas proteasas liberan hormonas y neurotransmisores a partir de ciertos precursores que son inactivos, mientras que otras son responsables de poner fin a determinadas respuestas biológicas mediadas por péptidos, estando regulada su acción por inhibidores endógenos selectivos.

Estas enzimas controlan procesos fisiológicos tan importantes como la digestión, la fertilización, el crecimiento, la diferenciación celular, la defensa inmunológica, la

cauterización de las heridas y la apoptosis. (Lodish *et al.*, 2002; Alberts *et al.*, 2003)

2.2.1 ASPÁRTICO PROTEASAS.

La mayoría de las proteasas aspárticas pertenecen a la familia de la pepsina. Esta familia incluye enzimas digestivas como la pepsina y renina, catepsinas lisosomales D y ciertas proteasas fúngicas (penicilopepsina, rhizopuspepsina, endotiapepsina). Una segunda familia comprende proteasas virales tales como la proteasa del virus del SIDA (VIH), también llamado retropepsina. Los estudios cristalográficos han revelado que estas enzimas al ser moléculas bilobuladas, con el sitio activo localizado entre dos lóbulos homólogos, cada lóbulo contribuye con un residuo de aspartato de la díada catalítica activa de aspartato. Estos dos residuos de aspartato están en estrecha proximidad geométrica en la molécula activa, y un aspartato es ionizado mientras que el segundo está localizado en el intervalo óptimo de pH de 2-3. Retropepsinas, son monoméricas, es decir, tienen sólo una aspartato catalítico, y luego la dimerización es necesaria para formar una enzima activa. En contraste con las proteasas de serina y cisteína, la catálisis por proteasas aspárticas no implica un producto intermedio covalente, aunque existe un intermedio tetraédrico. El ataque nucleófilo se logra por dos transferencias de protones simultáneas: una desde una molécula de agua a la diada de los dos grupos carboxilo y una segunda desde la diada al oxígeno de carbonilo del sustrato con la unión del enlace concurrente CONH. Este principio genera catálisis ácido-base, lo que puede ser llamado un mecanismo "push-pull", conduce a la formación de un neutral intermedio tetraédrico no-covalente (Mares *et al.*, 1989).

2.2.2 SERIN PROTEASAS.

Esta clase comprende dos familias distintas. La familia de la quimotripsina, que incluye las enzimas de mamíferos tales como quimotripsina, tripsina, o elastasa o

calicreína, y la familia subtilisina, que incluye las enzimas bacterianas tales como subtilisina. Aunque la estructura general de 3D es diferente en las dos familias, que tienen la misma geometría del sitio activo, y la catálisis procede a través del mismo mecanismo. Las serin proteasas presentan diferentes especificidades de sustrato que están relacionadas con sustituciones de aminoácidos en los subsitios de enzimas diferentes que interactúan con los residuos del sustrato. Algunas enzimas tienen un sitio de interacción prolongada con el sustrato. Otros tienen una especificidad restringida al residuo del sustrato P1 (Schaller, 2004). Tres residuos que forman la tríada catalítica son esenciales en el proceso catalítico, es decir, His 57, Asp 102 y Ser 195 (quimotripsinógeno). El primer paso en la catálisis es la formación de una enzima acil intermedia entre el sustrato y la serina esencial. La formación de este producto intermedio covalente a través de una carga negativa tetraédrica del estado de transición intermedia, y entonces el enlace péptido se escinde. Durante la segunda etapa, o desacilación, el intermedio de acil-enzima se hidroliza por una molécula de agua para liberar el péptido y para restaurar el Ser-hidroxilo de la enzima. La desacilación, que también implica la formación de una transición tetraédrico estado intermedio, procede a través de la vía de reacción inversa de acilación. Una molécula de agua es el nucleófilo atacante en lugar del residuo de Ser. El residuo de His proporciona una base general y acepta el grupo OH del reactivo Ser (Haq y Khan, 2003; Haq *et al.*, 2004).

2.2.3 CISTEIN PROTEASAS.

Esta familia incluye proteasas como papaína, actinidina o bromelaína varias cathepsinas lisosomales de mamífero, y las calpaínas citosólicas (calciumactivated), así como varias proteasas parasitarias (por ejemplo, Trypanosoma, Schistosoma). La papaína es el arquetipo y el miembro mejor estudiado de la familia. Reciente aclaración de la estructura de rayos X de la conversión de la enzima de interleucina-1-beta ha revelado un nuevo tipo de pliegue para cisteín proteasas. Al igual que las proteasas de serina, productos de catálisis a través de la formación de un intermedio covalente e implica una cisteína

y un residuo de histidina. La esencial Cys 25 y His159 (papaína) desempeñan el mismo papel como Ser 195 e His 57, respectivamente. El nucleófilo es un ion tiolato en lugar de un grupo hidroxilo. El ion tiolato se estabiliza mediante la formación de un par iónico con el grupo imidazolio vecino de His159. El nucleófilo atacante es el par iónico tiolato-imidazolio en ambas etapas, y no se requiere una molécula de agua (Kuroda *et al.*, 2001; Connors *et al.*, 2002; Yoza *et al.*, 2002; Haq *et al.*, 2004).

2.2.4 METALOPROTEASAS.

Las metaloproteasas pueden ser una de las mayores clases de proteasas y se encuentran en bacterias y hongos, así como en organismos superiores. Se diferencian ampliamente en sus secuencias y sus estructuras, pero la gran mayoría contienen un átomo de zinc que es catalíticamente activo. En algunos casos, el zinc puede ser sustituido por otro metal, como cobalto o níquel sin pérdida de la actividad (Barret, 1995). La Termolisina bacteriana ha sido bien caracterizada y su estructura cristalográfica indica que el zinc está unido por dos histidinas y un ácido glutámico. Muchas enzimas contienen la secuencia HEXXH, que proporciona dos ligandos de histidina para el zinc mientras que el tercer ligando es bien un ácido glutámico (termolisina, neprilisina, alanil aminopeptidasa) o una histidina (astacina). Otras familias presentan un modo distinto de unión del átomo de zinc (Graycar, 1999). El mecanismo catalítico conduce a la formación de un intermedio tetraédrico no covalente después del ataque de una molécula de agua unida a zinc sobre el grupo carbonilo del enlace escindible. Este producto intermedio se descompone adicionalmente por transferencia del protón del ácido glutámico al grupo saliente (Skiles *et al.*, 2004).

2.3 INHIBIDORES DE PROTEASAS.

Los inhibidores de proteasas son polipéptidos que tienen la habilidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas. Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Los inhibidores endógenos en plantas y animales parecen ser casi siempre pequeños polipéptidos y en microorganismos, pueden ser de origen no proteico. El número de inhibidores de proteasas aislados e identificados es grande; la mayoría de ellos pertenece al grupo de inhibidores de serín proteasas, seguidos de inhibidores de cisteín proteasas y, en menor cantidad, los inhibidores de metaloproteasas o aspartil proteasas. Existen además, la familia de las α 2-macroglobulinas, las cuales son capaces de inhibir todas las clases de proteasas (Bode y Huber, 1992; Kollipara y Hymowitz, 1992; Svelkoul *et al.*, 1992).

Las plantas poseen diferentes tipos de inhibidores de proteasas. Éstos juegan papeles importantes durante la germinación, regulando a las proteasas encargadas de la degradación de las proteínas de almacenamiento. También regulan la muerte celular programada durante la senescencia y contribuyen a la defensa contra insectos y patógenos (Koiwa *et al.*, 1997; Castro-Guillen *et al.*, 2010).

Algunos inhibidores son bifuncionales, con actividad inhibitoria contra tripsina y α -amilasa; otros tienen multidominios capaces de inhibir más de un tipo de actividad enzimática. Debido a que los insectos poseen principalmente una combinación de enzimas digestivas constituida por serín, cisteín y aspártico proteasas; los inhibidores que las plantas producen son capaces de atenuar la actividad de las dichas proteasas (Koiwa *et al.*, 1997).

Las semillas de leguminosas contienen principalmente inhibidores de serín proteasas, pertenecientes casi en su totalidad a las familias Kunitz y Bowman-Birk (Ceciliani *et al.*, 1997).

- Inhibidores tipo Kunitz: Tienen una masa molecular de 20 a 25 kDa. Poseen especificidad directa para inhibir a la tripsina y tienen pocos enlaces disulfuro en la molécula.

- Inhibidores tipo Bowman-Birk: Tienen una masa molecular de 6 a 10 kDa. Poseen una alta proporción de residuos de cisteína y tienen doble cabeza, por lo que presentan dos sitios reactivos diferentes, dirigidos contra tripsina y quimotripsina.

Estos dos compuestos son termolábiles de naturaleza proteica, que alteran la digestión de las proteínas, inhibiendo la acción de las enzimas digestivas que se enfocan hacia la hidrólisis de las proteínas de la dieta; los más conocidos son los que reaccionan con proteasas de serina, como la tripsina y la quimotripsina (Duffus y Slaughter, 1985; Belmar, 2001; Muzquiz et al., 2006)

Estas enzimas contienen relativamente grandes cantidades de aminoácidos azufrados, incluyendo a la metionina. De esta forma, puesto que la metionina es el aminoácido limitante en algunas leguminosas como la soya, el efecto del inhibidor es incrementado por la pérdida de aminoácidos esenciales endógenos, ya que se encuentran en poca cantidad (Duffus y Slaughter, 1985; De Lange *et al.*, 2000; Oloye, 2002; Kuo *et al.*, 2004). Se identifican diez familias de inhibidores de proteasas en función de la secuencia de aminoácidos que las conforman, siendo tres las más ampliamente distribuidas (Cuadro 1): las familias Bowman–Birk (que actúa uniéndose a la tripsina y quimotripsina), Kunitz (que actúa uniéndose en forma preferente a la tripsina) y de la papa – 1 (Muzquiz *et al.*, 2006; Salgado y Valdez, 2008).

Cuadro 1.- Familias de Inhibidores de Proteasas en plantas.

