



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

Efecto de una fracción de lectinas e inhibidor de proteasas de frijol Tépari sobre la digestibilidad proteica y morfología de las vellosidades intestinales en ratas.

TESIS

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

Presenta:

L. N. Wendoline Pita López

Dirigido por:

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

SINODALES

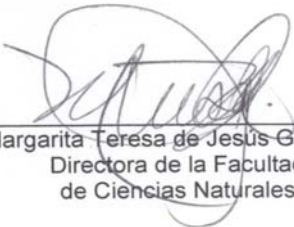
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Presidente

Dra. Araceli Aguilera Barreyro
Secretario

M en C. María de Jesús Guerrero Carrillo
Sinodal

Dr. Alejandro Blanco Labra
Sinodal

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Sinodal


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







Dra. Ma Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre, 2015
México

RESUMEN

Las lectinas son glicoproteínas de origen no inmune capaces de reconocer de forma específica carbohidratos de la membrana celular. Diversas lectinas de origen vegetal han mostrado efectos contra el cáncer. Una fracción concentrada de lectinas (FCL) de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) ha mostrado efecto citotóxico diferencial sobre células de cáncer de colon, e inhibición de la formación de tumores en estudios *in vivo*. La FCL presenta baja toxicidad por vía oral, tanto a nivel agudo como subcrónico, sin embargo, se han observado efectos antinutricios, tales como la pérdida en la ganancia de peso. El frijol Tépari contiene también un inhibidor de proteasas (IP) tipo Bowman-Birk capaz de inhibir la capacidad de invasión *in vitro*. Estas proteínas afectan la absorción de nutrientes, principalmente proteínas, por lo cual, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la administración aguda y subcrónica de la FCL y una combinación de lectinas-IP (LIP-60) sobre la absorción de nitrógeno, digestibilidad proteica y la morfología de las vellosidades intestinales. Para la prueba aguda se utilizaron 18 ratas macho Sprague Dawley de 3 semanas de edad (6 por grupo), las cuales fueron administradas con una dosis de 50 mg/kg de peso de FCL o 100 mg/kg de peso de LIP-60 por vía intragástrica. Para la prueba subcrónica se utilizaron ratas de 5 semanas de edad las cuales se administraron con los tratamientos durante 30 días. No se encontraron diferencias estadísticas tras la medición de la digestibilidad total en la prueba aguda; mientras que en la prueba subcrónica se observó un aumento en el contenido de nitrógeno en heces, orina y contenidos ileales en los grupos tratados, en comparación con el grupo control. Por su parte, los porcentajes de digestibilidad ileal y total de proteínas de los animales tratados, disminuyeron con respecto al control. Asimismo, se observó atrofia de las vellosidades intestinales, lo cual podría estar directamente relacionado con la disminución en la ganancia de peso corporal observada principalmente para el grupo tratado con la FCL. Futuros estudios profundizarán más en estos aspectos.

Palabras claves: Lectinas, Inhibidores de proteasa, Digestibilidad

SUMMARY

Lectins are glycoproteins from non-immune origin that specifically recognize cell membrane carbohydrates. Several plant lectins have shown effects against various types of cancers. A concentrated fraction of lectins (CLF) from Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) showed differential cytotoxic effect on colon cancer cells and inhibition of early tumors in *in vivo* studies. The CLF presented low oral toxicity, both on acute and subchronic assays, however, antinutritional effects such as loss in weight gain, were observed. Téparý beans also contain a Bowman-Birk protease inhibitor (PI) with *in vitro* inhibition capacity of invasion. These proteins affect absorption of nutrients, mainly proteins therefore; in this work we studied the effect of acute and subchronic administration of CLF, and a combination of lectin-IP (LIP-60) on nitrogen absorption, protein digestibility and morphology of intestinal villi. For acute test 18 Male Sprague Dawley rats of 3 weeks old were used (6 per group), which were administered with a dose of 50 mg/kg of CLF or 100 mg/kg of LIP-60 intragastrically; while control rats received saline solution. Subchronic test was performed with rats of 5 weeks old treated for 30 days. No statistical differences in total digestibility for the acute test was found, while in the subchronic test, an increase in the nitrogen content in feces, urine and ileal contents, was observed in the treated groups respect to the control group. Meanwhile, the percentage of ileal and total protein digestibility of treated animals, decreased compared to the control. Also, intestinal villi atrophy was observed, which could be directly related to the decrease in body weight gain observed mainly for the group treated with the FCL. Future studies will deepen more in these areas.

Keywords: Lectins, Protease Inhibitors, Digestibility

DEDICATORIA

A **Ana**, mi madre, por nunca cortarme las alas e impulsarme a seguir mis sueños y metas, por más disparatados e imposibles que sonaran; pero sobre todo por sus sacrificios, paciencia, amistad y amor incondicional.

A **Rufino**, mi padre, por enseñarme que el estudiar está antes que todo, por su mano firme en mi educación que hicieron de mí una persona fuerte e independiente, y en especial por su apoyo incondicional, por sentirse orgulloso de mi y quererme.

A **Alejandra y Ricardo**, mis hermanos, por permitirme ser su ejemplo a seguir y quererme a pesar de las diferencias, las discusiones y la distancia.

A **Cesar**, mi sobrino, por enseñarme que las dificultades crean lazos familiares inquebrantables y quererme incondicionalmente.

Gracias, por siempre estar ahí en las buenas y en las malas, a pesar de la distancia... **LOS AMO.**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a:

- A CONACYT y a la UAQ; por el financiamiento brindado para poder llevar a cabo mi proyecto de tesis y mis estudios de maestría.
- A la Dra. Tere, por confiar en mí y dejarme formar parte de su grandioso equipo de trabajo, pero sobre todo por su tiempo, comprensión y apoyo, a lo largo de todo este tiempo, gracias por hacerme sentir en casa.
- A la Dra. Araceli, la Maestra Mary, el Dr. Alejandro y el Dr. Roberto; por compartir sus conocimientos conmigo, dedicarme parte de su valioso tiempo a lo largo de esta aventura llamada maestría.
- A la Maestría en Nutrición Humana, por dejarme formar parte de su historia.
- Al personal del Laboratorio de Nutrición Animal, el Laboratorio de Patología y el Laboratorio de Mecanismos de Defensa de Plantas, por recibirme y brindarme su ayuda a lo largo de mi desarrollo experimental.
- A Verónica, por su amistad y apoyo desde el primer día.
- A mis Labos (Joss, Emi, Kara, Lau, Rous, Adri, Sabi, Julia, Octavio y Paco) por su amistad y hacerme sentir en familia.
- A todas y cada de las personas que han formado parte del Laboratorio de Biología Celular a lo largo de estos 2 años y medio.
- A Emi y Lilis, por brindarme su amistad incondicional y acompañarme en mis desvelos, estrés, frustración y enojo.
- A mi familia, por su comprensión y apoyo incondicional.
- A Sara, por convertirse en mi segunda madre.
- A Brenda, Marianna, Alejandra, Ireyda, Aida, Ivonne, David, Cristina, Miriam, Erick y Raquel, por brindarme su amistad, echarme porras y motivarme a seguir adelante a pesar de la distancia.
- A todas y cada una de las personas que me han brindado su ayuda de una u otra forma para la realización de mi trabajo de tesis.

ÍNDICE

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de cuadros	vii
Índice de figuras	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1. FRIJOL TÉPARI	3
2.2. LECTINAS	4
2.2.1. DEFINICIÓN	4
2.2.2. CLASIFICACIÓN DE LECTINAS	5
2.2.3. LECTINAS COMO FACTOR ANTINUTRICIO	7
2.2.1. LECTINA DE FRIJOL TÉPARI	9
2.3. INHIBIDORES DE PROTEASAS	10
2.3.1. PROTEASAS	10
2.3.2. INHIBIDORES DE PROTEASAS	11
2.3.3. INHIBIDORES DE PROTEASAS DE PLANTAS	12
2.3.4. INHIBIDORES DE PROTEASAS COMO FACTOR	12
ANTINUTRICIO	
2.3.4. INHIBIDOR DE PROTEASAS DE FRIJOL TÉPARI	13
2.4. DIGESTIBILIDAD	14
2.5. MORFOLOGÍA DEL TUBO DIGESTIVO	16
2.5.1. INTESTINO DELGADO	16
2.5.2. INTESTINO GRUESO	17
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	20

5.1.	Objetivo General	20
5.2.	Objetivos específicos	20
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
VIII.	CONCLUSIONES	40
IX.	LITERATURA CITADA	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Análisis químico proximal, de alimento estándar (sin tratamiento) y alimentos tratados térmicamente.....	27
Cuadro 2 Porcentaje de nitrógeno en heces, orina y contenido ileal en ratas por días de tratamiento.....	36
Cuadro 3 Efectos de la FCL y LIP-60 sobre el organismo de ratas.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Capas del intestino delgado.....	17
Figura 2 Capas del intestino grueso.....	18
Figura 3 Actividad aglutinante de los alimentos sometidos a tratamientos térmicos y extrusión.....	26
Figura 4 Porcentaje de digestibilidad total de proteínas tras la administración aguda.....	28
Figura 5 Promedio semanal de ganancia de peso corporal de ratas.....	28
Figura 6 Peso promedio de intestinos por días de tratamiento.....	29
Figura 7 Longitud promedio de intestinos por días de tratamiento.....	29
Figura 8 Observación macroscópica del íleon a los 10 días de tratamiento.....	30
Figura 9 Promedio de placas totales por días de tratamiento.....	30
Figura 10 Promedio de áreas por placas por días de tratamiento.....	31
Figura 11 Vellosidades de duodeno con 10 días de tratamiento (5x).....	32
Figura 12 Alto y ancho de vellosidades del duodeno a los 10 días de tratamiento.....	32
Figura 13 Criptas en las diferentes porciones del colon, a diferentes tiempos de tratamiento (10x).....	34
Figura 14 Altura de criptas del colon por días de tratamiento.....	35
Figura 15 Digestibilidad ileal y fecal de proteínas por días de tratamiento.....	38

I. INTRODUCCIÓN

Con el paso de los años las plantas han generado evolutivamente sistemas de defensa contra ataques de insectos y patógenos, basados en barreras estructurales o químicas, lo cual genera una respuesta metabólicamente activa. Entre estos sistemas de defensa se encuentran un sinnúmero de proteínas que actúan sobre los depredadores que atacan a las plantas (Blanco-Labra y col. 2002). Ejemplo de estas proteínas son las lectinas, proteínas o glicoproteínas de origen no inmune, que se encargan de reconocer de manera específica carbohidratos de la superficie celular. Las lectinas, se encuentran principalmente en leguminosas tales como las habas, soya y frijoles, pero también pueden estar presentes en algunos otros alimentos como el amaranto y el maíz. Estas proteínas son resistentes a la digestión gastrointestinal, algunas reducen la digestibilidad y el valor proteico de las proteínas dietéticas, ya que deterioran la integridad del epitelio intestinal, la absorción y la utilización de los alimentos (González de Mejía y Prisecaru, 2005). Por su parte, los inhibidores de proteasas (IP) son proteínas o péptidos con la capacidad de unirse al sitio catalítico de la proteasa para atenuar o abatir la actividad hidrolítica. Se ha descrito que cuando una planta es atacada por insectos, ésta aumenta la producción de IP, los cuales, al ser consumidos por los insectos, inhiben la actividad de proteasas digestivas en el intestino, interfiriendo así con el crecimiento y desarrollo de los insectos (Ryan y Pearce, 1998).

En el laboratorio de Biología Celular, de la Facultad de Ciencias Naturales se estudia una fracción concentrada de lectinas (FCL) y un inhibidor de proteasas (IP) extraídos del frijol Tépari, los cuales presentan resultados alentadores como anticancerígenos. En ensayos *in vitro* se ha observado que la FCL presenta efecto antiproliferativo sobre células de cáncer, mientras que el IP reduce la capacidad de invasión (García-Gasca y col., 2012). Estudios *in vivo* han mostrado que la FCL presenta baja toxicidad y buena tolerabilidad, aunque con efectos antinutricios al ser administrada en dosis de 50 mg/kg de peso corporal por 6 semanas (Ferriz-Martínez y col., 2015). Debido a estos resultados, y a que ambos compuestos se

encuentran presentes en el frijol Tépari, se decidió estudiarlos en conjunto a través de una mezcla denominada LIP-60. Esta fracción proteínica mostró toxicidad menor que la FCL. Sin embargo, dados los efectos que estas proteínas presentan sobre cáncer y debido a que la vía de administración probada es intragástrica, resulta necesario caracterizar sus efectos antinutricios. Por lo anterior, en el presente estudio se determinó el coeficiente de digestibilidad proteico aparente en un ensayo *in vivo* tras la administración aguda y subcrónica de la FCL y LIP-60 así como su efecto sobre la morfología de las vellosidades intestinales.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. FRIJOL TÉPARI

El frijol (*Phaseolus sp*), pertenece a la familia de las leguminosa (Luguminosae o Fabaceae), en el mundo se conocen alrededor de 150 especies de frijol, de las cuales 50 se pueden encontrar en México, con una gran variedad de tamaños, colores y diferentes requerimientos ecológicos (Biodiversidad Mexicana, 2015)

El principal tipo de frijol consumido en México es *Phaseolus vulgaris*, el cual ha sido parte de la dieta tradicional por miles de años. Una variedad poco conocida es el frijol Tépari el cual es cultivado en el Norte de México y su consumo está limitado a dicha región. Es una cosecha atractiva debido a sus características agronómicas como la resistencia a plagas o sequias (Córdoba y Martínez, 1997). El nombre científico del frijol Tépari es *Phaseolus acutifolius*, pertenece a la familia de las *Fabaceae*. Sus nombres comunes son: tepary bean, inglés; xmayum, maya (Campeche, México); Tépari, español (Sonora, México); frijol piñuelero (nombre de un híbrido), Costa Rica; escomite o escumite (Chiapas, México). Esta especie ha crecido por un largo tiempo en Mesoamérica, principalmente en zonas desérticas o áreas con un periodo largo de sequía (González de Mejia y col., 1990). 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 (Córdoba y Martínez, 1997).