Familia	Proteasa inhibida
Inhibidores de Serin Proteasas <ul style="list-style-type: none"> • Familia Kunitz (Inhibidor de Tripsina de Soya) • Familia Bowman-Birk (p) • Familia de la Cebada (Inhibidor de Tripsina) • Familia I de papa • Familia II de papa 	Tripsina y/o Quimotripsina

- Familia de la Calabaza
- Familia Ragi1-2/inhibidor de Tripsina de maíz
- Familia Serpin

Inhibidores de Sistein Proteasas
(Fitocistatinas)
Inhibidores de Metaloproteasas
Inhibidores de Aspartico Proteasas

Papaína, Catepsinas, B, H, L

Carboxipeptidasa A, B
Catepsina D

(Modificado de Kaiowa *et al.*, 1997)

Los inhibidores de proteasas son altamente específicos, ya que reconocen a la enzima blanca gracias a la localización de aminoácidos clave. El sitio reactivo del inhibidor se asocia con la enzima de manera similar como lo haría el sustrato. Dicho sitio se encuentra cercano al sitio catalítico de la proteasa, que en el caso de tripsina está constituido por la serina 183 y la histidina 46, y para la quimotripsina es la serina 195, la histidina 57 y el ácido aspártico 102 (Hess, 1971; Keil, 1971). Los inhibidores de cisteín proteasas actúan sobre enzimas tipo papaína, la cual presenta un sitio catalítico organizado alrededor de la cisteína 25, la histidina 159 y la glicina 66 (Bode y Huber, 1992). En los alimentos de origen vegetal como legumbres, semillas, granos y cereales, los inhibidores de proteasas se consideran factores antinutricios ya que interfieren con la digestión de proteínas o con la absorción y utilización de amino ácidos y otros nutrientes.

2.3.1 INHIBIDORES DE PROTEASAS Y CANCER

Según algunos autores (Duffus y Slaughter, 1885; Belmar, 2001; Muzquiz et al., 2006), los inhibidores de proteasas son los factores antinutricionales más conocidos. Se encuentran principalmente en semillas crudas de leguminosas, también se encuentran en otros alimentos como: los huevos, la leche, los productos lácteos y las papas. Se ha estudiado la presencia de este factor principalmente en el ovomucoide de los huevos de aves, el amaranto, la soya y el fríjol.

Concuerdan algunos autores (Idouraine y Yensen, 1991; Muzquiz et al., 2006; Salgado y Valdez, 2008), que el efecto más importante de los inhibidores de proteasas es la inhibición del crecimiento, producida principalmente por la inactivación de la tripsina y la quimotripsina, debido a la formación de complejos estables e inactivos. Esto origina una hidrólisis incompleta de las cadenas peptídicas por parte de estas enzimas digestivas y por consiguiente, una disminución en la digestibilidad de la proteína; conjuntamente se ocasiona un aumento en la secreción pancreática de enzimas digestivas como tripsina, elastasa, amilasa y quimotripsina. Todas estas enzimas son ricas en aminoácidos, principalmente azufrados como la cisteína y la metionina dando como resultado la pérdida de proteína endógena rica en aminoácidos azufrados esenciales, además de la subutilización de la proteína dietaria (Belmar, 2001; Muzquiz et al., 2006; Salgado y Valdez, 2008). No hay evidencia de que los inhibidores de proteasa tengan algún efecto adverso al crecimiento y la salud humana. De hecho, un número creciente de datos sugiere que estos compuestos pueden mejorar la salud humana a través de sus efectos preventivos del cáncer (Kennedy, 1993; Kennedy, 1998; Formane, 2001).

Dentro de los inhibidores de proteasas de origen vegetal, el más estudiado ha sido el tipo Bowman-Birk de soya (IBB), el cual es un polipéptido de 7.8 kDa que inhibe tanto tripsina como quimotripsina (Moy y Billings, 1994). Este inhibidor ha mostrado tener un amplio efecto anticancerígeno en animales de experimentación, luego de ser administrado por diferentes vías y en un amplio intervalo de concentraciones (Kennedy, 1998). Se han realizado estudios utilizando el IBB puro, como parte de un extracto o como un concentrado, con resultados alentadores (Kennedy, 1993). El IBB ha resultado también ser un efectivo bloqueador de la transformación celular *in vitro* inducida con rayos X (Kennedy y Little, 1981), así como un potente agente inhibidor en líneas celulares transformadas (Wan *et al.*, 1998).

Entre los mecanismos de acción sugeridos para este tipo de compuestos se encuentra la inhibición de proteasas clave en el proceso maligno. Se ha observado

que, al inhibir las proteasas encargadas de la digestión de proteínas de la matriz extracelular, se detiene el proceso de invasión carcinogénica y se inhibe el desarrollo del tumor maligno (Docherty *et al.*, 1992; Kennedy, 1993; Brown, 1994).

Además, se ha observado que los inhibidores de proteasas poseen efectos sobre genes supresores de tumor como p-53, c-myc y c-fos (Das y Mukhopadhyay, 1994; Lopes *et al.*, 1997; Troll *et al.*, 1987). El efecto anticancerígeno de algunos inhibidores de proteasas naturales y sintéticos, y su posible mecanismo de acción, se relaciona con su capacidad para inhibir quimotripsina (Das y Mukhopadhyay, 1994; Moy y Billings, 1994; Clawson, 1996; Fernandes y Banerji, 1997; Kennedy, 1998).

Entre los efectos asociados con la administración local de inhibidores de proteasas, está la acción anti-inflamatoria. La inflamación de un tejido conlleva a la infiltración de neutrófilos, lo cual eleva la cantidad de especies oxidantes capaces de dañar el material genético de las células. Durante este proceso, se inducen dos tipos de enzimas: la proteínasa C y proteasas tales como el activador del plasminógeno. Al aplicar inhibidores de proteasas de manera tópica ha sido posible inhibir la promoción del tumor (Troll *et al.*, 1987). También se ha informado que la ingesta de inhibidores de proteasas de origen natural como la antipaina, la quimiostatina y la leupeptina (de origen microbiano) previenen el proceso maligno en animales de experimentación (Billings *et al.*, 1992).

Los Inhibidores de la proteasa han demostrado ser un interesante grupo de moléculas desde el punto de vista de la modulación de las funciones fisiológicas y patológicas, teniendo gran potencial contra el cáncer, mostrando un proceso extraordinariamente intrincado de su mecanismo de acción implicado en el desarrollo del cáncer. Las diferencias en la forma que actúan diversos inhibidores de proteasas dificultan la confirmar exactamente la principal vía responsable de su efecto antitumoral, y en la mayoría de los casos, se desconoce la enzima o enzimas blanco que actúan con un inhibidor en particular. El efecto anticancerígeno de los inhibidores de la proteasa puede afectar el nivel de expresión genética, así como a nivel de proteínas, diferentes moléculas de

señalización. En algunos casos, el mecanismo en el que participa los inhibidores de proteasas para ejercer su efecto anticancerígeno es la inhibición de la actividad de tipo quimotripsina del proteasoma 26 S, que da una idea del papel fundamental que esta actividad cumple en la progresión del cáncer y la compleja red de vías metabólicas afectadas por ella. Lo cual pudiera concluir que algunos inhibidores proteasas han demostrado su importancia en la regulación de los diferentes eventos que interfieren con el desarrollo y / o la metástasis del cáncer. Sin embargo, no hay un mecanismo general para este tipo de moléculas, que pueden interactuar en diferentes niveles, incluyendo la posibilidad de que en algunos casos pueden favorecer el proceso de cáncer. Por lo tanto, fomentando al mismo tiempo la continuidad de los estudios dirigidos a la comprensión de las bases moleculares para cada inhibidor de proteasas, es pertinente señalar que se debe tener cuidado para asegurar que no estarían presentes efectos negativos. En conclusión, los inhibidores de proteasas constituyen un tipo promisorio de moléculas con potencial para su posible aplicación en el pronóstico, el diagnóstico y la terapia en el cáncer (Castro-Guillen *et al.*, 2010).

2.4 FRIJOL TÉPARI (*Phaseolus acutifolius*).

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 (González de Mejía *et al.*, 1989; Córdoba y Martínez, 1997). El nombre científico del frijol Tépari es *Phaseolus acutifolius*, pertenece a la familia de las *Fabaceae*. 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 (González de Mejía *et al.*, 1989; Córdoba y Martínez, 1997).

2.4.1 ESTUDIOS DE TOXICIDAD DEL FRIJOL TÉPARI.

El frijol Tépari presenta compuestos antinutricios como 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 y Prisecaru, 2005).

Algunos 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).

Estudios de toxicidad con una fracción semipura de lectinas de frijol Tépari, administradas intraperitonealmente en ratones CD-1, se encontró la dosis letal (LD50) de 1100 y 1120 mg/kg de peso corporal en machos y hembras respectivamente (Reynoso *et al.*, 2003).

En un modelo subcrónico, la administración oral con 50 mg/kg de peso de una fracción de lectinas de frijol Tépari, provocó disminución del consumo de alimento y el peso corporal por 3 semanas de las ratas en estudio. Mostrando una resistencia a la digestión de 72 h y una respuesta tipo alérgica por un incremento en los eosinófilos. Aunque no mostró alteraciones en los marcadores sanguíneos, la toxicidad del tratamiento fue baja sin efectos permanentes, sugiriendo estos por un mecanismo compensatorio de las ratas (Ferriz-Martínez *et al.*, 2014).

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Cuál es la toxicidad aguda y subcrónica de la mezcla de una fracción de lectina y un inhibidor de proteasas de frijol Tépari *in vivo*?

IV. JUSTIFICACIÓN.

Dado que existen evidencias del efecto anticancerígeno de la fracción concentrada de lectinas y el inhibidor de proteasas individualmente, es necesario realizar estudios sobre el efecto tóxico de la mezcla de éstos en un modelo animal, para determinar una dosis segura para estudios posteriores en modelos animales con cáncer colon.

V. HIPÓTESIS.

La administración de la mezcla de una fracción de lectinas con un inhibidor de proteasas presenta baja toxicidad *in vivo*.

VI. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la toxicidad aguda y subcrónica de la administración oral de la mezcla de una fracción de lectinas y un inhibidor de proteasas de frijol Tépari *in vivo*.

6.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Evaluar la toxicidad aguda de diferentes dosis de una fracción de lectinas e inhibidor de proteasas de frijol Tépari *in vivo*.
- Evaluar la toxicidad subcrónica, de la dosis más alta sin efectos adversos obtenida en el ensayo de toxicidad aguda, sobre daño renal, hepático, pancreático y nutricio.
- Evaluar la toxicidad de la dosis más alta sin efectos adversos obtenida en el ensayo de toxicidad aguda bajo un esquema de administración farmacológico, sobre daño renal, hepático, pancreático y nutricio.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.

Se trató de un estudio experimental, comparativo y observacional. Se trabajó con un liofilizado de una fracción de lectinas y un inhibidor de proteasas de frijol Tépari, denominada LIP-60.

La obtención de la fracción está a cargo del Dr. Alejandro Blanco Labra en el laboratorio de Mecanismo de Defensa de Plantas del CINVESTAV Irapuato, para ésta el proceso inicia con el molido del frijol Tépari hasta obtener la harina, esta se lleva a un proceso de desgrasado con cloroformo-metanol (2:1), se solubiliza la

proteína con agua en agitación constante a 4°C y se centrifuga, el sobrenadante se separa con (NH₄)₂SO₄ al 40% y se vuelve a centrifugar, se precipita al 60% con (NH₄)₂SO₄ el sobrenadante y se centrifuga nuevamente para que este precipitado se resuspenda y al final se dializa y liofiliza.

Se le determinó la concentración de proteína a 595 nm por el método de Bradford (1976) y la actividad aglutinante mediante el método de Jaffé (1980), utilizando eritrocitos humanos fijados con glutaraldehído (Turner y Liener, 1975).

7.2 EXPERIMENTO *IN VIVO*.

7.2.1 ESTUDIO DE LA TOXICIDAD ORAL AGUDA.

Para la prueba de toxicidad aguda se utilizaron las dosis de 10, 100 y 1000 mg/Kg de peso de LIP-60 establecidas de acuerdo a los trabajos previos realizados en nuestro laboratorio con dosis de 5, 50, 300 y 2000 mg/kg de peso con FCL (López-Sánchez *et al.*, 2010) y a la OECD 423 (2001). Se incluyeron 1 grupo control (solución salina 0.9%) y 3 grupos con tratamiento. Se utilizaron 4 ratas Sprague Dawley por cada grupo, hembras sanas, nulíparas y no embarazadas, de 5 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 (Rat Chow 5001) 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 7 días previos a la administración de la dosis para aclimatarlos a las condiciones del laboratorio. Cada uno de los animales fue pesado y se calculó la dosis a administrar con base en el peso corporal. La fracción LIP-60 se administró como dosis única por vía intragástrica en un volumen constante (el volumen máximo de líquido que se administró en una sola

dosis de 0.5 mL/100 gr de peso corporal aproximadamente). 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 y posteriormente diariamente hasta completar un total de 14 días. Todas las observaciones se registraron sistemáticamente de forma individual.

Al término del tratamiento los animales fueron sacrificados con cámara de gases, utilizando cloroformo para este método. Se realizó la necropsia, determinando el peso de hígado, corazón, riñones, estómago, intestino delgado, timo y bazo; y se observó si había anomalías macroscópicas.

7.2.2 ESTUDIO DE LA TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA.

Se trabajó con ratas Sprague-Dawley machos y hembras de 5 semanas de edad las cuales fueron colocadas en jaulas metabólicas individuales, con iluminación artificial de ciclos de luz-oscuridad de 12 horas cada uno. La alimentación fue con base en una dieta convencional para roedores de laboratorio Rat Chow 5001 autoclaveado y agua potable *ad libitum*. Para la separación de los grupos experimentales los animales se seleccionaron al azar y se marcaron para permitir su identificación individual.

En el experimento se trabajó con 2 grupos de animales: grupo control, administrado con solución salina al 0.9% y un grupo tratamiento, administrado con 100 mg de LIP-60/kg de peso en solución salina OECD 401 (2006). Los animales permanecieron en sus jaulas 7 días previos para su adaptación a las condiciones del laboratorio. Cada uno de los animales fue pesado y se calculó la dosis a administrar de acuerdo a su peso corporal. Se determinó el consumo de alimento dos veces a la semana y peso corporal semanalmente. Se administraron diario durante 28 días. Al término de los tratamientos los animales fueron sacrificados por decapitación, con guillotina previamente revisada, para recolección y análisis de la sangre.

También se realizó el estudio subcrónico probando un tratamiento farmacológico que consistió en administrar a dos grupos de ratas Sprague Dawley de 12 semanas de edad, control y tratamiento. Al grupo control se le administró solución salina al 0.9%, y al grupo con tratamiento, que se le administró 100 mg de LIP-60/kg de peso por dos días a la semana durante 6 semanas, al término de este tiempo las ratas fueron sacrificadas y se trataron como se describió en la prueba subcrónica.

La biometría hemática se realizó con ayuda de un hematocitómetro de la marca CellDyn® serie 1600 el cual mide los siguientes parámetros: WBC: Glóbulos Blancos, LYNF: Linfocitos, GRAN: Granulocitos, %LINF: % de Linfocitos, %GRAN: % de Granulocitos, RBC: Glóbulos Rojos, HGB: Hemoglobina, HCT: Hematocrito, VCM: Volumen Corpuscular Medico, MCH: Hemoglobina Corpuscular Media, MCHC: Concentración Media de Hemoglobina Corpuscular, PLT: Plaquetas.

7.3 MARCADORES DE FUNCIÓN HEPÁTICA.

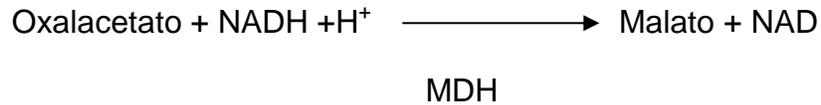
a) Determinación de Aspartato AminoTransferasa (AST).

La AST es una enzima bilocular (citoplasmática y mitocondrial) ampliamente difundida. Se encuentra en mayor concentración en hígado y corazón. Cualquier alteración de estos tejidos produce un aumento en los niveles de AST circulante.

Cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al 2-oxoglutarato, formando oxalacetato y glutamato (Pesce y Kaplan, 1990; Anderson y Cockayne, 1995). La concentración se determinó empleando la reacción acoplada de la malato deshidrogenasa (MDH) a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm (Diagnostic Chemicals Limited, Canadá, Charlottetown). La cantidad de NADH consumido fue directamente proporcional a la actividad de la AST.

La reacción se presenta como:





La actividad de la AST se expresó en unidades por litro U/L:

$\Delta A/\text{min} \times \text{volumen del análisis (mL)} \times 1000$

$$\begin{aligned} \text{Aspartato Amino Transferasa U/L} &= \frac{\Delta A/\text{min} \times \text{volumen del análisis (mL)} \times 1000}{6.22 \times \text{paso de luz (cm)} \times \text{volumen de la muestra (mL)}} \\ &= \Delta A/\text{min} \times 3376 \end{aligned}$$

$\Delta A/\text{min}$ = cambio de absorbancia por minuto

Volumen del análisis = volumen de la reacción total expresado en mL

1000 = convierte U/mL a U/L

6.22 = coeficiente de absorbancia de NADH a 340 nm

Paso de luz = distancia del paso de luz expresado en cm (usualmente 1.0)

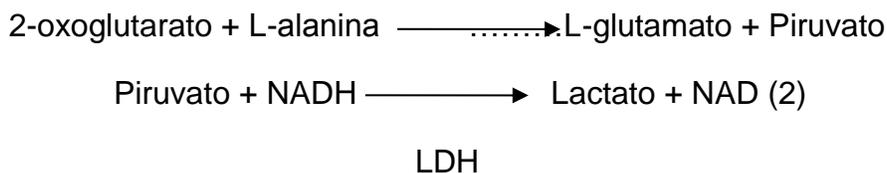
Volumen de muestra = volumen de muestra expresado en mL

3376 = factor derivado de las constantes en la ecuación

a) Determinación de Alanina AminoTransferasa (ALT).

El grado de necrosis hepática se evaluó mediante la determinación de la actividad en plasma de la enzima ALT mediante la utilización de un kit comercial (Diagnostic Chemicals Limited, 2004, No. Catálogo 318-10). La ALT cataliza la transferencia de un grupo amino de la alanina al 2-oxoglutarato para formar glutamato y piruvato (Pesce y Kaplan, 1990; Anderson y Cockayne, 1995). El piruvato fue posteriormente reducido a lactato en presencia de la enzima lactato deshidrogenasa, con la oxidación simultánea de NADH. La cantidad de NADH consumido (absorbancia a 340 nm) fue directamente proporcional a la actividad de la ALT.

La reacción se presenta como:



La actividad de la ALT se expresada en unidades por litro U/L:

$\Delta A/\text{min} \times \text{volumen del análisis (mL)} \times 1000$

$$\begin{aligned} \text{Alanina aminotransferasa U/L} &= \frac{\Delta A/\text{min} \times \text{volumen del análisis (mL)} \times 1000}{6.22 \times \text{paso de luz (cm)} \times \text{volumen de la muestra (mL)}} \\ &= \Delta A/\text{min} \times 3376 \end{aligned}$$

$\Delta A/\text{min}$ = cambio de absorbancia por minuto

Volumen del análisis = volumen de la reacción total expresado en mL

1000 = convierte U/mL a U/L

6.22 = coeficiente de absorbancia de NADH a 340 nm

Paso de luz = distancia del paso de luz expresado en cm (usualmente 1.0)

Volumen de muestra = volumen de muestra expresado en mL

3376 = factor derivado de las constantes en la ecuación.

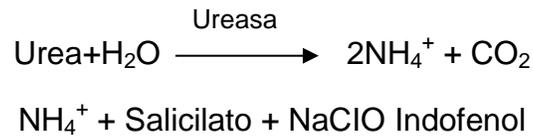
7.5 MARCADORES DE FUNCIÓN RENAL.

a) Determinación de Urea.