El frijol Tépari se ha adaptado a condiciones áridas y semiáridas, es muy resistente a condiciones agronómicas adversas como son las altas concentraciones de sales y poca agua. Presenta gran tolerancia a plagas de

insectos y microorganismos y a diversas enfermedades que normalmente afectan al frijol común (Birch y col., 1985; Shade y col., 1987). Se utiliza principalmente como alimento para humanos y animales debido a su gran contenido proteínico sin embargo, es poco consumido debido a su dureza y largos tiempos de cocción por lo que su alto contenido de proteínas y carbohidratos está subutilizado. Se considera una fuente importante de proteínas, aunque presenta deficiencias en aminoácidos azufrados. Presenta un valor proteico promedio de 25% en base seca y 23% en base húmeda (Intriago-Ortega, 1985; Idouraine y Yensen, 1991).

Al igual que el frijol común y otras leguminosas, el Tépari es relativamente tóxico para el hombre y los animales al ser ingerido bajo condiciones de cocimiento no adecuado. Presenta compuestos antinutricios como fitatos, lectinas e inhibidores de proteasas que, aunque relativamente altas en la semilla cruda, desaparecen casi del todo después de cocción, a excepción del inhibidor de proteasas, el cual es altamente resistente a altas temperaturas. Por lo que respecta a los otros factores antinutricios, al ser consumidos no constituyen un riesgo para la salud (González de Mejía y col., 1990). Respecto al frijol común, el fríjol Tépari tiene una concentración menor de lectinas, sin embargo éstas poseen una actividad biológica mayor (Osman y col., 2003).

2.2. LECTINAS

2.2.1. DEFINICIÓN

Las lectinas son proteínas o 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 y se consideran armas valiosas en el campo de la genética, la biomedicina y la inmunología (Castillo-Villanueva y Adbullaev, 2005; Ferriz-Martinez y col., 2010).

Diversas lectinas de diferentes especies animales y vegetales han sido aisladas y caracterizadas, lo cual ha permitido identificar que existe una gran similitud en la estructura de las lectinas de una misma familia. Se ha demostrado que en ciertos casos las lectinas son capaces de reconocer carbohidratos en una determinada configuración o secuencia, lo que quiere decir que la especificidad por estructuras sacáridas está altamente conservada entre la misma especie de proteínas (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).

Aunque varias de las lectinas poseen especificidad por estructuras sacáridas semejantes, presentan actividades biológicas diversas, como son: la aglutinación de eritrocitos de diferentes especies, la estimulación mitogénica de linfocitos e inhibición de la fagocitosis. Debido a la capacidad de estas proteínas para interactuar con células de la respuesta inmune, algunas lectinas poseen efectos inmunosupresores, otras también son tóxicas, inhiben el crecimiento de células tumorales y participan en la adhesión celular (Hernández Cruz y col., 2005, Ferriz-Martinez y col., 2010).

2.2.2. CLASIFICACIÓN DE LECTINAS

Existen varias maneras de clasificar a las lectinas, una de ellas es en base a su estructura, dividiéndose en: simples, mosaico y macromolecular las cuales, a su vez, pueden subdividirse en diferentes familias que comparten estructuras similares. Dentro de las lectinas simples se encuentran prácticamente todas las lectinas de plantas; mientras que en el grupo de mosaico están lectinas de diversos orígenes (leguminosa, cereales, etc). Por su parte, el grupo de macromoléculas está conformado por lectinas de bacterias, principalmente aquellas con forma de fibrillas o pilis (Lis y Sharon, 1998). Las lectinas parecen estar ampliamente distribuidas entre los seres vivos:

- **Lectinas Animales:** las cuales ha sido identificadas tanto en invertebrados, como en vertebrados; pueden ser subdivididas con base a su integración o no a la membrana celular. Las lectinas integradas a la membrana (endolectinas) solo pueden solubilizarse mediante el uso de detergentes, mientras que las no

integradas a la membrana (exoelectinas) no lo requieren, lo cual puede reflejar diferentes funciones. Por ejemplo, se cree que las endoelectinas atrapan glicoconjugados circulantes uniéndolos a la membrana previamente a internalizarse a las células, mientras que las exoelectinas circulan libremente en el compartimiento acuoso interactuando con glicoconjugados solubles y los adheridos a la membrana plasmática. Se cree que algunas de estas lectinas presentan adhesión celular como las galectinas, se ha observado poder aglutinante contra hematíes de distintas especies animales e incluso especificidad anti-A, anti-B anti-N y Anti-ABO humanos (Micucci y Camps, 1987; Lis y Sharon, 1998).

- Lectinas microbianas: las cuales se han localizado en virus, hongos y bacterias. Estas lectinas son denominadas como lectinas adhesivas (Lis y Sharon, 1998). Se ha observado que alguna de las lectinas provenientes de bacterias presentan un importante papel en la patogenicidad bacteriana. Se presume que la lectina se une a las toxinas mejorando la adhesión de la toxina con su receptor, algo muy similar se ha reportado que ocurre con algunos virus. En el caso de los hongos, se ha visto que la adhesión que presenta para atrapar a sus presas se debe a la presencia de lectinas unidas a residuos a residuos de carbohidratos de la superficie del hongo (Micucci y Camps, 1987).
- Lectinas vegetales: se encuentran principalmente en los cotiledones y endospermos de las semillas de algunos vegetales como el trigo, frijol, soya, entre otros (Lis y Sharon, 1998), lo que se puede tomar como evidencia indirecta del papel que ejercen como proteínas de respuesta al estrés o defensa (Mendoza y col., 2007). Se ha propuesto que, debido a su amplia distribución en vegetales, las lectinas pueden proteger a la planta de ataques de bacterias, hongos y virus patógenos a lo largo de su desarrollo, en diferentes etapas como: absorción, germinación y desarrollo de las semillas. Además se les han atribuido otros usos a las lectinas vegetales como promotoras de adhesión entre diversas células (Machuka y col., 1999; Ferriz-Martinez y col., 2010). Entre las lectinas más estudiadas se encuentran:
 - La aglutinina de germen de trigo (fitohemaglutinina).

- La Concanavalina A, obtenida de la *Cannavalia ensiformis*
- La fitohemagutina (PHA), se encuentra en el frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

Las lectinas de leguminosas contienen cationes divalentes a sitios específicos para ligarse a metales. Cada subunidad contiene iones calcio o magnesio, los cuales son esenciales para la unión a carbohidratos. Básicamente, los promotores de las lectinas de leguminosas consisten de una o dos cadenas constituidas de una hoja β de 7 tiras (parte frontal) y una hoja β plana de seis (parte trasera), interconectadas por vueltas y lazos para formar una estructura tridimensional. La orientación de las tiras antiparalelas de la hoja β , le proporciona una estructura rígida y fuerte que puede explicar la extrema resistencia de las lectinas de leguminosas al ataque proteolítico enzimático (Lis y Sharon, 1998).

2.2.3. LECTINAS COMO FACTORES ANTINUTRICIOS

Las lectinas se han considerado como factores antinutricios debido a la capacidad que tienen de sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal para ejercer su actividad biológica (González de Mejía y Priescaru, 2005). Las lectinas presentan alta resistencia a la digestión dada por las enzimas proteolíticas en los mamíferos, debido a que presentan unión efectiva con los receptores de superficie de las células epiteliales del intestino (Rhodes, 1999; Lajolo y Genovese, 2002). Así también, presentan resistencia a la degradación por bacterias (Pusztai y Bardocz, 1996), por tanto sobreviven a través del paso por el tracto digestivo, se presenta adhesión a las paredes intestinales, permaneciendo en su forma biológica e inmunológica intactas (Rhodes, 1999; Lajolo y Genovese, 2002).

El principal efecto antinutricio de las lectinas está relacionado con la adhesión a los carbohidratos de membrana del intestino delgado (principalmente duodeno y yeyuno), causando daños en la pared intestinal, sobretodo hipertrofia e hiperplasia, lo cual provoca disminución de los procesos de absorción y

distribución de nutrientes. La adhesión de las lectinas al tracto digestivo provoca mayor permeabilidad, lo cual permite la absorción de lectinas y péptidos, los cuales pueden provocar efectos perjudiciales sobre el sistema inmune y algunos otros órganos. Asimismo, se ha visto que la unión de las lectinas a la mucosa intestinal provoca cambios en la actividad de las enzimas digestivas, aumento en el catabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos endógenos debido a la descamación de las células dañadas, inhibición del crecimiento y aumento en la producción de mucina. También se cree que, debido al daño provocado en la mucosa intestinal, algunas bacterias pueden ingresar al sistema circulatorio y afectar órganos internos (Pusztai y col., 1996; De dios y col., 2009). Se ha observado que ratas alimentadas con una dieta adicionada con lectina de soya al 0.73 mg/g de peso presentan reducción en la retención del nitrógeno y aumento en la excreción de nitrógeno a través de la orina, lo que sugiere que el metabolismo de proteínas está afectado (Czerwinski y col., 2005).

Existen diversos estudios en donde se ha observado que tras el paso de las lectinas por el tracto digestivo de ratones, en un periodo de 24 h, las lectinas son recuperadas con sus propiedades integrales. Un estudio observó que la concanavalina A, tras la administración oral, fue recuperada en un 90% en heces 4 días posteriores a la administración, lo que indica que esta lectina no se ve afectada por la actividad específica del tracto intestinal (Nakata y Kimura, 1985). Se ha observado, que un 8% de la aglutinina de soya permanece en su forma libre y otra porción se encuentra ligada al epitelio (Lajolo y Genovese, 2002); así mismo se ha observado que después de 0.5, 2.5 y 24 h trascurrida la administración de lectina del frijol Kintoki, ésta se encuentra en el tracto digestivo en altas concentraciones (Hara y col., 1984). Lectinas de frijol Tépari han mostrado resistencia a la digestión al conservar su actividad aglutinante en heces por más de 72 h (Ferriz-Martinez y col., 2015).

2.2.4. LECTINAS DE FRIJOL TÉPARI

Estudios realizados *in vitro* de una fracción concentrada de lectina (FCL) de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre diferentes líneas celulares de cáncer humano han mostrado que poseen efecto citotóxico diferencial sobre células normales y cancerígenas en función de la concentración utilizada. También se mostró efecto inhibitorio de la proliferación de diferentes líneas celulares cancerígenas (Valadez-Vega y col., 2011; Garcia-Gasca y col., 2012), siendo las más sensibles las células de cáncer humano de colon (CaCo2) (Garcia-Gasca y col., 2012).

Se llevaron a cabo estudios toxicológicos donde se determinó como dosis máxima sin efectos adversos (NOAEL, por sus siglas en inglés) la de 50 mg/kg de peso por vía intragástrica (López-Sánchez y col. 2010). Posteriormente, estudios de administración aguda y subcrónica determinaron que la FCL no presenta toxicidad sistémica, pero en el caso de la administración subcrónica se observa una pérdida en la ganancia de peso de un 10% con respecto al control. Se observaron también efectos sobre el sistema hematopoyético, con disminución de linfocitos y pulpa blanca en el bazo, así como aumento de granulocitos (Ferriz-Martínez y col., 2015). Así mismo, se ha observado que tras una administración subcrónica de la FCL provoca un adelgazamiento de las paredes intestinales, así como un aumento en el tamaño de las placas de Peyer (datos no publicados).

Los estudios realizados sobre modelos de cáncer de colon han mostrado que, tras la administración por 6 semanas de la FCL posteriores a la inducción del cáncer, se presentó un efecto inhibitorio de la tumorigénesis temprana en colon de rata. La muerte de células cancerígenas está relacionada con la inducción de apoptosis (datos no publicados).

2.3. INHIBIDORES DE PROTEASAS

2.3.1 PROTEASAS

Las enzimas encargadas de hidrolizar enlaces peptídicos son conocidas como proteasas, proteinasas, peptiasas o enzimas proteolíticas. Están involucradas en diversos aspectos fisiológicos y del desarrollo de los seres vivos (Schaller, 2004). Las proteasas se pueden dividir en exoproteasas y endoproteasas (Rendueles y Wolf, 1988). Las exoproteasas, se encargan de hidrolizar únicamente enlaces peptídicos situados en el extremo amino o carboxilo terminal, dentro de este grupo se encuentran:

- Aminopetidiasas, que catalizan la reacción de liberación de aminoácidos del extremo amino terminal.
- Carboxipeptidasas, catalizan la liberación secuencial de aminoácidos del extremo carboxilo terminal
- Dipetidilaminopeptidasas, liberan dipéptidos del extremo amino terminal.

Las endoproteasas son las encargadas de catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos situados principalmente en el interior de la cadena polipeptídica, degradando las proteínas hasta péptidos (Suárez-Rendueles y Wolf, 1988). Éstas se clasifican con base al mecanismo catalítico en:

- Proteasas serinicas: Son aquellas cuyo mecanismo catalítico depende del hidroxilo de un residuo de serina que actúa como nucleófilo sobre el enlace peptídico. Tras la comparación de las estructuras terciarias y el orden de los residuos catalíticos se distinguieron siete familias distintas (Barrett, 1980). Dentro de éstas se encuentra la familia de la tripsina y de la subtilisina. La familia de la tripsina se encuentra en microorganismos procariontes, eucariontes, plantas, invertebrados y vertebrados, así como en el virus a ARN (Caffini y col., 1988; Barrett, 1980).
- Proteasas cisteinicas: presentan un mecanismo catalítico similar a la serinicas, el donador de protones de las proteasa cisteinicas identificadas

en un residuo de histidina el pH de su actividad catalítica varía según el tipo de enzima y del sustrato (Barrett, 1980).

- Proteasas aspárticas: se encuentran distribuida en vertebrados, hongos, protozoos y retovirus. Su mecanismo catalítico involucra residuos de ácido aspártico en el sitio activo de la cadena peptídica, donde la molécula es la que actúa como nucleófilo (Barrett, 1980). Se caracterizan dado que su pH óptimo se encuentra en el rango ácido y son inhibidas por la peptastina A (Caffini y col., 1988).
- Metaloproteasas: se pueden dividir en dos grupos, las proteasas que solo requieren zinc para su catálisis y las que necesitan dos iones metálicos que sean catalíticos. El ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico es mediado, al igual que en las proteasas aspárticas, por una molécula de agua (Barrett, 1980).

2.3.2 INHIBIDORES DE PROTEASAS

Los inhibidores de proteasas son proteínas o péptidos con la capacidad de disminuir o abatir la actividad hidrolítica de proteasas de manera selectiva. Los inhibidores en plantas y animales por lo general son pequeños polipéptidos y, en algunos microorganismos, pueden tener un origen no protéico. Los inhibidores de proteasas, pueden ser divididos en alrededor de 60 familias, dependiendo de la secuencia de aminoácidos o el tipo de proteasas con la que interactúan: serín, cisteín, aspártico, metalo, glutámico y treonín proteasas (Rawlings y col., 2004; Rawlings y col., 2008). Actualmente existe un gran número de inhibidores de proteasas aislados, los cuales pertenecen principalmente al grupo serín proteasas, seguidos del grupo de cisteín proteasas y, en menos cantidad, los inhibidores de metaloproteasas o aspartil proteasas. También existe la familia de las α 2-macroglobulinas, las cuales son capaces de inhibir todas las clases de proteasas (Bode y Huber, 1992; Savelkoul y col., 1992).

2.3.3. INHIBIDORES DE PROTEASAS DE PLANTAS

Los inhibidores de proteasas en las plantas son considerados como proteínas de almacenamiento o pueden estar involucradas en mecanismos de defensa contra plagas y enfermedades (Ryan y Pearce 1998; García-Gasca y col., 2002; Chaudhary y col., 2008). Los inhibidores de proteasas de las plantas juegan un papel importante en la germinación, ya que se encargan de la regulación de la degradación de las proteínas por las proteasas. Asimismo se ha visto que regulan la muerte celular programada y contribuyen a la defensa contra patógenos e insectos (Koiwa y col., 1997). Las leguminosas contienen principalmente inhibidores de serín proteasas, pertenecientes casi en su totalidad a las familias Kunitz y Bowman-Birk (Ceciliani y col., 1997):

- Inhibidores tipo Kunitz: Tienen una masa molecular de 20 a 25 kDa. Poseen especificidad directa por 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.

2.3.4. INHIBIDORES DE PROTEASAS COMO FACTORES ANTINUTRÍCIOS

Los inhibidores de proteasas son compuestos termolábiles que alteran la digestión de proteínas, lo cual provoca disminución de crecimiento, debido a la inactivación de proteasas digestivas, principalmente tripsina y quimotripsina. Forman complejos estables e inactivos con la proteasa, lo cual provoca la hidrólisis incompleta de las cadenas peptídicas por parte de las enzimas digestivas. Lo anterior trae como consecuencia disminución de la digestibilidad protéica, asimismo hay un aumento de la secreción pancreática de enzimas digestivas ricas en metionina, lo cual provoca la pérdida de proteína endógena rica en aminoácidos azufrados, además de la subutilización de la proteína dietética (De Dios y col., 2009).

Se ha observado que tras la administración de inhibidor de proteasas de frijol Tépari, los ratones presentaron pérdida en la ganancia de peso dosis dependiente (a mayor dosis, mayor pérdida en la ganancia de peso), así como disminución en la digestibilidad de proteínas (Osman y col., 2003). Algo muy similar se reportó tras la administración de tres dietas con altos niveles de inhibidor de tripsina de soya, donde se presentó una importante pérdida en la ganancia de peso (Roy y Schneeman, 1981). Asimismo, se ha reportado disminución en el metabolismo de energía tras el consumo de inhibidores de proteasa de soya (Birk y Gertler, 1961).

2.3.5. INHIBIDOR DE PROTEASAS DE FRIJOL TÉPARI

Un estudio realizado de manera *in vitro* evaluó el efecto antiproliferativo de una fracción de proteína a partir de semillas de frijol Tépari con actividad de inhibidor de la proteasa (TPIF) sobre células normales y células malignas. TPIF se obtuvo después de la precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel, y su bioactividad se ensayó *in vitro* en células HeLa, fibroblastos 3T3 normales y 3T3/virus transformados. TPIF mostró aumento en la capacidad de adhesión de células transformadas (García-Gasca y col., 2002) pero no provoca citotoxicidad (García-Gasca y col., 2012).

En trabajos *in vivo* se estudió la administración subcrónica de diversas dosis de inhibidor de proteasas de frijol Tépari (100, 200, 400 y 600 mg/ 100 g de dieta), donde se observó que a mayor dosis, mayor disminución en la ganancia de peso con respecto al control a partir de la administración de 200 mg/100 g dieta. Asimismo se observó disminución en el aprovechamiento de proteínas lo cual se ve reflejado en el porcentaje de digestibilidad de proteínas: Este mismo estudio reportó hipertrofia pancreática con todos los tratamientos de inhibidor de proteasa (Osman y col., 2003).

2.4. DIGESTIBILIDAD

Por definición, la digestibilidad es la fracción de alimento consumido que no aparece en las heces y por lo tanto se absorbe en el tracto gastrointestinal (Stein y col., 2007). Es una medida utilizada para determinar la calidad de un alimento y sus materias primas, así como la disponibilidad de los nutrientes que los constituyen. La digestibilidad es también el soporte para la realización del cálculo de los requerimientos nutricionales (Harmon, 2007).

La digestibilidad mide directamente la proporción de nutrientes del alimento que está disponibles para su absorción por el organismo, y ésta puede expresarse de diversas formas dependiendo del método utilizado para su determinación (Mariscal Landín y col., 2009).

Dada la importancia de la digestibilidad en la nutrición, se han desarrollado una gran variedad de métodos para evaluar un ingrediente en particular o una dieta balanceada, el nivel de aprovechamiento, su efecto en el desempeño y el impacto en la salud (Secombe y Lester, 2012). Los métodos de digestibilidad *in vivo*, permiten estimar la proporción de nutrientes presentes en una ración que pueden ser absorbidos por el aparato digestivo. Estos métodos por lo general utilizan heces o contenido gastrointestinales para realizar la medición de los coeficientes (Church y Pond, 1994). Uno de los métodos más utilizados es la digestibilidad ileal (DI), cuya finalidad es incrementar la exactitud en la determinación del aporte de nutrimentos. Ésta se determina mediante la colecta de la digesta ileal, antes de atravesar la válvula íleo-cecal, por lo cual los animales deben estar modificados quirúrgicamente o ser sacrificado. El método, más simple es la digestibilidad fecal (DF), ya que se obtiene al estimar la diferencia de lo ingerido y lo excretado sin embargo, hay que tener en cuenta que la porción digestible de un nutrimento es modificada por las bacterias del intestino grueso (Parra y Gómez, 2009).

La digestibilidad es uno de los indicadores más utilizados para determinar la calidad de las proteínas debido a que no todas son digeridas, absorbidas y utilizadas en la misma medida debido a que existen factores inherentes a la

naturaleza de las proteínas alimentarias, a la presencia de componentes no protéicos con influencia en la digestión (fibra de la dieta, taninos, fitatos), factores antifisiológicos o a las condiciones de elaboración (FAO/OMS,1992). Se ha observado que, en el caso de la estimación de la fracción nitrogenada de un alimento, se considera la digestibilidad ileal la más apropiada, debido a que el proceso digestivo de las proteínas se completa en la parte distal del íleon (Mariscal Landín y col., 2009).

La digestibilidad ileal de proteínas puede ser expresada como coeficientes de digestibilidad aparente (DIA), la cual se define como la desaparición de un nutrimento durante su paso a través del tracto digestivo. El término aparente se emplea para evidenciar que en el cálculo de digestibilidad no se ha realizado ninguna corrección por pérdidas endógenas, ya que no es tomado en cuenta el origen de las proteínas (dietario o endógeno) y solo se estima la absorción aparente, lo que resulta en una subestimación de la digestibilidad (Mariscal y Reis, 2006)

El nitrógeno endógeno proviene de los aminoácidos y las proteínas presentes en las secreciones gástricas (saliva, jugo pancreático, jugo gástrico, bilis, mucinas), las cuales no fueron reabsorbidas durante su paso por el tracto gastrointestinal superior, así mismo la descamación de las células intestinales, los pelos ingeridos y la flora microbiana del intestino delgado son considerados pérdidas endógenas de nitrógeno. El nitrógeno endógeno puede ser metabolizado por los microorganismos locales, reabsorbido hasta en un 90% (70 o 90% en el íleon terminal) o excretada por las heces. Las pérdidas endógenas se clasifican en 2 categorías: basales, dependiente de los animales y las específicas, que son dependientes de los alimentos; mientras que el nitrógeno dietario, depende exclusivamente de las proteínas contenidas en el alimento consumido (Mariscal Landín y col., 2009).

2.5. MORFOLOGÍA DEL TUBO DIGESTIVO

2.5.1. INTESTINO DELGADO

El intestino delgado es la región larga del tubo digestivo con aproximadamente 110 cm de longitud en la rata y su función es llevar a cabo parte de la digestión y absorción de nutrientes. Se divide en tres regiones, duodeno, yeyuno e íleon, con características histológicas parecidas, pero cada una presenta particularidades (Ferrufino y col. 1996; Fortoul y Castell., 2010; Guerrero, 2015).

El intestino delgado es un órgano tubular formado por una mucosa, submucosa, muscular del órgano y serosa (Figura 1).

- La mucosa: la capa mucosa comprende el epitelio de revestimiento, la lámina propia y la muscular de la mucosa. Las vellosidades son proyecciones de la lámina propia, formada del tejido conjuntivo laxo. Hacia la base de la vellosidad se observan las glándulas intestinales (criptas de Lieberkühn) las cuales atraviesan la mucosa hasta la muscular de la mucosa. El epitelio de revestimiento de la vellosidad es un epitelio cilíndrico simple llamado también enterocitos; cada enterocito posee en su borde apical microvellosidades intercaladas entre otras células como las células caliciformes, las cuales son glándulas microcelulares (Guerrero, 2015, Dellmann y Brown, 1980)
- Muscular de la mucosa: es una capa delgada del tejido muscular liso (Guerrero, 2015)
- Submucosa: es una capa formada por tejido conjuntivo laxo, donde se puede localizar plexo nervioso, vasos sanguíneos y linfáticos, así como la presencia de tejido linfoide formando las placas de Peyer (Dellmann y Brown, 1980; Guerrero, 2015).
- Muscular del órgano: está conformada por dos capas de tejido muscular liso, la interna circular y la externa longitudinal, entre estas capas se puede encontrar plexo nervioso (Dellmann y Brown, 1980; Guerrero, 2015).

- Serosa: está formada del tejido conjuntivo laxo y revestido de mesotelio de peritoneo visceral (Dellmann y Brown, 1980; Guerrero, 2015).

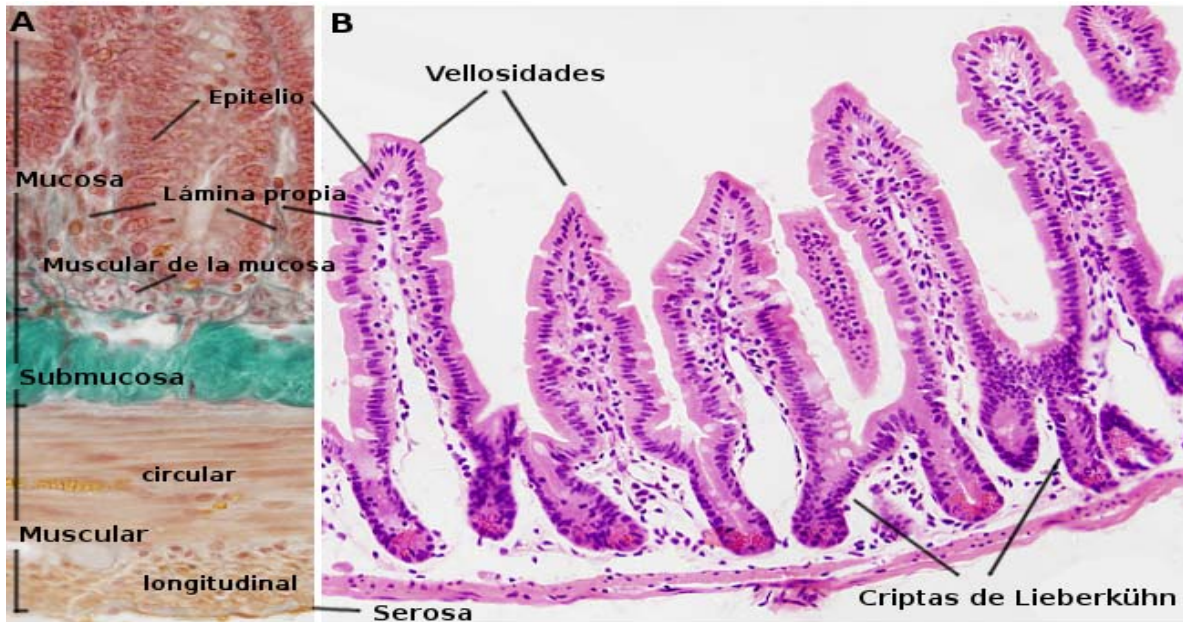


Figura 1. Capas del intestino delgado de rata. Secciones de parafina teñidas con A: Tricrómico de Masson; B) hematoxilina-eosina (Atlas de histología vegetal y animal, 2014)

2.5.2. INTESTINO GRUESO

El intestino grueso se extiende desde la válvula íleo-cecal hasta el ano y tiene unos 20 cm de longitud en la rata. Está conformado por el ciego, colon (el cual se divide en, ascendente, transverso y descendente) recto y el conducto anal. Sus funciones consisten en la absorción de agua y electrolitos, así como la compactación y eliminación de heces. No se presentan vellosidades dentro del intestino grueso, está constituido de epitelio cilíndrico simple invaginado a lo largo de la superficie del intestino formando las criptas de Lieberkühn (Fortoul y Castell, 2010).