La urea se sintetiza en el hígado como un producto de la desaminación de los aminoácidos. Su eliminación en la orina representa la principal vía de excreción del nitrógeno. Se encuentran concentraciones elevadas de urea en plasma como consecuencia de una dieta hiperprotéica, aumento del catabolismo proteico, después de una hemorragia gastrointestinal, ligera deshidratación, shock e

insuficiencia cardíaca o tratamiento con glucocorticoides (uremia prerrenal). La utilidad de la urea como indicador de la función renal está limitada por la variabilidad de su concentración plasmática como consecuencia de factores no renales (Sánchez de Medina, 2010). La urea presente en la muestra origina un indofenol coloreado que se cuantifica espectrofotométricamente a 340 nm (Diagnostic Chemicals Limited, Canadá, Charlottetown).

La reacción se presenta como:



La determinación de urea se expresó en mg/dL bajo la siguiente fórmula:

Este método = 1.00 (método de referencia) - 0.04 mmol/L (0.1 mg/dL)

7.6 MARCADORES BIOQUÍMICOS DEL ESTADO NUTRICIO.

a) Determinación albúmina.

Las diversas funciones de la albúmina en el flujo sanguíneo incluyen el transporte de aniones orgánicos insolubles, la fijación de metales pesados tóxicos, el transporte de hormonas poco solubles, el mantenimiento de la presión osmótica coloidal del plasma y la provisión de un almacenamiento de reserva de proteínas (Pacheco, 2001). Los valores séricos bajos pueden deberse a desnutrición o neuropatía, un aumento en el catabolismo, un aumento en la excreción de orina o heces, o un cambio en la distribución entre los compartimento intra y extravasculares (Diagnostic Chemicals Limited, Canadá, Charlottetown).

La reacción se presenta como:

Albúmina + BCG → Complejo BCG-albúmina

La determinación de la albúmina se expresó en g/ dL y se llevó a cabo con la siguiente fórmula:

$$\text{Albúmina (g/dL)} = \frac{A \times \text{concentración del calibrador}}{A_c}$$

A = absorbancia de la muestra desconocida

A_c = absorbancia del calibrador

b) Determinación de Proteína Total.

El uso de la reacción de Biuret como método para la estimación de proteínas en el plasma la introdujo por primera vez Reigler. Gornall y colaboradores modificaron el procedimiento al agregar tartrato de sodio potasio en cual actúa con un agente que forma un complejo para producir un complejo de proteína-cobre estable (Riegler, 1914). Este método utiliza la reacción de Biuret donde la proteína reacciona con el reactivo a pH alcalino para formar un complejo colorido azul-violeta (Diagnostic Chemicals Limited, Canadá, Charlottetown).

Las determinaciones de proteína total son útiles en el diagnóstico y tratamiento de una diversidad de enfermedades que afectan el hígado, riñones, médula ósea así como otros trastornos metabólicos o nutricionales. Para la determinación se utilizó un kit comercial de la marca Diagnostic Chemicals Limited, Canadá, Charlottetown.

A pH alcalino, la proteína reacciona con el cobre del reactivo de Biuret causando un aumento en la absorbancia. El incremento en la absorbancia a 540 nm debido a la formación del complejo azul-violeta es directamente proporcional a la

concentración de proteína en la reacción (Diagnostic chemicals limited. Canadá. Charlottetown).

La reacción se presenta como:



Los resultados se expresaron en g/dL y se calcularon en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína Total g/L (g/dL)} = \frac{A}{A_c} \times \text{concentración del calibrador}$$

A = absorbancia de la muestra desconocida

A_c = absorbancia del calibrador

7.7 Marcadores de función pancreática

a) α -Amilasa

La α -amilasa (1,4- α -D-Glucan glucanohidrolasa) es una enzima del aparato digestivo. Hidroliza el almidón de los alimentos y el glicógeno para formar maltosa al fragmentar sus cadenas en los enlaces hemiacetal alternados. La enzima es normalmente secretada en el tubo digestivo a partir de las glándulas parótidas y el páncreas (Burtis y Ashwood, 1994). En enfermedades que afectan estas glándulas y particularmente cuando el conducto pancreático está obstruido, disminuye la cantidad de la enzima en el suero (Diagnostic Chemicals Limited, Canadá, Charlottetown).

La reacción se presenta como:



La α -amilasa reacciona directamente con el 2-cloro-4-nitrofenil-maltotriósido (CNP3) para liberar 2-cloro-*p*-nitrofenol que es medido a 405 nm. El incremento en absorbancia a 405 nm es proporcional a la cantidad de α -amilasa en la muestra.

La determinación de α -amilasa se expresó en U/L, por medio de la siguiente fórmula:

$$\alpha\text{-Amilasa (U/L)} = \frac{\Delta A/\text{min} \times \text{vol}}{12.9 \times \text{paso de luz (cm)} \times \text{volumen de la muestra (mL)}} \\ = \Delta A/\text{min} \times 3178$$

$\Delta A / \text{min}$ = cambio en absorbancia por minuto ($\Delta A / 30 \text{ seg} \times 2$)

Volumen del análisis = volumen total de la reacción expresado en mL

1000 = convierte las U/mL a U/L

12.9 = coeficiente de absorción del 2-cloro-*p*-nitrofenol a 405 nm

Paso de luz = longitud del paso de luz expresada en cm (usualmente 1.0)

Volumen de la muestra = volumen de la muestra expresado en mL

3178 = factor derivado de las constantes en la ecuación

7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó una T de student para la prueba Subcrónica y ANOVA para comparación de medias entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) o cada tratamiento respecto a su control (Dunett, $p \leq 0.05$) para la Aguda utilizando el programa SPSS versión 16.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA ORAL DE LA FRACCIÓN LIP-60.

Se ha observado que algunas lectinas administradas por vía oral a animales de experimentación causan síntomas gastrointestinales agudos, falta de crecimiento e incluso la muerte (Liener, 1974; Pusztai *et al.*, 1979; Lajolo y Genovese, 2002). Después de la administración oral de las diferentes dosis únicas de la LIP-60 se observó un signo clásico de toxicidad por lectinas, como es la letargia durante las primeras 12 h con la dosis más alta probada (1000 mg/kg de peso corporal) sin embargo, posteriormente los animales presentaron una recuperación total. En este caso se presentó el signo de toxicidad a nivel gástrico, pero no se observó falta de crecimiento ni la muerte de los animales en estudio, lo que sugiere baja toxicidad de la LIP-60 estudiada con respecto a otras. Por ejemplo, la ricina por vía oral, al cabo de 12 h, 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 de ricina se ha determinado en 20 mg/kg a 85 horas (Patocka, 2008). Es bien sabido que un mismo agente tóxico puede producir efectos muy diferentes dependiendo de la ruta por la cual la absorbe el sistema biológico (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 estudios con la FCL administrada de manera oral es menos tóxica que por vía intraperitoneal, lo cual concuerda con los resultados obtenidos con LIP-60. 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 h por inhalación, 5 µg/kg en 90 h por vía intravenosa, 22 µg/kg en 100 h por vía intraperitoneal, 24 µg/kg en 100 h por vía

subcutánea. La abrina, por su parte, es 75 veces más potente que la ricina (Patocka, 2008).

El consumo diario de alimento no presentó variaciones significativas ($p < 0.05$) entre los grupos de estudio al igual que con la FCL (Figura 1). El peso corporal de las ratas tampoco mostró cambios ($p < 0.05$) aún con la dosis más alta probada (1000 mg/kg de peso corporal) (Figura 2). Después de la administración oral de las diferentes dosis únicas de la FCL, en el estudio de toxicidad aguda 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. (López-Sánchez *et al.*, 2010).

Al realizarse la necropsia no se observaron alteraciones macroscópicas.

Por lo anterior, y debido a que la dosis de 100 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.

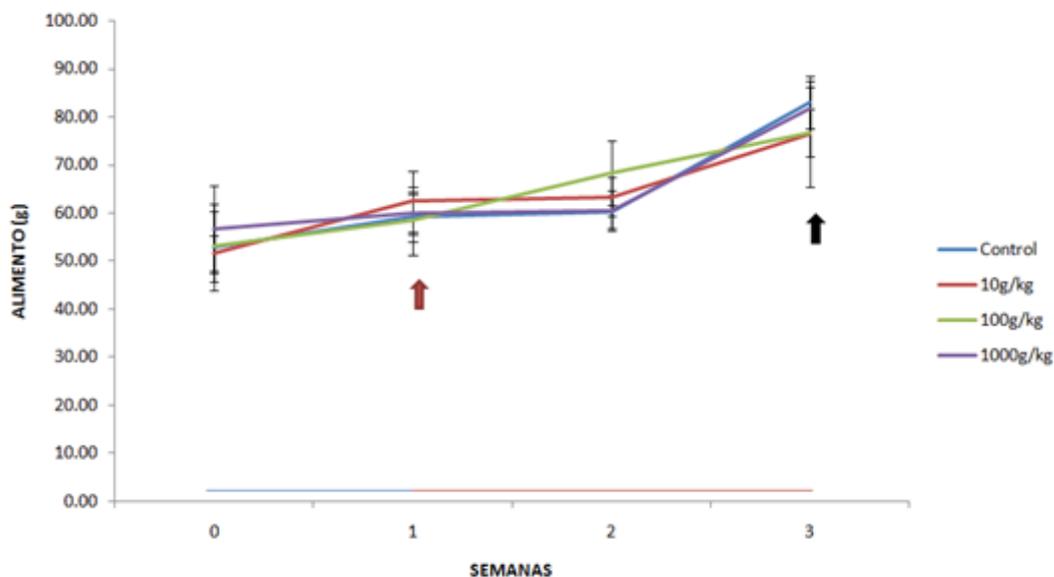


Fig. 1.- Consumo de alimento de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de LIP-60 en el estudio de toxicidad aguda. El alimento consumido fue registrado semanalmente. La flecha roja indica la administración única de LIP-60 y la flecha negra el sacrificio. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$) o respecto al control (Dunnett $p < 0.05$).