De acuerdo al Atlas de histología vegetal y animal de la Universidad de Vigo, España, el intestino grueso de rata está recubierto de diversas capas, al igual que el intestino delgado sin embargo estas presentan algunas diferencias (Figura 2).

- Mucosa está formada por epitelio cilíndrico simple, el cual forma numerosas glandulas mucosas tubulares (criptas Lieberkhühn), las cuales son invaginaciones de la superficie epitelial. Contiene un mayor número de células mucosas en comparación con el intestino delgado. La lamina propia es muy similar al resto del tubo digestivo sin embargo carece de vasos linfáticos y de una capa gruesa de colágeno en tres la membrana basal del epitelio y los vasos sanguíneos próximos.
- Muscular de la mucosa: se organiza en dos capas de musculo liso con distintas orientaciones.
- Submucosa: está formada por tejido conectivo denso. Contiene vasos sanguíneos de gran calibre y algunas zonas con tejido adiposo.
- Capa muscular: contiene una capa longitudinal de músculo liso que es más delgada que la capa circular.
- Serosa: es una capa muy delgada de conectivo que en algunos puntos se continúa con el peritoneo.

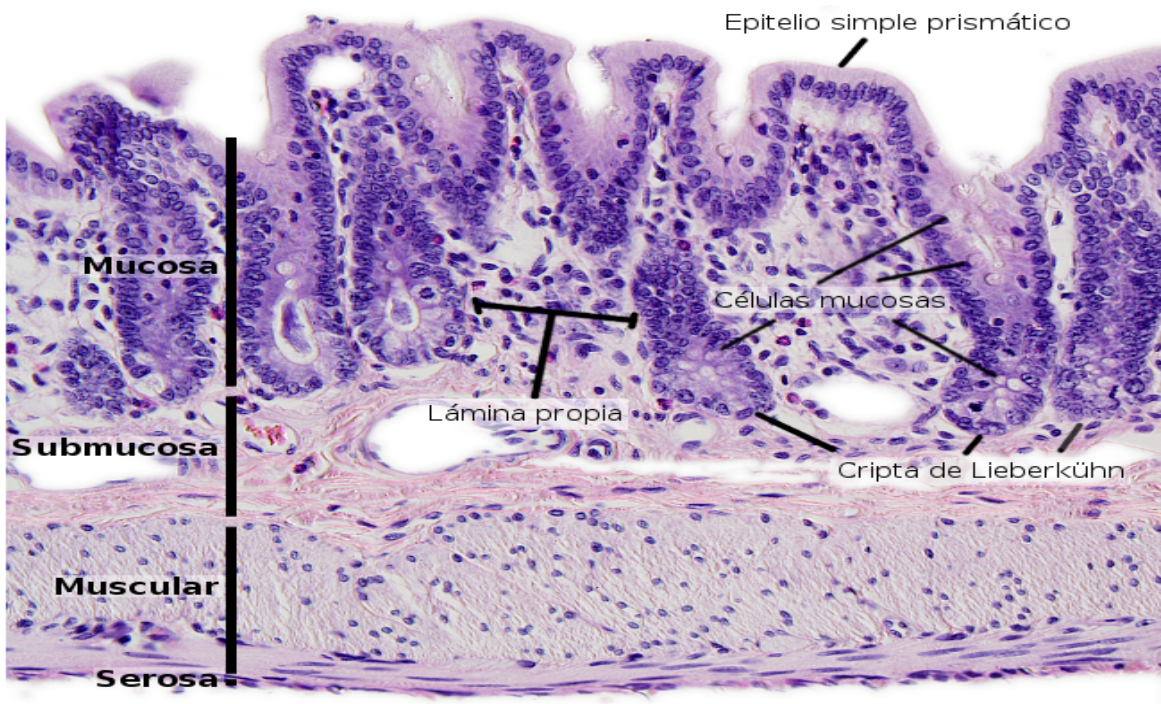


Figura 2. Capas del intestino grueso de rata. Secciones de parafina teñidas con hematoxilina-eosina (Atlas de histología vegetal y animal, 2014)

III. JUSTIFICACIÓN

Las lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) presentan efectos antiproliferativo y apoptótico sobre diversas líneas celulares de cáncer humano, principalmente sobre las células de cáncer de colon, así como inhibición de la tumorigénesis temprana en ratas. Las pruebas de toxicidad *in vivo* han mostrado buena tolerabilidad pero notorios efectos antinutricios, principalmente disminución en la ganancia de peso corporal en un 10% con respecto al control. Otros compuestos extraídos del frijol Tépari corresponden a inhibidores de proteasas (IP), los cuales reducen la capacidad de invasión así como inhibición de proteasas celulares. Ambos tipos de proteínas se encuentran en el frijol Tépari, por lo que se decidió estudiarlos es conjunto como una fracción denominada LIP-60. Dicha fracción ha mostrado tener menor efecto biológico que la fracción concentrada en lectinas (FCL). Sin embargo, dado que los dos tipos de proteínas son factores antinutricios, y debido a que el efecto adverso más importante de la FCL sobre ratas se relaciona con efectos antinutricios, el presente trabajo se enfocó en estudiar los efectos sobre la digestibilidad proteica y la integridad de las vellosidades intestinales, de la FCL y LIP-60. Lo anterior permitirá conocer mejor los efectos adversos de la administración oral de estas proteínas que se estudian como potenciales agentes contra cáncer de colon.

IV. HIPÓTESIS

La administración aguda y subcrónica, de una fracción concentrada de lectinas (FCL) y una fracción combinada de lectinas e inhibidor de proteasas (LIP-60) obtenidas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) presentan disminución sobre la digestibilidad protéica y la integridad de las vellosidades intestinales en ratas Sprague Dawley.

V. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar los efectos que presenta la administración aguda y subcrónica de FCL o LIP-60 de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*), sobre la digestibilidad protéica y la integridad de las vellosidades intestinales en ratas Sprague Dawley.

ESPECÍFICOS

1. Medir el coeficiente de digestibilidad fecal aparente de proteína cruda (CDFAPC) en un esquema de administración aguda de FCL y LIP-60.
2. Medir el coeficiente de digestibilidad fecal aparente de proteína cruda (CDFAPC) en un esquema de administración subcrónica de FCL y LIP-60.
3. Medir el coeficiente de digestibilidad ileal aparente de proteína cruda (CDIAPC) en un esquema de administración subcrónica de FCL y LIP-60.
4. Evaluar el efecto de la FCL y LIP-60 sobre la integridad de las vellosidades del epitelio intestinal.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente trabajo fue un estudio longitudinal, experimental y comparativo.

6.1.1. OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES LIP-60 Y FCL

La purificación de la lectina se realizó en el CINVESTAV Irapuato en el Laboratorio de Mecanismos de Defensa de Plantas a cargo del Dr. Alejandro Blanco Labra a partir de semillas limpias de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*). Brevemente, las semillas se molieron en un molino Tekmar A-10, se pesaron 100 g de la harina obtenida y se obtuvo el extracto crudo de proteína en 500 mL de agua desionizada agitando durante 12 h a 4° C, después se centrifugó a 14, 000 rpm durante 30 min. Se llevó a cabo una precipitación con 40% de saturación de sulfato de amonio con agitación magnética lenta. Esta suspensión se dejó equilibrar por 30 min a 4° C y después de centrifugarse a 18,000 rpm durante 1h, se descartó el precipitado obtenido. El sobrenadante fue llevado a 65% de saturación con sulfato de amonio, en este caso después de centrifugar nuevamente a 18,000 rpm durante 1h, se recuperó el precipitado y se descartó el sobrenadante. LIP-60 finalmente fue redisuelta en un volumen mínimo de agua desionizada y dializada en membrana de 3,500 Da, hasta la eliminación total de sales presentes, liofilizada y almacenada a -20° C hasta su uso. La fracción concentrada de lectinas (FCL) se obtuvo a partir de LIP-60, el cual se sometió a cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-75. La fracción finalmente fue redisuelta en un volumen mínimo de agua desionizada, dializada hasta la eliminación total de sales presentes, liofilizada y almacenada a -20° C hasta su uso (García-Gasca y col., 2012).

En ambas fracciones se cuantificó el contenido de proteínas (Bradford, 1976), presencia de lectinas (Jaffé, 1980) y determinación de la actividad de inhibitoria de tripsina (Erlanger y col., 1961; Schwertz y Takenaka, 1955) adaptada a placa de 96 pozos.

6.1.2. PREPARACIÓN DEL ALIMENTO

Con la finalidad de inactivar lectinas propias del alimento estándar para ratas (Rodent Lab Chow 5001) fue tratado térmicamente en autoclave durante 5, 10, 15 y 30 minutos a 105° C a 6 psi. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se molió en un molino industrial con una criba de 2 mm. Una vez molidos se sometieron al proceso de extrusión en CINVESTAV-Querétaro utilizando humedades de 16, 20 y 24% en los 4 tipos de alimentos. Se utilizaron temperaturas de 45, 79 y 104° C, para cada parte del extrusor, a 75 rpm y una velocidad de alimentación de 15 g/s. Los pellets obtenidos de la extrusión se pusieron en una estufa de secado a 40° C, por 24 h y se procedió al desgrasado del alimento utilizando una solución de cloroformo:metanol (4:1) en una proporción alimento-solución (1:4). Se dejaron en agitación durante 1 hora, se filtró con la ayuda una bomba de vacío y se procedió a realizar un segundo lavado tras el cual se dejó evaporar a temperatura ambiente.

Los diferentes tratamientos de alimento desgrasado fueron disueltos en agua HPLC en una proporción alimento:agua (1:5) y sometidos a un proceso de 24 h de agitación en refrigeración. Posterior a esto se llevó a cabo el filtrado utilizando una bomba de vacío y conservando la parte acuosa para llevar a cabo la determinación de proteínas (Bradford, 1976), presencia de lectinas (Jaffé, 1980) y determinación de la actividad de inhibitoria de tripsina (Erlanger y col., 1961; Schwertz y Takenaka, 1955) adaptada a placa de 96 pozos. De acuerdo con los resultados (cantidad de lectinas e inhibidores de proteasas, presentes en los alimentos) se seleccionó el tratamiento más adecuado para la inactivación de lectinas.

6.1.3. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL (AQP)

Se realizó un análisis químico proximal a los alimentos utilizados para el estudio (alimento pasado por extrusión y alimentos pasado por extrusión y adicionado con oxido de cromo) así como de alimentos tratado térmicamente (15 min) y alimentos estándar para ratas utilizando las técnicas establecidas por AOAC (1990)

[humedad (Método AOAC 942 -15), ceniza (Método AOAC 940-26), proteína (Método AOAC 920-152), grasa (Método AOAC 986-25), fibra cruda (Método AOAC 930-10)].

6.1.4. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA EN LA DIGESTIBILIDAD

Se utilizaron 18 ratas macho Sprague Dawley, de 3 semanas de edad, las cuales fueron pesadas y aleatorizadas en tres grupos de 6 ratas cada uno (LIP-60, FCL y control). Se colocaron en jaulas metabólicas individuales con a una temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ en ciclos de luz 12 h por 12 h de oscuridad. Se les administró agua *ad libitum* y alimento modificado térmicamente durante un periodo de 10 días. Posterior a esto se les dio alimento adicionado con óxido de cromo al 0.3% en base seca, el cual fue utilizado como marcador de digestibilidad, durante 3 días y al cuarto día se les administró una sola dosis, de acuerdo al grupo, de 100 mg/kg peso de LIP-60, 50 mg/kg de peso de FCL y 0.5 mL de solución fisiológica al grupo control. Se recolectaron las heces a las 0, 2, 4, 6, 8 y 10 h. Todas las muestras fueron etiquetadas, liofilizadas y congeladas para su posterior análisis.

6.1.5. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCRÓNICA EN LA DIGESTIBILIDAD

Se utilizaron 18 ratas macho Sprague Dawley, de 5 semanas de edad, las cuales fueron pesadas y aleatorizadas en tres grupos de 6 ratas cada uno (LIP-60, FCL y control). Se colocaron en jaulas metabólicas individuales a una temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ en ciclos de luz 12 h por 12 h de oscuridad. Se les administró agua *ad libitum* y alimento modificado térmicamente durante un periodo de 7 días. Posteriormente se les administró, de acuerdo al grupo, 100 mg/kg peso de LIP-60, 50 mg/kg de peso de FCL y 0.5 mL de solución fisiológica al grupo control en un esquema diario por un periodo de 30 días. En los días 7, 17 y 27 se empezó con alimento adicionado con óxido de cromo al 0.3% en base seca (el cual fue utilizado como un marcador de digestibilidad), lo que duró hasta el día 10, 20 y 30 respectivamente, donde se recolectaron heces y orina de 2 ratas por grupo, las

cuales se liofilizaron y congelaron para su posterior análisis. En los días 10, 20 y 30 se llevó a cabo el sacrificio de 2 ratas por grupo, se recolectaron en tubos de ensaye con rosca los contenidos ileales, los cuales fueron liofilizados y congelados a -80° C para su posterior análisis. También fueron recolectadas muestras de las diferentes porciones del intestino delgado y grueso, las cuales fueron lavadas, perfundidas y fijadas en formaldehido. En las muestras de orina fue determinado nitrógeno total (AOAC, 1990, Método 920-152). Las ratas fueron pesadas semanalmente durante el transcurso del experimento.