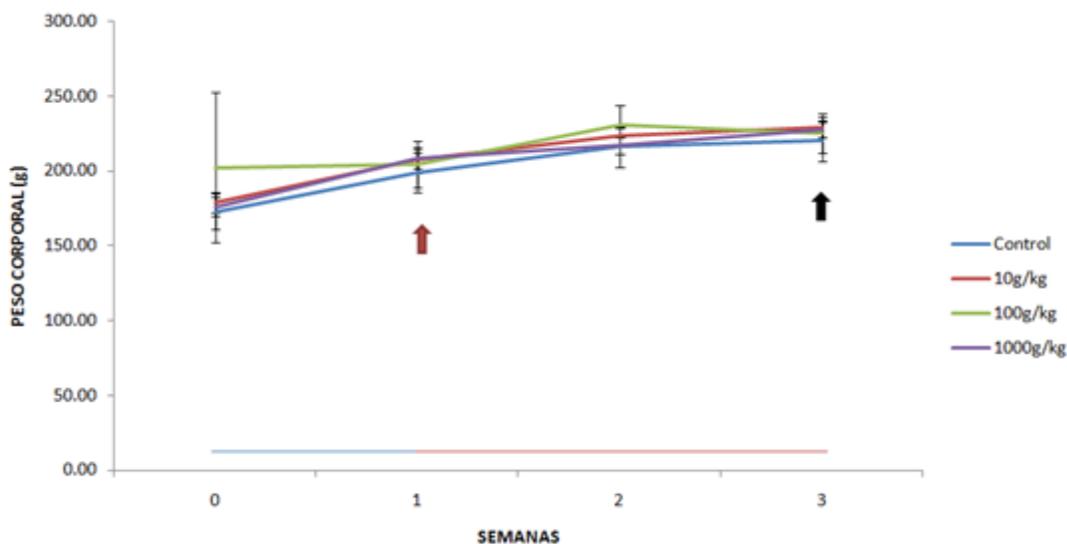


Fig. 2.- Peso corporal de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de LIP-60 en el estudio de toxicidad aguda. El peso corporal fue registrado semanalmente. La flecha roja indica la administración única y la flecha negra el sacrificio. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$) o respecto al control (Dunnett $p < 0.05$).

8.2 ESTUDIO DE LA TOXICIDAD SUBCRONICA ORAL DE LA FRACCIÓN LIP-60.

Se administró una dosis de LIP-60 (100 mg/kg de peso corporal) diariamente durante 28 días vía oral para el estudio de toxicidad subcrónica. Las ratas administradas con LIP-60 presentaron signos clásicos de toxicidad por lectinas como aletargamiento, piloerección, diarrea e hirsuto desde la segunda semana del tratamiento; 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 (Figuras 3 y 4).

Se observó una disminución en el consumo de alimento de las ratas administradas a la tercera semana pero sin tener una diferencia significativa respecto al control,

recuperándose estas ratas a la cuarta semana. En cuanto al peso corporal, se observó disminución en la ganancia de peso de las ratas administradas con LIP-60 en la tercera semana respecto al control sin ser estadísticamente significativa. Resultados similares se han documentado en el estudio de toxicidad subcrónica en la FCL (López-Sánchez *et al.*, 2010).

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 revelaron que la administración oral de dosis bajas de lectinas puede 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, aunque en algunas de las ratas tratadas con LIP-60 en este estudio presentaban gasificación en el estómago.

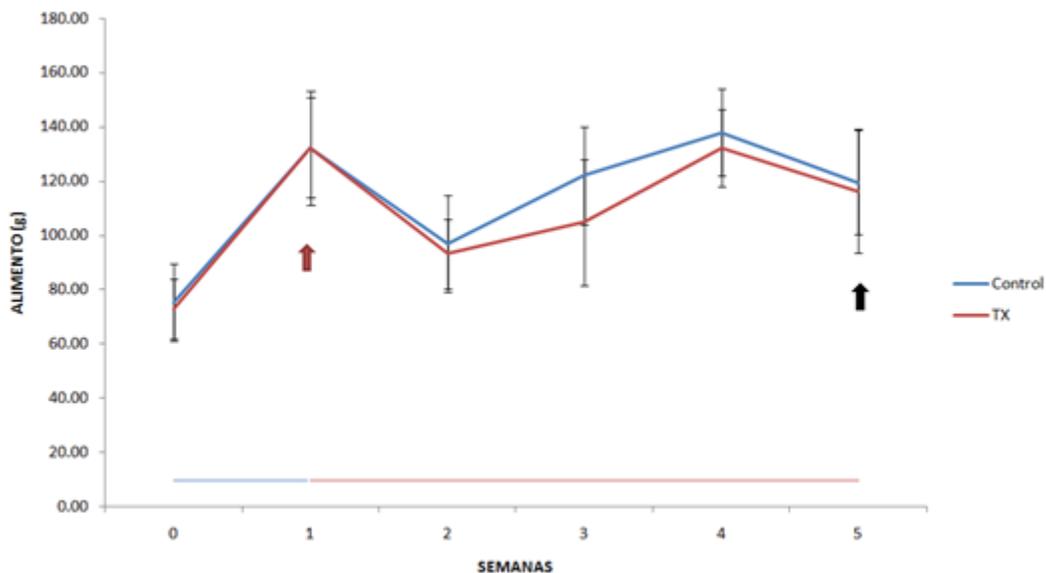


Fig. 3.-

Consumo de alimento de ratas Sprague Dawley tratadas con LIP-60 en dosis de 100 mg/kg de peso corporal en el estudio de toxicidad subcrónica. El alimento consumido fue registrado semanalmente. La flecha roja

indica el inicio de la administración y la flecha negra el sacrificio. No se observaron diferencias significativas (t de student, $p < 0.05$).

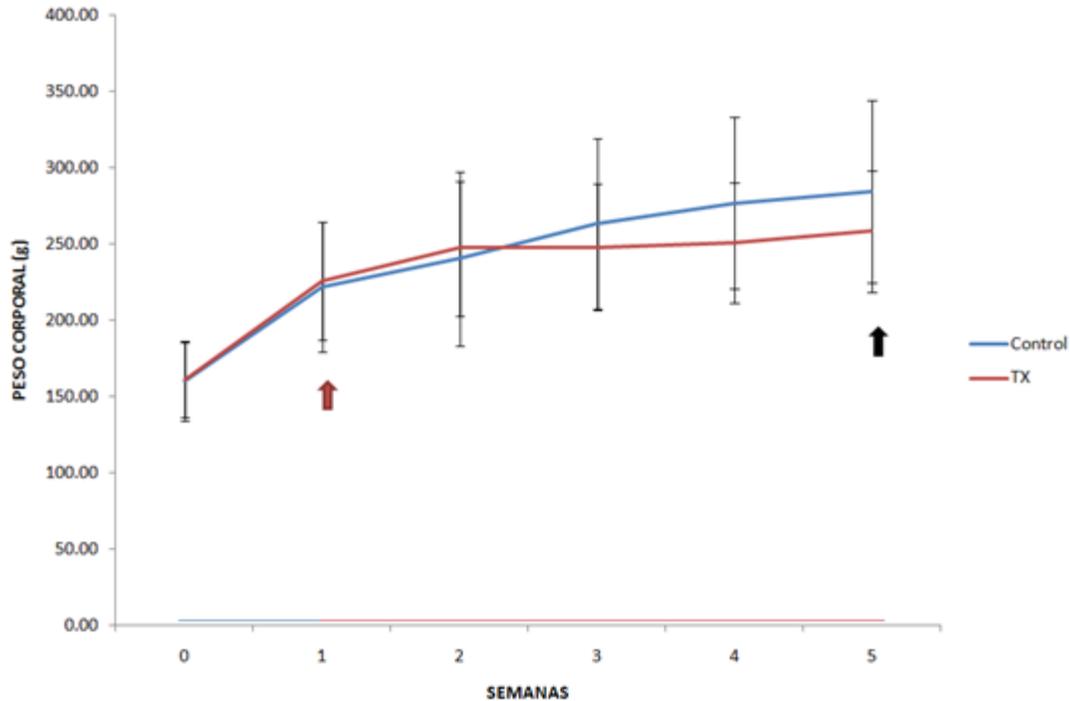


Fig. 4.- Peso corporal de ratas Sprague Dawley tratadas con LIP-60 en dosis de 100 mg/kg de peso corporal en el estudio de toxicidad subcrónica. El peso corporal fue registrado semanalmente. La flecha roja indica el inicio de la administración y la flecha negra el sacrificio. No se observaron diferencias significativas (t de student, $p < 0.05$)

Para el análisis histopatológico fueron extraídos el hígado, riñones, páncreas, intestino delgado e intestino grueso. No se observaron diferencias significativas en cuanto al peso de órganos (t de student, $p < 0.05$) (Figura 5). En el estudio de la toxicidad subcrónica con FCL no se observaron alteraciones histológicas en colon e intestino delgado de las ratas hembra 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 (López-Sánchez *et al.*, 2010; Ferriz-Martínez *et al.*, 2014). El mismo efecto fue observado para el grupo de ratas macho. 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. Aun 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).

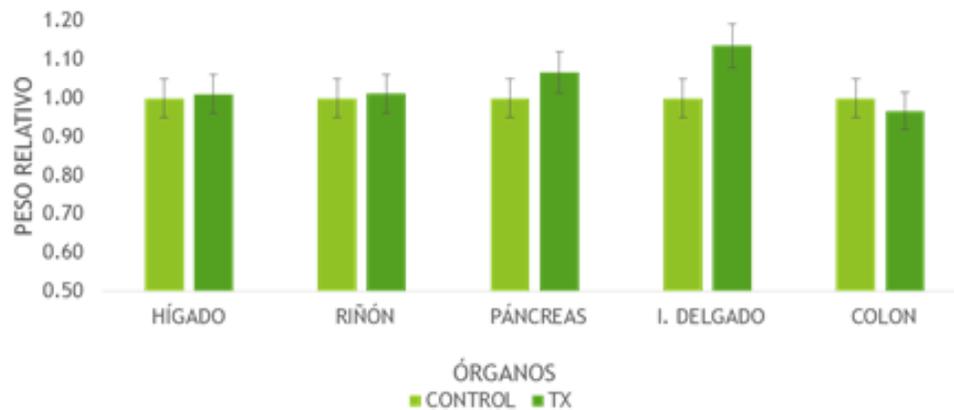


Fig. 5.- Peso ajustado de los órganos de ratas Sprague Dawley en el estudio de toxicidad subcrónica. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico de los órganos se pesaron y se fijaron en formol. No se observaron diferencias estadísticas respecto al control (t de Student $p < 0.05$)

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 propiedades tóxicas, como es el caso de las lectinas de garbanzo (Valle y Lucas, 2000). La fracción LIP-60 de Frijol Tépari no mostró alteraciones en intestino grueso y delgado, mismo resultado obtenido en un estudio anterior con la FCL de este mismo frijol. 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 no mostró alteraciones en los órganos estudiados de las ratas administradas con 100mg/kg de peso de LIP-60 (Figura 6), resultados que coinciden con los datos obtenidos en el estudio histopatológico con la FCL del frijol Tépari.

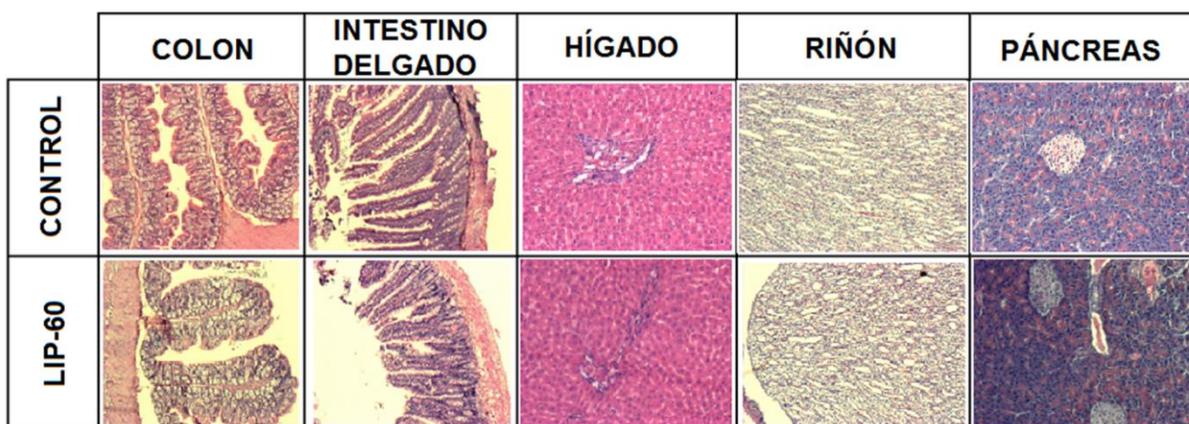


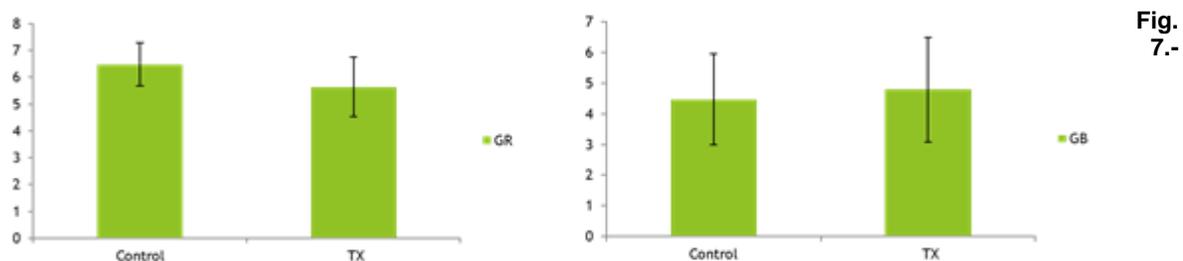
Fig 6.- Análisis histopatológico de colon, intestino delgado, hígado, riñón y páncreas de Ratas Sprague Dawley es el estudio de toxicidad subcrónica. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico de los órganos, se pesaron y se fijaron el formaldehído. Posteriormente se realizaron los cortes histopatológicos y se observaron. No se encontraron diferencias entre cada órgano contra su control respectivamente.

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 (Wenbiao Wu y Rong Sun, 2012).

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 LIP-60 no se observaron alteraciones macroscópicas que sugieran toxicidad.

Con respecto al total de glóbulos blancos (GB), no se observó diferencia estadísticamente significativa (t de student, $p > 0.05$); de igual forma en el recuento de glóbulos rojos sin diferencia estadísticamente significativa (t de student, $p > 0.05$) entre los grupos control y tratamiento (Figura 7). Un análisis más detallado de los glóbulos blancos mostró el comportamiento de linfocitos y granulocitos (Figura 8), el cual fue similar al control sin encontrarse diferencia estadísticamente significativa. Lo anterior concuerda con un estudio de nuestro laboratorio anterior con la fracción LIP-60 sobre células hematopoyéticas a diferentes tiempos (Moreno-Celis, 2013), aunque para el caso de los linfocitos al día 14 de tratamiento se observó una disminución de 33% aproximadamente. En el caso de los granulocitos, se observó un aumento del 100% a partir del primer día de administración normalizándose después de 9 días; lo que sugiere una respuesta tipo alérgica en las ratas que recibieron el tratamiento con LIP-60 desde las primeras 24 h.



Recuento de glóbulos rojos y glóbulos blancos de ratas tratadas con LIP-60 en el estudio de toxicidad subcrónica. No se observó diferencias significativas, entre los controles y los tratamientos respectivamente (t de student, $p > 0.05$).

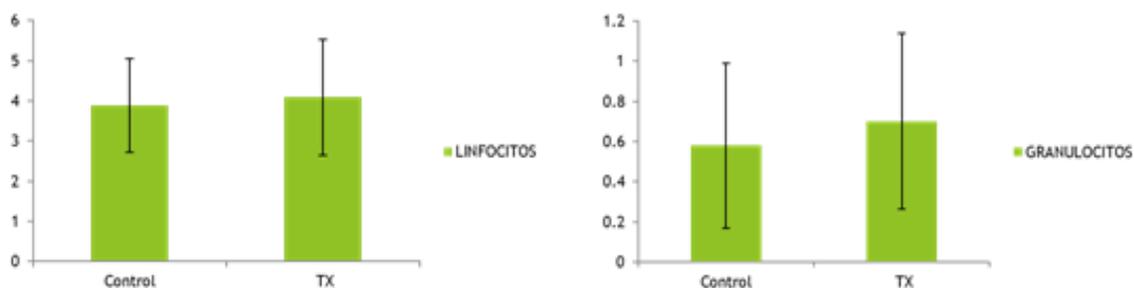


Fig. 8.- Recuento de linfocitos y granulocitos de la serie blanca de ratas tratadas con LIP-60 en el estudio de toxicidad subcrónica. No se observó diferencias significativas, entre los controles y los tratamientos respectivamente (t de student, $p>0.05$).

En el Cuadro 2 se muestran los diferentes marcadores sanguíneos de la prueba subcrónica. No se encontraron diferencias significativas tanto a nivel hepático, renal, pancreático y del estado nutricional. Algunos 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). El estudio realizado con FCL de frijol Tépari previamente mostró que no se encontraron diferencias significativas en los mismos marcadores (Ferriz-Martínez et al., 2014).

Cuadro 2.- Determinación de marcadores sanguíneos de ratas Sprague Dawley tratadas con 100 mg/kg de la fracción LIP-60 en la prueba subcrónica.

MARCADOR	REFERENCIA	CONTROL	LIP-60
PT (mg/dL)	5.9 – 7.9	10.51±0.37	9.59 ±0.13
ALB (mg/dL)	3.8 – 4.8	3.75 ±0.13	3.48 ±0.11
AST (U/L)	39 – 262	143.11 ± 5.5	148.38 ± 6.46
ALT (U/L)	35 – 80	56.70 ± 4.76	61.32 ± 9.41
UREA (mg/dL)	26.1 – 62.24	56.32 ± 0.32	57.10 ± 0.42
AMILASA (U/L)	ND	5.60 ±0.49	5.54 ± .060

PT.- Proteína Total, ALB.- Albumina, AST.- Aspartato amino transferasa, ALT.- Alanino amino transferasa.

No se observó diferencia significativa entre los grupos (t de student, $p\leq 0.05$)

*Valores de referencia de acuerdo al Canadian Council on Animal Care, 2005

8.3 ESTUDIO DE LA TOXICIDAD FARMACOLÓGICA ORAL DE LA FRACCIÓN LIP-60.

Para el caso del experimento en el que se probó un esquema de administración farmacológico, el consumo del alimento mostró un comportamiento similar a los

resultados anteriores sin embargo, después de la tercera semana de administración se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el control y el tratamiento (Figura 9). Lo anterior puede ser debido a un efecto compensatorio en los animales. En cuanto al peso de las ratas se observó un efecto similar (Figura 10). Lo anterior se había observado con la FCL, donde en la primera semana de tratamiento las ratas disminuyeron significativamente el consumo de alimento, así como la ganancia de peso en la segunda semana, recuperándose al final del tratamiento (Ferriz-Martinez *et al.*, 2014)

El peso de los órganos de las ratas durante la prueba de toxicidad farmacológica se muestra en la figura 11. No se observaron cambios significativos respecto al control. Respecto a los marcadores sanguíneos (Cuadro 3) tampoco se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. Lo anterior sugiere que la fracción LIP-60 administrada por vía oral no presenta toxicidad sistémica al final del tratamiento. Algunos marcadores se encontraron fuera del intervalo de acuerdo a los valores de referencia (Canadian Council on Animal Care, 2005) lo cual puede atribuirse a las técnicas analíticas empleadas, ya que en muchas ocasiones el uso de ciertos reactivos afecta los resultados obtenidos. Mismos resultados obtenidos con la FCL antes estudiada (Ferriz- Martínez *et al.*, 2014).

Con respecto a la biometría hemática, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (t de estudent, $p > 0.05$) en cuanto al número de glóbulos rojos y glóbulos blancos (Figura 12). De igual forma que en la prueba subcrónica en las células blancas como son los linfocitos y los granulocitos (Figura 13) no mostraron diferencias estadísticamente significativas (t de student, $p > 0.05$), teniendo un comportamiento igual entre controles y los tratamientos respectivamente.