6.1.6. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICOS

Los intestinos obtenidos se fijaron en formaldehido al 10%, para su posterior análisis. Se realizaron los cortes semifinos, los cuales fueron procesados en el Histoquinete Leica TP1020. Posteriormente se realizaron los cortes finos de 5 µm con ayuda de un microtomo RM21 de la marca Leica para su posterior montaje y tinción con hematoxilina y eosina, posteriormente se hizo la medición, el análisis y la obtención de fotografías de las vellosidades intestinales utilizando un microscopio (Zeiss-Axio Vert A1).

6.1.7. DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDAD DE PROTEÍNAS

Las heces de la prueba aguda y subcrónica, así como los contenidos ileales fueron liofilizados y posteriormente molidos en un molino con una criba de 1 mm, tras lo cual se determinó el contenido de proteínas (AOAC, 1990, Método 920-152).

Para la determinación de cromo se preparó una mezcla digestora con 20 g de molibdato sódico en 300 mL de agua destilada. Posteriormente se le añadieron lentamente 300 mL de ácido sulfúrico concentrado, se dejó enfriar y finalmente se agregaron 400 mL de ácido perclórico al 60%. Se pesó 1 g de la muestra y se colocó dentro de un tubo Kjeldahl con 15 mL de la mezcla digestora. Se dejó reposar por 12 h y se colocaron las muestras en un digestor hasta que la solución

alcanzó un color verde claro (30 a 45 min). A continuación se virtió la solución a un matraz volumétrico de 100 mL, se aforó con agua destilada y se dejó reposar por 12 h. Las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro a 350 nm y se comparó con una curva patrón de Cr₂O₃ (Fenton y Fenton, 1979). Los datos obtenidos fueron adaptados a la fórmula descrita por Rowan y col. (1991); para llevar a cabo el cálculo de la digestibilidad ileal y fecal aparente de proteína cruda.

6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon las medias \pm la desviación estándar para cada tratamiento. Para determinar las diferencias entre tratamientos se realizó un ANOVA (Tukey, $p \leq 0.05$) mediante el programa SPSS v.18.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de determinar el alimento adecuado para ser utilizado en el estudio con ratas, dada la necesidad de inactivar las lectinas presentes en la dieta, se realizaron pruebas de actividad aglutinante a los diferentes alimentos sometidos a tratamiento térmico (5, 10, 15 y 30 min en autoclave) y extrusión. El alimento sometido por 30 min al autoclave presentó coloración muy oscura y un ligero olor a azúcar quemada, por lo que se descartó. Como se puede apreciar en la Figura 1, la actividad aglutinante disminuyó considerablemente con el proceso térmico al que fueron sometidos los alimentos. Se realizaron diversos ensayos para determinar la presencia de inhibidores de proteasas tipo tripsina utilizando diversas diluciones de la muestra e incluso utilizando la muestra pura de los alimentos y en ningún caso fue posible detectar la presencia de inhibidores de proteasas tipo tripsina (datos no mostrados). Se seleccionó el alimento sometido 15 min al autoclave y con un 20% de humedad ya que, además de presentar baja actividad aglutinante, fue el que presento una mejor consistencia.

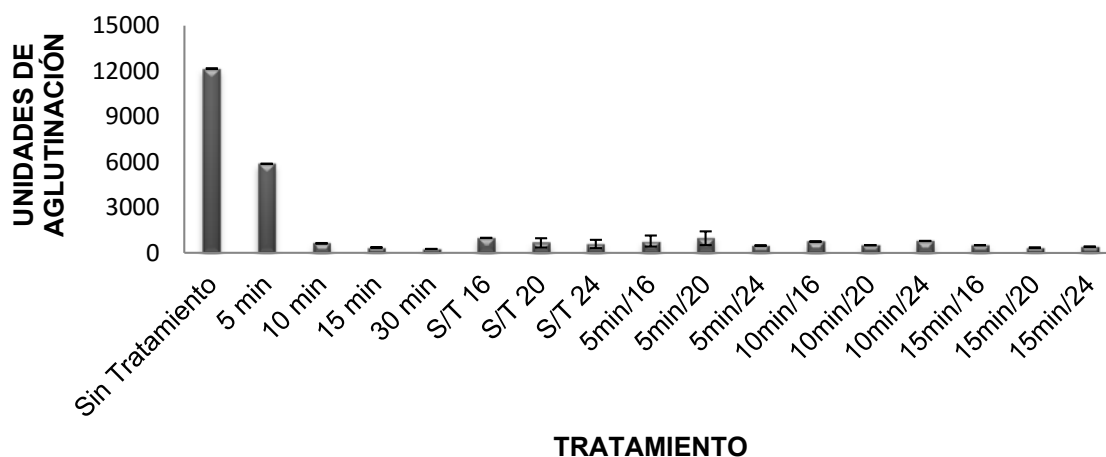


Figura 3. Actividad aglutinante de los alimentos sometidos a tratamientos térmicos y extrusión. Alimento estándar sin tratamiento (AS-ST), tratamientos térmicos en autoclave por 5, 10, 15 y 30 min; alimento sin tratamiento térmico (S/T) extruido con humedad al 16, 20 y 24%; alimento con tratamiento térmico y extruido con diferentes porcentajes de humedad 5min/16%, 5min/20%, 5min/24%, 10min/16%, 10min/20%, 10min/24%, 15min/16%, 15min/20%, 15min/24%.

En el análisis químico proximal del alimento estándar, el alimento tratado térmicamente y los dos tratados térmicamente y sometidos a extrusión Cuadro 1. Se observa un mayor porcentaje de humedad en el alimento estándar (sin tratamiento) en comparación de los otros tres alimentos. Esto se puede explicar ya que los alimentos sometidos al tratamiento térmico se sometieron a un periodo de secado, por tanto presentan un mayor contenido de materia seca en comparación con el alimento estándar. Sin embargo, los atributos nutricios de las dietas fueron similares a la dieta estándar en todos los casos.

Cuadro 1. Análisis químico proximal, de alimento estándar (sin tratamiento) y alimentos tratados térmicamente durante 15 min.

Parámetro AQP	Sin Tratamiento	Tratamiento térmico	Tratamiento térmico/extrusión	Tratamiento térmico/extrusión/óxido de cromo
% Cenizas	7.38 ^a	7.18 ^a	7.20 ^a	7.36 ^a
% Humedad	8.28 ^c	7.08 ^{b*}	6.44 ^{a*}	7.04 ^{a,b*}
% Materia seca	91.72 ^a	92.92 ^{b*}	93.56 ^{c*}	92.96 ^{b,c*}
% Proteína	24.02 ^a	24.26 ^a	24.70 ^a	24.27 ^a
% Grasa	4.07 ^a	4.03 ^a	4.01 ^a	4.09 ^a
% fibra cruda	0.67 ^a	0.64 ^a	0.61 ^a	0.62 ^a
% ELN	55.58 ^a	56.80 ^a	57.03 ^a	56.6 ^a

Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y el control (Dunnnett, $p < 0.05$).

PRUEBA DE ADMINISTRACIÓN AGUDA

Tras la administración de una sola dosis de los tratamientos, se llevó a cabo la recolección de heces a diferentes tiempos para determinar el efecto sobre la digestibilidad fecal aparente de proteínas a corto plazo. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$), a pesar de que se presentó tendencia a la disminución tras 2 h de la administración para ambos tratamientos. Lo anterior fue más notorio para el grupo administrado con LIP-60, principalmente a las 6 h posteriores a la administración (Figura 4).

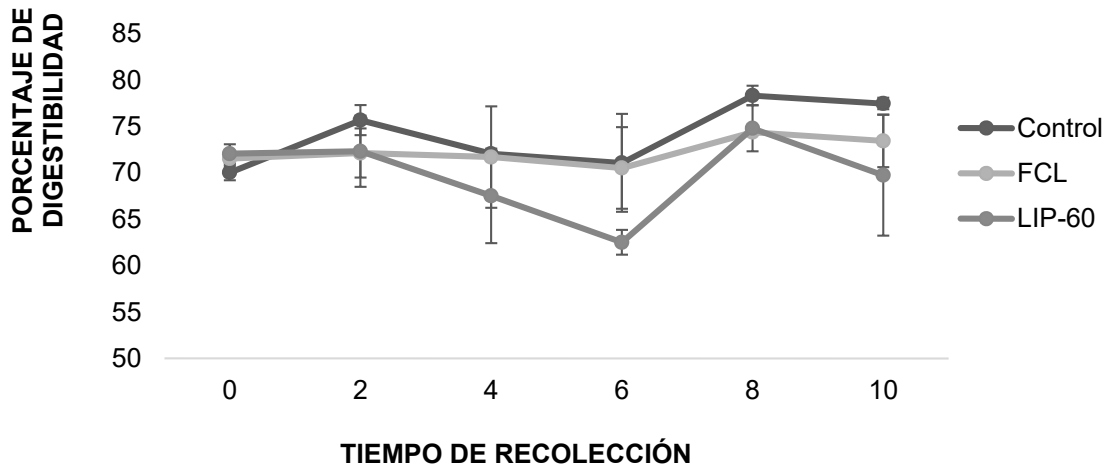


Figura 4. Porcentaje de digestibilidad total de proteína tras la administración aguda. Se determinó la digestibilidad aparente cada 2 h. No se observó diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

PRUEBA DE ADMINISTRACIÓN SUBCRÓNICA

Durante el periodo de administración subcrónica se determinó el peso corporal semanal de las ratas (Figura 5). En donde se observó una ligera pérdida en la ganancia de peso de alrededor del 7.8% para los animales tratados con la FCL respecto al control (sin diferencia estadística significativa $p > 0.05$). Este dato es similar a lo reportado anteriormente en donde se observó pérdida en la ganancia de peso de alrededor del 10% (Ferriz-Martinez y col., 2015).

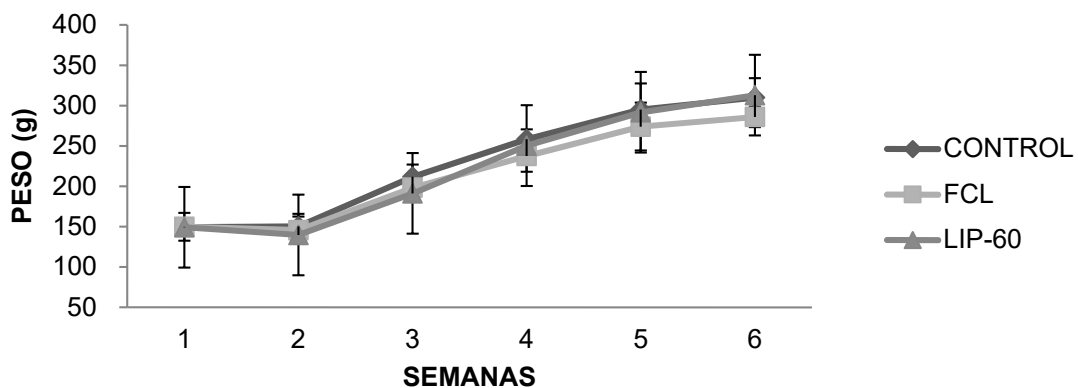


Figura 5. Promedio semanal de ganancia de peso corporal de ratas.

Durante el periodo de administración se llevó a cabo el sacrificio de 2 ratas por grupos los días 10, 20 y 30. Se recolectaron, pesaron y midieron los intestinos delgados y gruesos sin encontrar diferencias significativas ($p > 0.05$) en cuanto al peso (Figura 6), sin embargo, en lo que respecta a las longitudes, la única diferencia ($p < 0.05$) se observó en el intestino delgado del grupo de la FCL a los 20 días del tratamiento (Figura 7), con tendencia similar a las 30 días.

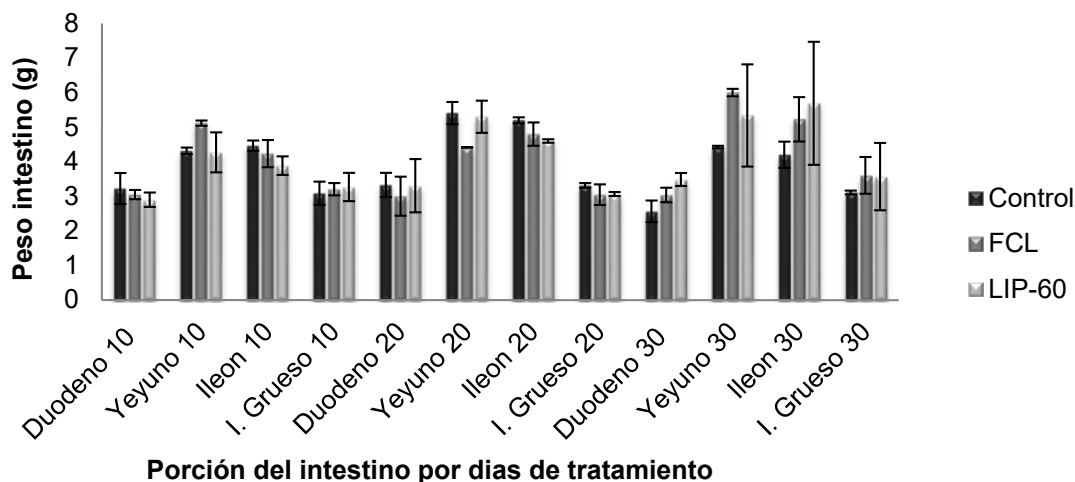


Figura 6. Peso promedio de intestinos por días de tratamiento.