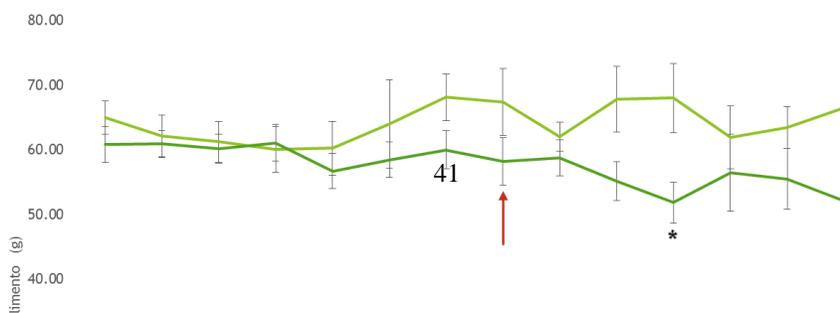


Fig. 9.- Consumo de alimento de ratas Sprague Dawley tratadas con LIP-60 en dosis de 100 mg/kg de peso corporal en el estudio de toxicidad farmacológica. El alimento consumido fue registrado semanalmente. La flecha roja indica el inicio del tratamiento con LIP-60 y la flecha negra el término de la prueba. * indica diferencias significativas (t de student, $p < 0.05$).

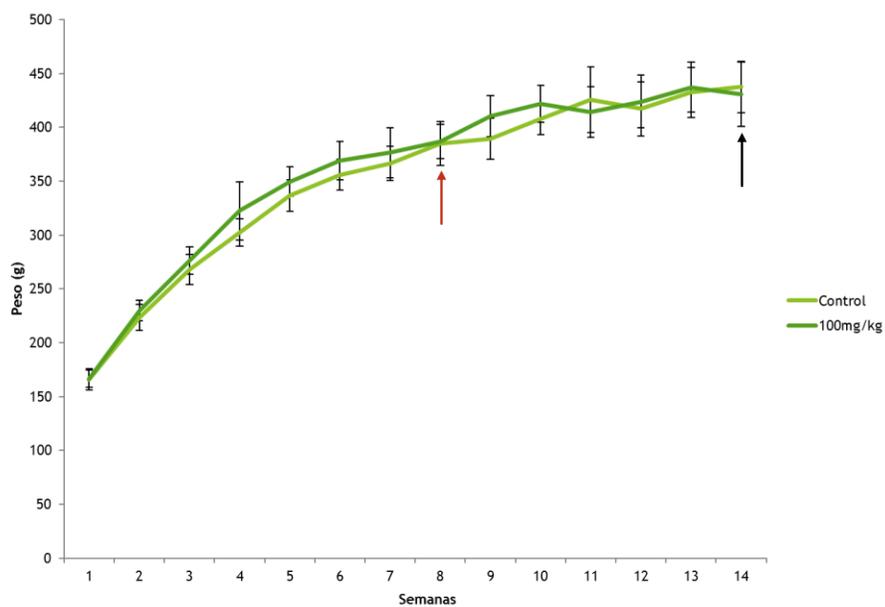


Fig. 10.- Peso corporal de ratas Sprague Dawley tratadas con LIP-60 en dosis de 100 mg/kg de peso corporal en el estudio de toxicidad farmacológica. El peso corporal fue registrado semanalmente. La flecha roja indica el inicio del tratamiento con LIP-60 y la flecha negra el término de la prueba. No se observaron diferencias significativas (t de student, $p < 0.05$).

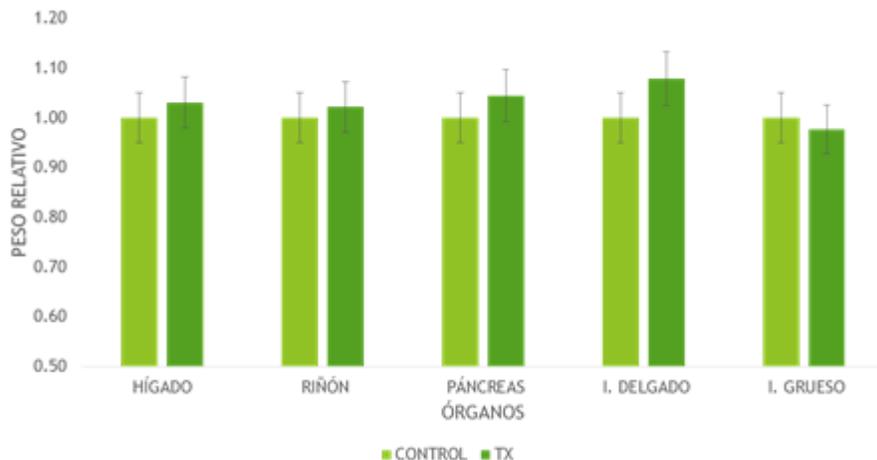


Fig. 11.- Peso ajustado de los órganos de ratas Sprague Dawley en el estudio de toxicidad farmacológica. Después de la necropsia se realizó un análisis macroscópico de los órganos se pesaron y se fijaron en formol. No se observaron diferencias estadísticas respecto al control (t de student $p < 0.05$)

Cuadro 3.- Determinación de marcadores sanguíneos de ratas Sprague Dawley tratadas con 100 mg/kg de la fracción LIP-60 en la prueba farmacológica.

MARCADOR	REFERENCIA	CONTROL	LIP-60
PT (mg/dL)	5.9 – 7.9	19.67 \pm 0.24	17.60 \pm 0.47
ALB (mg/dL)	3.8 – 4.8	3.45 \pm 0.03	3.23 \pm 0.06
AST (U/L)	39 – 262	115.73 \pm 3.53	124.25 \pm 2.06
ALT (U/L)	35 – 80	52.31 \pm 1.62	52.63 \pm 1.07
UREA (mg/dL)	26.1 – 62.24	58.97 \pm 1.08	60.18 \pm 2.00
AMILASA (U/L)	ND	16.84 \pm 1.15	9.68 \pm 1.14

PT.- Proteína Total, ALB.- Albumina, AST.- Aspartato amino transferasa, ALT.- Alanino amino transferasa.

No se observó diferencia significativa entre los grupos (t de student, $p \leq 0.05$)

*Valores de referencia de acuerdo al Canadian Council on Animal Care, 2005

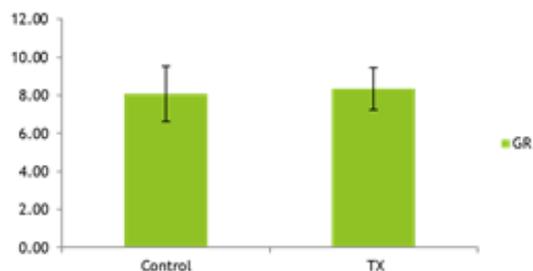
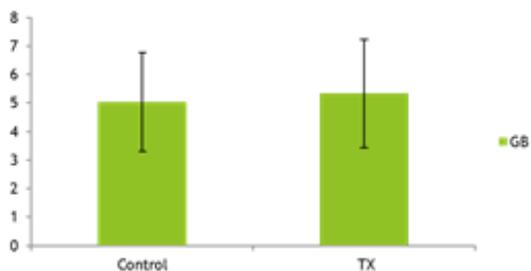


Fig. 12.- Recuento de glóbulos rojos y glóbulos blancos de ratas tratadas con LIP-60 en el estudio de toxicidad farmacológica. No se observó diferencias significativas, entre los controles y los tratamientos respectivamente (t de student, $p>0.05$).



Fig. 13.- Recuento de linfocitos y granulocitos de la serie blanca de ratas tratadas con LIP-60 en el estudio de toxicidad farmacológica. No se observó diferencias significativas, entre los controles y los tratamientos respectivamente (t de student, $p>0.05$).

En el presente estudio no se observaron alteraciones orgánicas, morfológicas, histológicas y sanguíneas antes mencionadas. Las únicas alteraciones observadas se presentaron en el estudio de toxicidad aguda con la dosis más alta y signos clásicos de toxicidad por lectinas en el estudio de la toxicidad subcrónica y dichos efectos fueron reversibles. Lo anterior sugiere que la fracción LIP-60 presentó baja toxicidad a las dosis estudiadas, resultados que comparte con el estudio de la FCL al no presentar estas mismas alteraciones (Ferriz-Martínez *et al.*, 2014).

IX. CONCLUSIÓN.

La administración aguda y subcrónica de 100 mg/kg de peso de la fracción LIP-60 provocó una disminución tanto en el consumo de alimento como en la ganancia de peso corporal de los animales, mismos que recuperaron su peso basal aunque no lograron recuperar el peso con respecto a su control. Los marcadores del estado nutricional a nivel sérico no presentaron alteraciones, lo que sugiere que la merma en peso corporal no afectó metabólicamente a los animales. Así mismo, los marcadores de daño hepático, renal, pancreático y estado nutricional y el peso y la morfología de los órganos no mostraron alteraciones, por lo que se descartan daños a nivel sistémico.

El tratamiento con 100 mg/kg de peso de la fracción LIP-60, así como el tratamiento con 50 mg/kg de peso de la FCL presentan baja toxicidad y buena tolerabilidad en las ratas de los estudios, por lo tanto con los datos proporcionados por ambos trabajos permitirá diseñar modelos para estudios *in vivo* con cáncer químicamente inducido.

X. LITERATURA CITADA

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. 2003. "Biología Molecular de la Célula". Ediciones Omega, Barcelona. 4ª edición.

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

Anderson Shauna C., Cockayne Susan. 1995. "Química Clínica", Editorial Interamericana México.

Audi J., Belson M., Patel M. 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.

Barrett AJ. 1995. Classification Of Peptidases:Proteolytic Enzymes: Serine And Cysteine Peptidases. Methods Enzymol 244: 1-15.

Belmar, Roberto. 2001. Importancia de los factores antinutricionales en la alimentación de animales no rumiantes. En: Congreso de veterinaria. (10º: 2001:

Trujillo) Memorias del X congreso de veterinaria. Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia, 2001. p. 34-54.

Bode, W. and Huber, R. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* 204:433-451.

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.

Brown D. 2014. Plant lectins. Poisonous Plants Homepage: Animal Science at Cornell University. <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/lectins.html>
Fecha de consulta 11/Noviembre/2014

Brown, P.D. 1994. Clinical trials of a low molecular weight matrix metalloproteinase inhibitor in cancer. *Ann. NY. Acad. Sci.* 732:217-221.

Burtis, Carl A. and Ashwood, Edward, R. (Ed.), 1994. Tietz, textbook of clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Pennsylvania, 854-856.