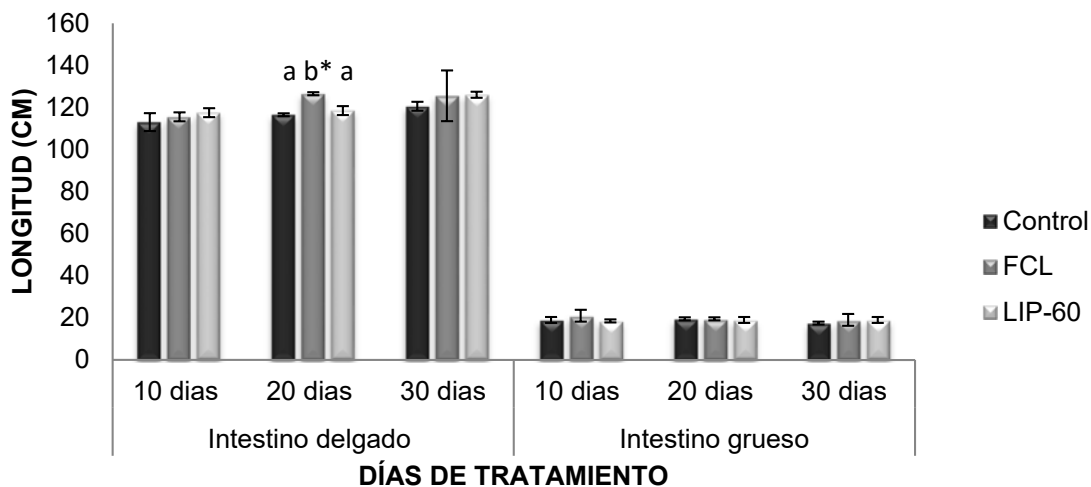


Figura 7. Longitud promedio de intestinos delgados por día de tratamiento. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y el control (Dunnett, $p < 0.05$).

Macroscópicamente se observó adelgazamiento en las paredes intestinales de las ratas tratadas con FCL y LIP-60. Principalmente en íleon de ratas tratadas con la FCL se observó mayor transparencia y delgadez de las paredes intestinales. La Figura 9 muestra una placa de Peyer visible en el caso del intestino de ratas tratadas con FCL por 10 días.

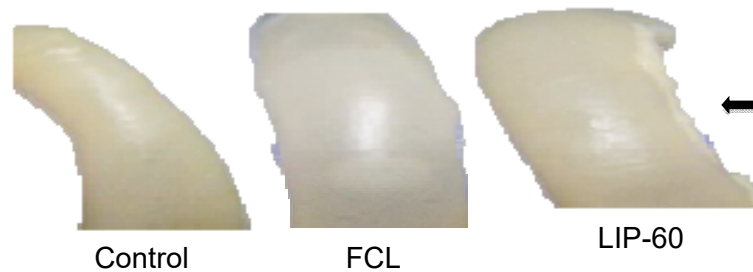


Figura 8. Observación macroscópica del íleon a los 10 días de tratamiento. La flecha indica una placa de Peyer visible a simple vista en el intestino de rata tratada con FCL, dada la delgadez y transparencia de las paredes intestinales.

Medición de la integridad de las vellosidades intestinales

Se llevó a cabo la observación macroscópica de los intestinos donde se contaron y midieron las áreas de las placas de Peyer. No se encontraron diferencias ($p > 0.05$), en el promedio total de placas por grupo, ni en el área promedio por placa (Figuras 9 y 10).

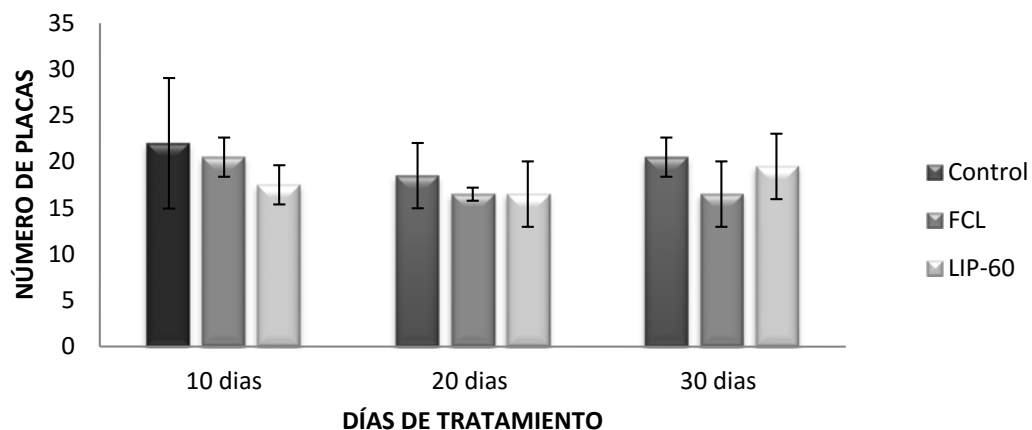


Figura 9. Promedio de placas totales por días de tratamiento. No se observó diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

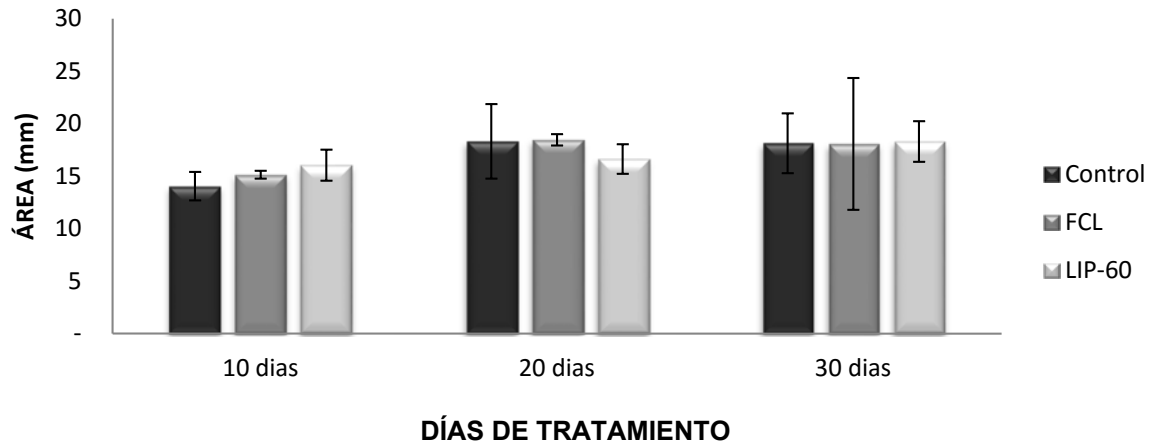


Figura 10. Promedio de áreas por placas por días de tratamiento. No se observó diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

A través del análisis de los cortes histológicos se pudo observar que, a los 10 días de tratamiento, el grupo administrado con FCL presentó atrofia en las vellosidades. Se observa ensanchamiento de las vellosidades debido a la fusión de 2 o más vellosidades dado que una vellosidad presenta en su base 2 o 3 criptas de Liberkühn (Figura 11). Lo anterior no es normal ya que las vellosidades no presentan criptas, son separadas por criptas. Así mismo se observa disminución de la altura de las vellosidades, así como cambio de estructura dado que la punta de la vellosidad se observa aplanada, dándole una apariencia cuadrada. El grupo administrado con LIP-60 mostró disminución en la altura y algunos cambios en la estructura pero no tan marcado como en el grupo tratado con FCL. Estos resultados se comprobaron al determinar el ancho y alto de las vellosidades de las diferentes porciones del intestino. A los 10 días de tratamiento, el duodeno del grupo tratado con FCL presentó disminución de la altura de 88 μm y un aumento en lo ancho de las vellosidades de 31.6 μm con respecto al control (Figura 13), mientras el grupo administrado con LIP-60 presentó tendencia a la disminución de la altura (32.8 μm) y ancho de las vellosidades (15.9 μm) que persistió a lo largo del intestino delgado así como en los diferentes tiempos de tratamiento. Desafortunadamente, no fue posible llevar a cabo la observación y medición de las alturas y ancho de las vellosidades de todas las porciones del

intestino delgado debido a que algunas muestras sufrieron insuflación a la hora de ser perfundidas, dada la fragilidad de la mucosa intestinal.

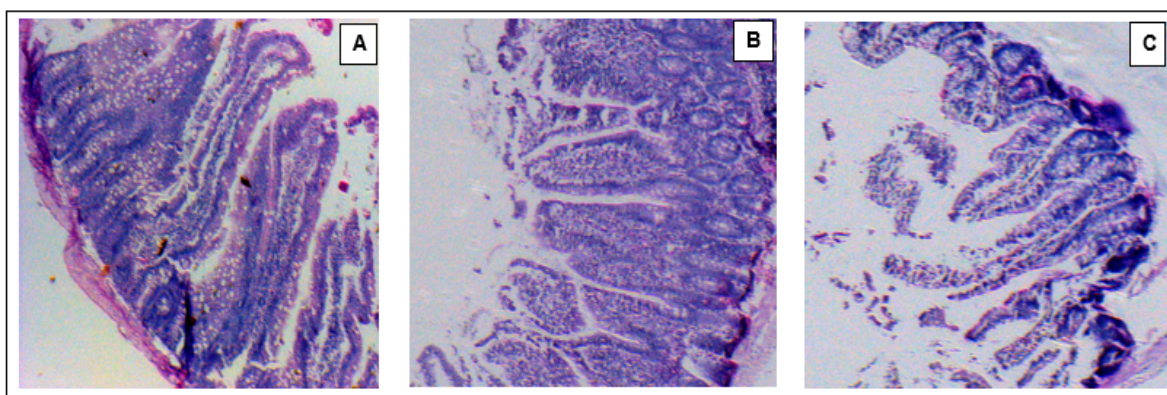


Figura 11. Vellosidades de duodeno con 10 días de tratamiento (5x). A, grupo control, B, grupo tratado con FCL, C grupo tratado con LIP-60. Se observa como las vellosidades del grupo control mantiene su forma y estructura normal, mientras que el grupo tratado con la FCL presenta disminución en su altura, así como una fusión de vellosidades que les dan una apariencia triangular, a diferencia del grupo tratado con LIP-60 que si bien empieza a presentar fusión de las vellosidades, si presenta disminución del tamaño de las mismas.

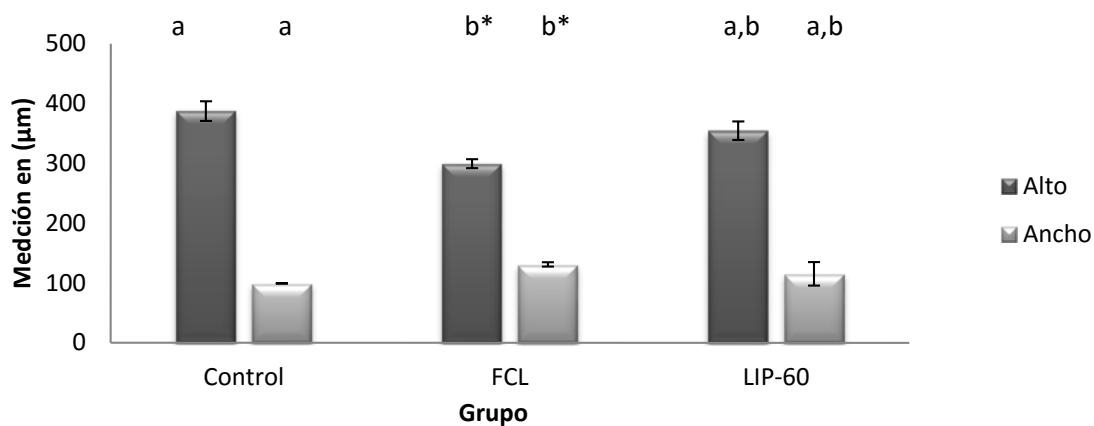


Figura 12. Alto y ancho de las vellosidades del duodeno a los 10 días de tratamiento. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre el grupo administrado con la FCL y el control (Dunnett, $p < 0.05$).

Tras la observación al microscopio de las criptas del intestino grueso, se observó que el grupo administrado con la FCL presentó disminución en la altura de las criptas con respecto al control a lo largo de las diferentes porciones del colon y en los diferentes tiempos de tratamiento. De forma similar, el grupo administrado con LIP-60 presentó disminución de la altura de las criptas pero no tan marcada como lo observado para el grupo tratado con (Figura 13). Lo anterior se comprobó tras la medición de la altura de las vellosidades, donde se observa una marcada disminución de la altura de las criptas en el colon transversal de los grupos administrados con la FCL y LIP-60 de 88.07 y 80.37 μm (promedio), respectivamente. Lo anterior puede deberse a la posición anatómica que permite un mayor tiempo y superficie de contacto, a diferencia del colon ascendente y descendente donde la disminución de la altura de las criptas se presentó en menor proporción (Figura 14).

Lo anterior sugiere atrofia de las vellosidades intestinales, lo que puede estar relacionado con el efecto antinutricio de las proteínas estudiadas. Se ha observado que la atrofia de las vellosidades intestinales está relacionada con la adhesión de las lectinas al tracto digestivo (De Dios y col. 2009). La aglutinina de soya y la lectina del frijol Kintoki se adhieren a las paredes del tracto digestivo interfiriendo con la absorción de nutrientes, principalmente proteínas (Lajolo y Genovese, 2002).

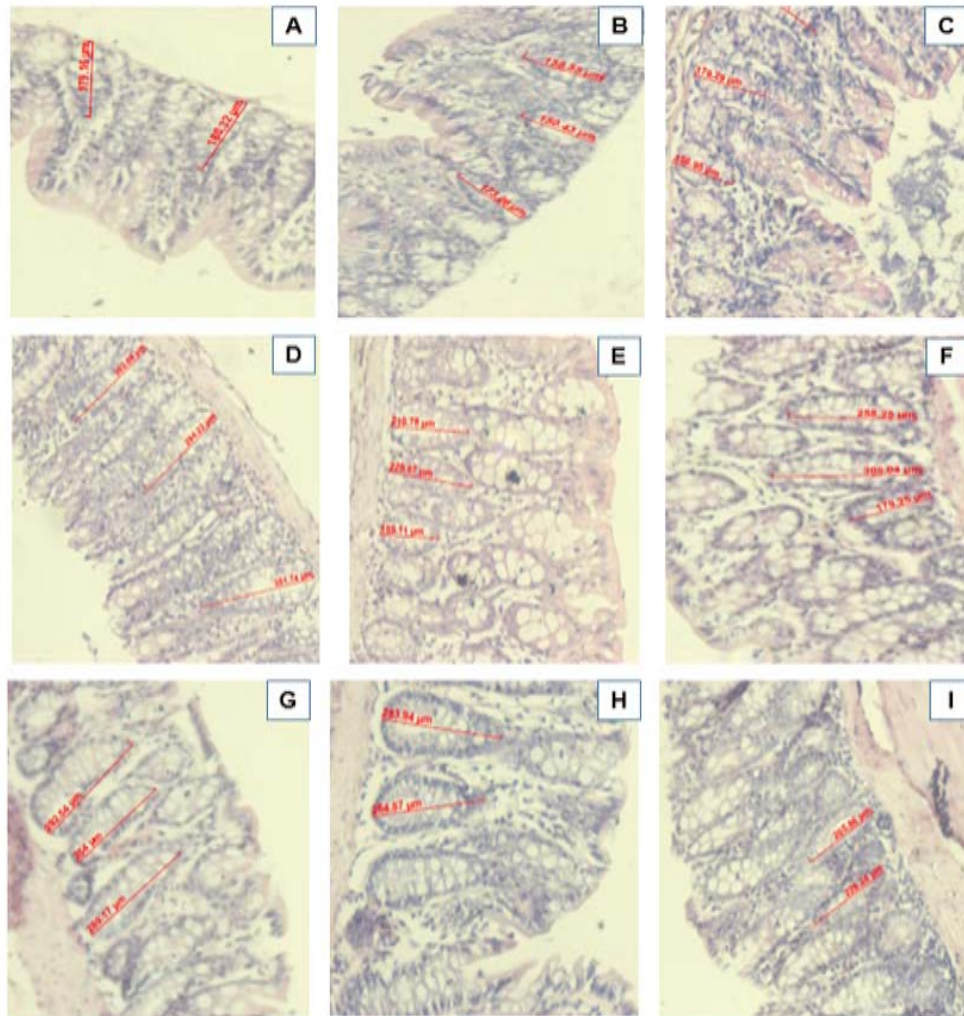


Figura 13. Criptas en las diferentes porciones del colon, a diferentes tiempos de tratamiento (10x). A-C, colon ascendente 10 días de tratamiento, donde A, control; B, FCL y C, LIP-60. D-F, colon transverso 20 días de tratamiento, donde D, control; E, FCL y F, LIP-60. G-I, colon descendente donde G, control; H, FCL e I, LIP-60. Se observa disminución en el tamaño de las criptas en los grupos tratados tanto con la FCL como con LIP-60 en las diferentes porciones del colon así como en los diferentes tiempos de tratamiento con respecto al control. Las líneas rojas señalan la altura de las criptas.

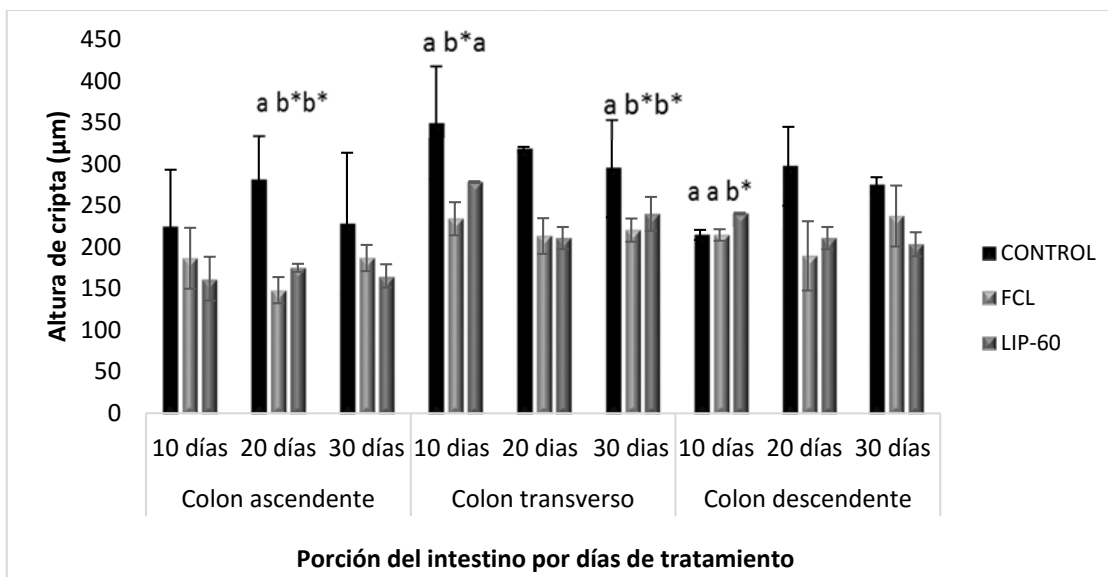


Figura 14. Altura de criptas por días de tratamiento. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y el control (Dunnett, $p < 0.05$).

Determinación de la digestibilidad de proteínas

Se determinó el contenido de nitrógeno en las diferentes muestras de heces contenidos ilieales y orina recolectadas (Cuadro 2). No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos para cada tiempo para el caso de heces y orina sin embargo, se puede observar una ligera tendencia al aumento del contenido de nitrógeno para los dos tratamientos en comparación con el grupo control. En el caso de los contenidos ileales se observó desde los 10 días de tratamiento aumento en el contenido de nitrógeno en el grupo tratado con FCL, mientras que para el grupo tratado con LIP-60 se presentó una disminución en comparación con el grupo control. Para los 20 días ambos tratamientos aumentaron el contenido de nitrógeno, donde LIP-60 presentó el mayor aumento. Cosa contraria sucedió a los 30 días donde la FCL presentó un mayor aumento. El aumento en el contenido de nitrógeno sugiere que la asimilación de proteínas está alterada, lo cual puede estar relacionado con la atrofia de las vellosidades y la acción de los inhibidores de proteasas. Asimismo, la disminución en la absorción de nitrógeno en el intestino delgado puede ser la razón de que exista una ligera

tendencia al aumento del contenido de nitrógeno en heces y orina. Se ha reportado que tras una dieta con lectinas de soya, las ratas presentaron reducción en la retención de nitrógeno, lo que genera aumento en la excreción de nitrógeno a través de la orina (Czerwinski y col., 2005).

Cuadro 2. Contenido de nitrógeno en heces, contenido ileal y orina en ratas por días de tratamiento.

Muestra	HECES			CONTENIDOS ILEALES			ORINA		
	10	20	30	10	20	30	10	20	30
Trat. Días									
Control	5.23±0.3	5.20±0.2	4.97±0.0	3.80±0.0 a	2.36±0.0a	3.17±0.0 a	2.40±0.0	3.15±0.0	3.06±0.0
FCL	5.60±0.2	5.36±0.1	5.27±0.1	3.85±0.0 b	3.24±0.1b*	3.70±0.4c*	2.61±0.0	3.26±0.0	3.08±0.4
LIP-60	5.47±0.2	5.90±0.6	5.33±0.0	3.0±0.0 c*	3.59±0.0c*	3.30±0.0b*	2.99±0.4	3.07±0.2	3.02±0.6

Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y el control (Dunnnett, $p < 0.05$).

En la Figura 16 se muestran las digestibilidades ileales aparentes de proteína cruda (DIAPC) y fecal aparente de proteína cruda (DFAPC) de la prueba subcrónica. En cuanto a la digestibilidad ileal de proteínas se puede observar que tras los primeros 20 días de tratamiento con la FCL y LIP-60, la diferencia en la digestibilidad fue mínima, alrededor del 1% ($p > 0.05$) con respecto al control. Estos resultados sugieren que, a pesar de que existe atrofia en las vellosidades intestinales, no se afectó de manera considerable la DIAPC durante los primeros 20 días de tratamiento sin embargo, estos resultados pueden deberse al aumento de la secreción de nitrógeno endógeno, ya que se ha observado que una dieta con lectinas de frijol es capaz de aumentar la secreción de nitrógeno endógeno (Le Gall y col., 2005). Asimismo, se ha observado que los inhibidores de proteasas en el tracto digestivo se unen de manera irreversible a la tripsina y quimotripsina inactivándolas, por lo cual se incrementa la secreción de tripsina y quimotripsina y por ende aumentan las pérdidas endógenas (Leterme, 2001). Sin embargo para

los 30 días de tratamiento se encontró una disminución de la DIAPC mayor que en los primeros 20 días de tratamiento, alrededor del 8% ($p < 0.05$) para ambos tratamientos con respecto al control, la cual puede deberse a que, a pesar de que se esté dando un aumento en la excreción endógena, la administración continua de lectinas no permite su adecuada digestión y se adhieren a los carbohidratos de las membranas intestinales, lo cual provoca atrofia de las vellosidades, reduciendo la superficie de absorción y, por tanto, la digestibilidad de proteínas en el caso de del grupo administrado con la FCL. Dado que la atrofia fue menor en el grupo administrado con LIP-60, la disminución observada en la digestibilidad puede estar relacionada con la inhibición de las proteasas digestivas por parte del IP, ya que se ha reportado que, tras la administración de diversas variedades de soya con un alto contenido de inhibidor de tripsina por 4 semanas, se reduce significativamente la digestibilidad en comparación con el grupo control, principalmente en la digestibilidad de proteínas (Chunmei y col., 2010). Otros estudios han reportado que tras la administración de alimentos con soya cruda o con altos niveles de inhibidor de tripsina, la digestibilidad proteica se reduce entre el 20 y el 40% (Qin, 1996; Caine y col., 1998). Asimismo, se ha observado que tras la administración de diferentes dosis de inhibidor de proteasas de frijol Tépari se presenta disminución de la digestibilidad de proteínas dependiente de la dosis (Osman y col. 2003).

En el caso de la DFAPC se encontró disminuida alrededor del 8% ($p > 0.05$) para ambos tratamientos a los 10 días, mientras que para los 20 días, el grupo administrado con FCL presentó disminución de alrededor del 3% ($p > 0.05$), mientras que el grupo administrado con LIP-60 presentó disminución de la digestibilidad total de alrededor del 8% ($p > 0.05$), en comparación con el grupo control. La disminución de la DFAPC debería ser menor que la ileal aparente DIAPC, debido a que la DFA es la suma de la DIAPC más la fermentación de compuestos nitrogenados por la microflora en el intestino grueso que contribuye con la digestibilidad. Sin embargo, la disminución de la DIAPC y la DFAPC fueron muy similares, esto puede deberse a la atrofia de las criptas de Lieberkühn y a la disminución en algunas porciones del epitelio cilíndrico simple del colon; lo cual

puede estar provocando disminución de células presentes en la mucosa y, posiblemente afectar a la microflora, disminuyendo así la digestibilidad de proteínas. A los 30 días de tratamiento, las diferencias entre las digestibilidades entre el grupo control y los tratamientos no fueron perceptible. No obstante, se puede apreciar que la disminución de la DIAPC fue mayor que la de la DFAPC, lo cual sería lo esperado sin embargo, los resultados son inconsistentes, por lo que será necesario aumentar el tamaño de muestra para profundizar en este sentido.

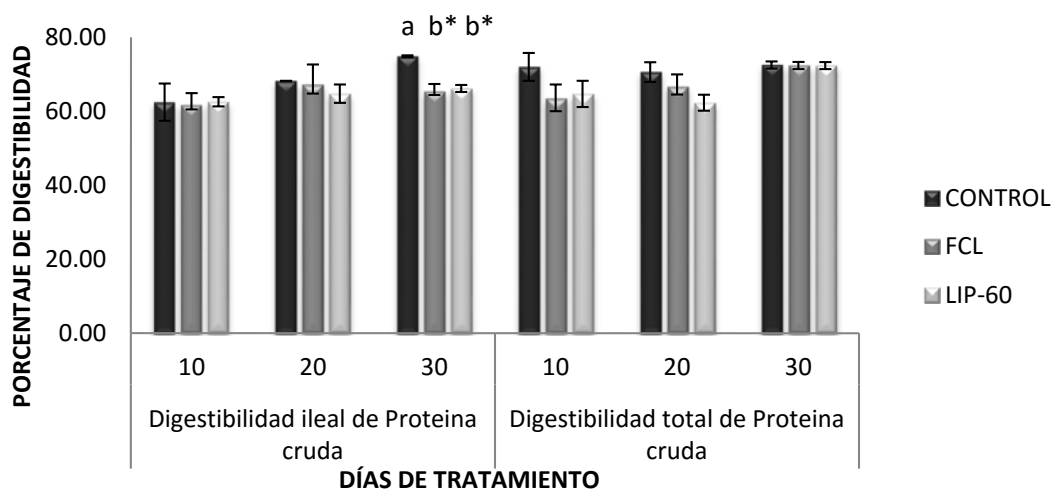


Figura 15. Digestibilidad ileal y fecal de proteína por días de tratamiento. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y el control (Dunnett, $p < 0.05$).