Canadian Council on Animal Care. 2005. <http://www.ccac.ca> Fecha de consulta 11/julio/ 2014.

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

Cecilian, F., Tava, A., Iori, R., Mortarino, M., Odoardi, M. and Ronchi, S. 1997. A trypsin inhibitor from snail medic seeds active against pest proteases. *Phytochemistry.* 44 (3):393-398.

Clawson, G. 1996. Protease inhibitors and carcinogenesis: A review. *Cancer Invest.* 14:597-608. Correa, P. 1989. Epidemiological correlations between diet and cancer frequency. *Cancer Res.* 41:3685-3690.

Connors, B.J., N.P. Laun, C.A. Maynard, and W.A. Powell. 2002. Molecular characterization of a gene encoding a cystatin expressed in the stems of American chestnut (*Castanea dentata*). *Planta* 215: 510-514.

Cordoba F, Martínez M. 1997. Estudio Bioquímico de la Evolución de la lectina de coleoptilo de maíz. <http://www.laboratorio.com.mx/ito00007.html> Fecha de consulta 13/julio/2013

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.

Das, S., and Mukhopadhyay, P. 1994. Protease inhibitors in chemoprevention of cancer. *Acta Oncol.* 33:859-865.

De Lange, C., Nyac Hoti, C. y Verstegen, M. 2000. The significance of antinutritional factors in feedstuffs for monogastric animals. (s.l.): s.f. Citado por: **Moughan, P., Verstegen, M. y visse Rreyneveld, M. (Eds). 2000.** *Feed Evaluation Principles and Practice.* Amstelveen, p. 169 – 188.

Debouck DG. 1994. *Phaseolus acutifolius.* Plant production and protection series. 26: 47-62. <http://www.hort.purdue.edu/newcorp/1492/beans.html> Fecha de consulta 24/octubre/2012.

Docherty, A., O'Connell, J., Crabbe, T., Angal, S. and Murphy, G. 1992. The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue diseases. *Trends Biotechnol.* 10:200-207.

Donatucci D, Lienner I, Gross C. 1987. Binding of navy bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin to the intestinal cells of the rat and its effect on the absorption of glucose. *J Nutr* 117:2154-2160

Duffus, Carol y Slaughter, Colin. Las semillas y sus usos. México: A.G.T., 1985. P.10-11, 18-21, 32-35, 102-107, 122.

Fernandes, A., and Banerji, A. 1997. Long-term feeding of field bean protein containing protease inhibitors suppresses virus-induced mammary tumors in mice. *Cancer Lett.* 116:1-7.

Ferriz-Martinez RA, Torres-Arteaga IC, Blanco-Labra A, Garcia-Gasca T. 2010. The role of plant lectins in cancer treatment. In: Mejia C, Navarro S, editors. *The New Approaches in the Treatment of Cancer.* NY, USA: Nova Science Publishers; 2010. pp. 71–89.

Ferriz-Martinez R. A., Garcia-Garcia K., Torres-Arteaga I., Rodriguez-Mendez A. J., Guerrero-Carrillo M., Moreno-Celis U., Angeles-Zaragoza M. V., Blanco-Labra A., Gallegos-Corona M.A., Robles-Alvarez J. P., Mendiola-Olaya E., Andrade-Montemayor H. M., Garcia Olga P., Garcia-Gasca T. 2014. Tolerability assessment of a lectin fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats.

Formane K, R. 2001. Food allergies: When food becomes the enemy. En: FDA Consumer; p.10 - 16.

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

García García K. 2012. Estudio del efecto antinutricio y daño fisiológico de una fracción concentrada de lectinas de Frijol Tépari en ratas. Tesis de maestría. Maestría en Nutrición Humana. Facultad de Ciencias Naturales. 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.

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.

Graycar TP. 1999. Proteolytic Cleavage, Reaction Mechanism. In Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation. Editors: Michael C. Flickinger and Stephen W. Drew.

Haq, S.K. and R.H. Khan. 2003. Characterization of a proteinase inhibitor from *Cajanus cajan* (L.) J. Protein. Chem. 22: 543-554.

Haq, S.K., S.M. Atif, and RH. Khan. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. Arch Biochem Biophys. 431: 145-159.

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.

Hess, G. 1971. Chymotrypsin. In: *The Enzymes*. Vol III. Academic Press. 3^a Ed. New York, N. Y. pp. 213-248.

Hutt N, Kopferschmitt-kubler MC, Cabalio J, Purohit A, Alt M, Pauli G. 2001. Anaphylactic reactions after therapeutic injection of mistletoe (*Viscum album* L.) Allergology 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.

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

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.

Keil, B. 1971. Trypsin. In: *The Enzymes*. Vol III. Academic Press. 3^a Edición. New York, N. Y. pp. 250-274.

Kennedy, A. 1993. Anticarcinogenic activity of protease inhibitors. Overview. En: Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents, W. Troll and A.R. Kennedy (eds), Plenum Press, New York, (1993):p. 9 – 64.

Kennedy, A. 1998. Chemopreventive agents: Proteaseinhibitors. Pharmacol. Ther. Vol.78. (1998): p.167 - 209.

Kennedy, A. R., and Little, J. 1981. Effects of protease inhibitors on radiation transformation *in vitro*. *Cancer Res*. 41:103-2108.

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

Koiwa, H., Bressan, R. and Hasegawa, P. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci.* 2 (10):379-384.

Kollipara, K. P. and Hymowitz, H. 1992. Characterization of Trypsin and Chymotrypsin Inhibitors in the wild Perennial Glycine Species. *J. Agric. Food Chem.* 40:2356-2363.

Kuo, Y.; et al. 2004. Effects of different germination conditions on the contents of free protein and nonprotein amino acids of commercial legumes. En: *Food chemistry* Vol. 86. (2004): p.537 - 545.

Kuroda, M., T. Kiyosaki, I. Matsumoto, T. Misaka, S. Arai, and K. Abe. 2001. Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 22-28.

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, I.E., 1974. Phytohemagglutinins: Their nutritional significance. *J. Agric. Food Chem.*, 22: 17-22.

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.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. 2002. “Biología Celular y Molecular”. Editorial Panamericana. 4ª edición.

Lopes, U.G., Erhardt, P., Yao, R. and Cooper, G.M. 1997. p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J. Biol. Chem.* 272 (20):12893-12896.

López Sánchez C. 2010. Estudio sobre la Toxicidad aguda y subcrónica vía oral de una lectina de frijol Tépari. Tesis de Maestría en Nutrición Humana. 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.

Mares, M., B. Meloun, M. Pavlik, V. Kostka, and M. Baudys. 1989. Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Lett.* 251: 94-98.

Marzo F, Alonso R, Urdaneta E, Arricibita FJ, Ibáñez F. 2002. Nutritional quality of extruded kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Pinto) and its effects on growth and skeletal muscle nitrogen fractions in rats. *J Anim Sci* 80:875-879.

Moy, L., and Billings, P. 1994. A proteolytic activity in a human breast cancer cell line which is inhibited by the anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Lett.* 85:05-210.

Muzquiz, M. et al. 2006. Factores no-nutritivos en fuentes proteicas de origen vegetal: Su implicación en nutrición y salud [en línea]. *BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY* [Río de Janeiro, Brasil]: 2006 [citado 25 enero de 2008].

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.

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, Octubre 2012.

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, Octubre 2012.

Oloyo, R. A. 2002. Chemical and nutritional quality changes in germinating seeds of *Cajanus cajan* L. En: Science Direct: Food Chemistry Vol. 85, (sep 2002): p. 497 - 502.

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.

Pacheco, L. D., 2001. Bioquímica Estructural y aplicada a la Medicina. Pag. 15, 61, 109, 134, 142, 147.

Patocka J. 2008. 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>

Pesce Amadeo J., Kaplan Lawrence A. 1990. Química Clínica Métodos Editorial Panamericana. Argentina.

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

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., Clarke, E.M.W. and T.P. King, 1979. The nutritional toxicity of Phaseolus vulgaris lectins. Proc. Nutr. Soc., 38: 115-120.

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.

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.

Riegler, E., 1914. A Colorimetric Method for the Determination of Plasma Albumin, Z. Anal. Chem. 53, 242

Salgado Julia y Valdez María. 2008. Purificación y caracterización de lectinas de semillas amaranto cultivado en el estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud. s.f., 1p.

Sanchez de Medina, F. 2010. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. Tratado de Nutrición Tomo 1 pags 462-464.

Savelkoul, F., Poel, V. and Tamminga, S. 1992. The presence and inactivation of Trypsin inhibitors, tannins, lectins, and amylase inhibitors in legume seeds during germination, a review. *Plant Food Hum. Nutr.* 42:71-85.

Schaller, A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220: 183-197.

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

Shu-Guo Fan and Guo-Jiang Wu. 2005. *South China Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, P.R. China.* Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Bot. Bull. Acad. Sin.* (2005) 46: 273-292

Skiles, J.W., N.C. Gonnella, and A.Y. Jeng. 2004. The design, structure, and clinical update of small molecular weight matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 11: 2911-2977.

Troll, W. and Kennedy, A. 1989. Workshop report from the Division of Cancer Etiology, National Cancer Institute, National Institutes of Health. Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents. *Cancer Res.* 49:499-502.

Troll, W., Wiesner, R., and Frenkel, K. 1987. Anticarcinogenic action of protease inhibitors. *Adv. Cancer Res.* 49:265-283.

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

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.

Wan, X.S., Hamilton, T.C., Ware, J.H., Donahue, J.J. and Kennedy A.R. 1998. Growth inhibition and cytotoxicity induced by Bowman-Birk inhibitor concentrate in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Nutr. Cancer*. 31 (1):8-17.

Wenbiao Wu y Rong Sun, 2012. Toxicological studies on plant proteins: a review. *Journal of Applied Toxicology*. Volume 32, Issue 6, pages 377–386, June 2012

Yoza, K., S. Nakamura, M. Yaguchi, K. Haraguchi, and K. Ohtsubo. 2002. Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a cysteine proteinase inhibitor, cystatin, from Job's tears (*Coix lacryma-jobi* L. var. *Mayuen Stapf*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 2287-2291.