En el Cuadro 3 se presenta un resumen de los resultados encontrados durante el experimento.

Cuadro 3. Efectos de la FCL y LIP-60 sobre el organismo de ratas.

HALLAZGOS	FCL	LIP-60
Pérdida en la ganancia de peso	+++	-
Aumento de longitud de los intestinos	++	-
Adelgazamiento de las paredes intestinales	+++	+
Atrofia intestinal	+++	+
Aumento del porcentaje de nitrógeno	+	++
Disminución de la digestibilidad	+	+

VIII. CONCLUSIONES

A pesar de que el tamaño de muestra fue pequeño se observó tendencia a la disminución en la ganancia de peso en el caso del grupo administrado con la FCL, posiblemente relacionada con afectación en el proceso de absorción como resultado de la atrofia en las vellosidades intestinales. De manera general se observó que en todas las porciones del intestino delgado y grueso se presenta atrofia, lo que sugiere la adhesión y obstrucción por parte de las lectinas en el tracto intestinal. Lo anterior se relaciona con disminución la digestibilidad ileal aparente de proteínas para ambos tratamientos, mientras que la digestibilidad fecal aparente de proteínas disminuyó alrededor del 3% para grupo de la FCL, mientras que para LIP-60 la disminución fue mayor al 8%.

A pesar de que el grupo administrado con la FCL presentó mayor atrofia de las vellosidades intestinales, mostró una disminución de la digestibilidad menor al grupo administrado con LIP-60, lo que evidencia el papel antinutricio de los inhibidores de proteasas. Sin embargo, el daño es consistente con la presencia de lectinas, tanto en la FCL como en LIP-60.

Los resultados proporcionan evidencia inicial del mecanismo antinutricio fisiológico de las fracciones estudiadas sin embargo, dado el tamaño de muestra, el presente estudio debe considerarse como piloto y será necesario confirmar los hallazgos.

IX. LITERATURA CITADA

- AOAC. Association of Oficial Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Whashington (DC): Association of Oficial Analytical Chemists.
- Atlas de histología vegetal y animal de la universidad de Vigo, España, 2014. Disponible en <http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-delgado.php?pagina=20> ultima consulta 12 de diciembre de 2015.
- Barret AJ. 1980. The classification of proteinases. Ciba Found Symp. 75: 1-13.
- Biodiversidad Mexicana, el frijol; disponible en: <http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/alimentacion/frijol.html> ultima consulta 15 de diciembre de 2015.
- Birch A., Southgale B., Fellows L. 1985 Wild and semi-cultivated legumes as potencial sources of resistance to bruchid beetled for crop breeder: a study of Vigna/Phaseolus. In: Plants for arid lands. George Allen and Unwin., 303-320.
- Birk Y, Gertler A. 1961. Effect of mild chemical and enzymatic treatments of soybean meal and soybean trypsin inhibitors on their nutritive and biochemical properties. J. Nutr., 75: 379-387.
- Bode W, Huber R. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. Eur. J. Biochem., 204: 433-451.
- Blanco-Labra A., Aguirre Mancilla C. 2002. Proteínas Involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. Ac. Univer, 12: 3-28.
- 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.
- Caine WR.; Sauer WC.; Verstegen MW.; Tamminga S.; Li S.; Schulze H. 1998. Guanidinated protein test meal with higher concentration of soybean trypsin inhibitors increase ileal recoveries of edogenous amino acids in pigs. J. Nutr., 128: 598-605.
- Castillo-Villanueva A, Abdullaev F. 2005. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. Rev de Invest Clín, 57: 55-64.

- Chaudhary NS, Shee C, Islam A, Ahmad F, Yernool D, Kumar P, Sharma AK. 2008. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from putranjiva roxburghii seeds. *Phytochem*, 69(11): 2120–6.
- Chunmei Gu, Hongbin Pan, Zewei Sun, Guixin Qin. 2010. Effect of soybean variety on anti-nutritional factors content, and growth performance and nutrients metabolism in rat. *Int. J. Mol. Sci.*, 11:1048-1056.
- Church DC, Pond WG. 1994. *Fundamentos de nutrición y alimentación de animales*. Editorial Limusa, S. A. de C. V. Grupo Noriega Eds. México. 438.
- Córdoba F, Martínez M. 1997. Estudio bioquímico de la evolución de la lectina de coleoptilo de maíz. <http://www.laboratorio.com.mx/ito00007.html> Última consulta Noviembre 2013
- Caffini NO, López LMI, Natalucci CL, Priolo NS. 1988. Proteasas de plantas superiores. I. Características generales, rol fisiológico y aplicaciones. *Acta Farm Bonaerense* 7: 195-213.
- Czerwinski JH, Leontowicz M, Gralak MA. 2005. Response of rats to a moderate intake of soybean lectin. *J. Anim. Feed Sei.* 14: 537-540.
- De Dios A., Porrilla YP., Chaparro DC., 2009. Factores antinutricionales en semillas. *Rev. Bio. Agro.* 7: 45-54.
- Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95: 271-278.
- Fan MZ, Saber WG. 1995. Determination of apparent ileal amino acid digestibility in baley an canola meal for pigs with the direct difference, and regreition methods. *J. Anim. Sci*, 73: 2364-74.
- FAO/OMS, 1992. Informe de una Consulta de expertos. Evaluación de la calidad de las proteínas. EE.UU. 57p.
- Fenton TW, Fenton M. 1979. An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and feces. *Can J Anim Sci* 59:631-634
- Ferriz-Martinez R. A., Torres-Arreaga I. C., Blanco-Labra A. y Garcia-Gasca T. 2010. *New Approaches in the Treatment of cáncer*, Mejia Vazquez C. (editora).. Nova Science Publisher, inc. México, pp.71-89.

- Ferriz-Martínez R., García-García K., Torres-Arteaga I., Rodríguez-Mendez A. J., Guerrero-Carrillo M. de J., Moreno-Celis U., Ángeles-Zaragoza M. V., Blanco-Labra A., Gallegos-Corona M. A., Robles-Álvarez J. P., Mendiola-Olaya E., Andrade-Montemayor H. M., García O. P. y García-Gasca T. 2015. Tolerability assessment of a lectin fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats. *Toxicology Reports*, 2: 63–69
- Ferrufino J C, Taxa L, Ángeles G. 1996. Histología normal del intestino delgado. *Rev Med Hered.*, 7: 46-57.
- Fortoul T y Castell A., 2010. Histología y biología celular. De León Fraga E. (editor) Mc Grawhill interamericana editores, S.A de C.V., México, pp. 224-227.
- García-Gasca T., Salazar-Olivo L., Mendiola-Olaya E. y Blanco-Labra A. 2002. The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on in vitro cell proliferation and cell adhesion of transformed cells, *Toxicol. In Vitro*, 16: 229-233.
- García-Gasca T., García-Cruz M., Hernandez-Rivera E., López-Matínez J., Castañeda-Cuevas A. L., Yllescas-Gasca L, Rodríguez-Méndez A. J., Mendiola-Olaya E., Castro-Guillén J. L. y Blanco-Labra A. 2012. Effects of Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Protease Inhibitor and Semipure Lectin Fractions on Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 64(8), 1269–1278.
- Guerrero Carillo MJ, 2015. Comunicación personal. Docente de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Gonzales de Mejia E, Hankins CN, Paredes-López, Shannon LM. 1990. The lectins and lectin-like proteins of Tepary beans (*Phaseolus acutifolius*) and Teparycommon beans (*Phaseolus vulgaris*) híbridos. *J. of Food Biochem.* 14: 117–126.z
- González de Mejía E, Prisecaru V. 2005. Lectins as bioactive plant proteins: A potencial in cancer treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr* , 45: 425-445.
- 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*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 30(4): 381-94.

- Harmon D. 2007. Experimental approaches to study the nutritional value of foods ingredients for dogs and cats. R. Bras. Zootec. 36(Suplemento especial) 251-262.
- Hernández Cruz P, Perez Campos E, Martinez Martinez L, Ortiz B, Martinez G. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudios de las interacciones proteína-carbohidrato. REB, 24: 21-27.
- Idouraine A, Yensen S. 1991. Tepary bean flour, albumin and globulin fractions functional properties compares with soy protein isolate. J. Food Sci., 56:1316-1318.
- Intriago-Ortega MP. 1985. Aislamiento y parcial caracterización de las principales proteínas de semillas de frijol de las especies *Phaseolus vulgaris L.*, *Phaseolus acutifolius* y *Phaseolus coccineus*. Tesis de Licenciatura en Biología. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza. UNAM.
- Jaffé W.1980. Hemagglutinins (lectins). In: Toxic constituents of plant foodstuffs. Academic Press. New York, NY, EU. pp. 73-102.
- Koiwa H, Bressan R, Hasegawa P. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. Trends Plant Sci., 2: 379-384.
- Lajolo F, Genovese M. 2002. Nutricional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. J. Agric. Food Chem., 50: 6592-6598.
- Le Gall M, Quillien L, Guéguen J, Rogniaux H, Sève B. 2005. Identification of dietary and endogenous ileal protein losses in pigs by immunoblotting and mass spectrometry. J Nutr. 135:1215-1222.
- Leterme P. 2001. Las pérdidas endógenas hasta el íleon del cerdo: origen y factores de variación. Acta Agro Colombia, 51:1-13.
- Lis H, Sharon N. 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins that mediate cellular recognition. Chem. Rev, 98:637-674.
- López-Sánchez C, López-Martínez FJ, Castañeda-Cuevas AL, Yllescas-Gasca L, Ferríz-Martínez RA, Torres-Arteaga IC, Gallegos-Corona MA, Rodríguez-Méndez AJ, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A, García-Gasca T. 2010. Evaluación de la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de lectinas de frijol Tépari. Rev Ciencia@UAQ. 3:3-13.

- 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. *Phytochem.*, 51: 721-728.
- Mariscal-Landin G., Reis de Souza TC. 2006. Endogenous ileal losses of nitrogen and amino acids in pigs and piglets fed graded levels of casein. *Arch. Anim. Nut.* 60: 454-466.
- Mariscal Landín G, Reis de Souza TC, Hernández Delgado AA, Escobar García K. 2009. Pérdidas endógenas de nitrógeno y aminoácidos en cerdos y su aplicación en la estimación de los coeficientes de digestibilidad ileal de la proteína y aminoácidos de las materias primas. *Revisión. Tec. Pec. Mex.* 47:371-388.
- Mendoza W, Gandolfo L, Ponce L, Novello J, Marangoni S. 2007. Estudios estructura y función de una lectina aislada de semillas de *Caesalpinia spinosa* kuntze (Tara). *IDESIA*, 25: 49–58.
- Micucci HA, Camps E. 1987. Lectinas: Obtención, estructura química, propiedades y aplicaciones diagnósticas y farmacología. *Acta. Farm. Bonaer.*, 6: 36-54.
- Nakata S, Kimura T. 1985. Effect of ingested toxic bean lectins on the gastrointestinal tract in the rat. *J. Nut.*, 115: 1621-9.
- Osman M, Reid P, Weber C. 2003. The effect of feeding Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) proteinase inhibitors on the growth on pancreas of young mice. *Pak. J. Nutr.*, 2: 111-115.
- Parra J, Gómez Z A. 2009 Importancia de la utilización de diferentes técnicas de digestibilidad en la nutrición y formulación porcina. *Rev.MVZ Córdoba* 14:1633-1641.
- Pusztai A, Bardocz S. 1996. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. *Trends Glycosci. Glico.* 8: 149-165.
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.*, 378: 705–16.
- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. 2008. MEROPS: The Peptidase Database. *Nucleic Acids Research Nucleic Acids Research.* 36, Database issue doi:10.1093/nar/gkm954

- Rhodes JM. 1999. Beans means lectins. *Gut*, 44: 593-594.
- Roy DM. y Schneeman BO, 1981. Effect of soy protein, casein and trypsin inhibitor on cholesterol, bile acids and pancreatic enzymes in mice. *J. Nutr.*, 111: 878-885.
- Rowan AM, Moughan PJ, Wilson MN. 1991. Acidin soluble ash as a marker compound for use in digestibility studies with humans. *J Sci Food Agric.*, 54: 269-274.
- Ryan CA, Pearce G. 1990. Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 14: 1–17.
- Savelkoul F, Poel V, 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.
- Schwartz GW, Takenaka Y. 1955. A espectrophotometric determination of trypsin and chymotripsin activity. *Biochem. Biophys. Acta*, 16: 0571-575.
- Secombe CJ, Lester GD. 2012. The role of diet in the prevention and management of several equine diseases. *Anim Feed Sci Technol*, 173: 86-101.
- Shade R, Pratt R, Pomeroy M. 1987 Development and mortality of the bean weevil, (*Coleoptera Bruchidae*), on mature seeds of therapy beans, *P acutifolius*, and common beans *P. vulgaris*. *Environ. Entomol.*, 69(5): 1067-1070.
- Stein HH, Fuller MF, Moughan PJ. 2007. Definition of apparent, true, and standardized ileal digestibility of amino acids in pigs., *Livest. Sci.* 109: 282-285.
- Suárez-Rendueles P, Wolf DH. 1988. Proteinase function in yeast: iochemical and genetic approaches to a central mechanism of post-translational control in the eukaryotic cell. *FEMS. microbiol. Lett.* 54: 17-46.
- Valadez-Vega C, Alvarez-Manilla G, Riverón-Negrete L, García-Carrancá A, Morales-González J, Zuñiga-Pérez C, Madrigal-Santillán E, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, Villagómez-Ibarra R, Bautista M, Morales-González A. 2011. Detection of cytotoxic activity of lectin on human colon adenocarcinoma (Sw480) and epithelial cervical carcinoma (C33-A). *Molecules.* 16: 2107-2018.