Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

Efecto sistémico y remanente de la administración intragástrica de la fracción concentrada de lectinas del frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*), en ratas Sprague Dawley de diferentes edades

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta:
M.C. Julia María Alatorre Cruz

Dirigido por:
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Codirigido por:
Dr. Alejandro Blanco Labra

SINODALES

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca Presidente	_____ Firma
Dr. Alejandro Blanco Labra Secretario	_____ Firma
Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez Sinodal	_____ Firma
Dra. Tércia Cesária Reis de Souza Vocal	_____ Firma
Dr. José Luis Castro Guillén Sinodal	_____ Firma

_____ Dra. Juana Elizabeth Elton Puente Directora de la Facultad	_____ Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre, 2018
México

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

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

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

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

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

Bajo los siguientes términos:

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

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

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

Avisos:

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

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

Resumen

Las lectinas de leguminosas son proteínas con la capacidad de reconocer carbohidratos que se encuentren integrados a membrana o que estén de manera libre. Son consideradas factores antinutricios porque afectan la biodisponibilidad de nutrimentos. La fracción concentrada de lectinas (FCL) del frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) presenta capacidad citotóxica selectiva en líneas celulares de cáncer, así como la capacidad para inhibir tumores de colon en etapa temprana en ratas. En estudios *in vivo* nuestro grupo de trabajo ha determinado que presenta buena tolerabilidad, sin afectación sistémica, sin embargo, se presentaron efectos antinutricios como la pérdida en la ganancia de peso del 10% en las ratas tratadas. Lo anterior hace necesario el estudio sobre sus efectos sistémicos y remanentes en ratas de diferentes edades, considerándose importante en el desarrollo de un fármaco. Se utilizaron ratas Sprague Dawley sanas adquiridas de la INB-UNAM de 5 y 25 semanas de edad. Los esquemas de tratamiento fueron: estudios a corto plazo (6 semanas de tratamiento) tanto en ratas adultas como jóvenes sanas; estudio intermitente (2 períodos de 6 semanas de tratamiento y 2 semanas intermedias de descanso) con ratas jóvenes en donde se realizaron sacrificios los días 1, 9, 22, 43, 57, y 100 para observar efectos remanentes y sistémicos; estudio sostenido (12 semanas de tratamiento) con ratas jóvenes. Los animales se pesaron y midieron semanalmente y se determinó el consumo de alimento. Al finalizar el tratamiento correspondiente se realizaron pruebas bioquímicas como biometrías hemáticas, proteínas totales, albúmina, creatinina, urea, α-amilasa, insulina, ALT y glucosa. El hígado, páncreas, intestino delgado y grueso, timo y bazo se pesaron, se midieron y se realizaron su análisis histopatológico. No se encontraron efectos sistémicos y antinutricios tras la administración subcrónica de la FCL con ratas adultas y jóvenes, sin embargo, se observó hipertrofia pancreática. En el experimento intermitente en ratas jóvenes se observó disminución en la ganancia de peso del 4%, al día 9 se presentó aumento en la proporción de granulocitos e incremento de la pulpa blanca en bazo, el día 43 se observó incremento de tamaño de intestino delgado del 14% y disminución del intestino grueso del 21%, atrofia intestinal, así como hipertrofia pancreática. Tras el descanso de 2 semanas, se revirtió la hipertrofia provocando atrofia pancreática y al día 100 se encontró que el páncreas se recuperó. En el tratamiento crónico no presentaron efectos sistémicos ni antinutricios, excepto el incremento del tamaño del corazón. Los resultados muestran que la administración de la FCL provoca efectos adversos relacionados con sus propiedades antinutricias sin efecto detrimental a nivel sistémico. Será necesario determinar sí los efectos adversos se revierten por completo utilizando esquemas más largos de descanso.

Palabras clave: Efectos antinutricios, frijol Tépari, lectinas, *Phaseolus acutifolius*

Summary

Legume lectins are proteins with the capacity to recognize membrane-integrated or free carbohydrates. They are considered antinutritional factors because they affect the bioavailability of nutrients. The Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) lectin fraction (TBFL) has selective cytotoxic capacity in cancer cell lines, as well as the ability to inhibit early stage colon tumors in rats. *In vivo* studies our working group has determined that it presents good tolerability, without systemic affectation, however, there were antinutritional effects as the loss in weight gain of 10% in the treated rats. This makes it necessary to study its systemic and residual effects in rats of different ages, considered important in the development of a drug. Healthy Sprague Dawley rats acquired from the INB-UNAM at 5 and 25 weeks of age were used. The treatment schemes were: short-term studies (6 weeks of treatment) in both adult and healthy young rats; intermittent study (2 periods of 6 weeks of treatment and 2 intermediate weeks of rest) with young rats where sacrifices were made on days 1, 9, 22, 43, 57, and 100 to observe residual and systemic effects; sustained study (12 weeks of treatment) with young rats. Weekly the animals were weighed and mesure, the food consumption was determined and at the end of the corresponding treatment, biochemical tests were performed, such as blood biometrics, total proteins, albumin, creatinine, urea, α-amylase, insulin, ALT and glucose. The liver, pancreas, small and large intestine, thymus and spleen were weighed and measured, performing histopathological analysis. No systemic and antinutritional effects were found after subchronic administration of TBFL with adult and young rats, although pancreatic hypertrophy was observed. In the intermittent experiment in young rats there was a decrease in weight gain of 4%, on day 9 there was an increase in the proportion of granulocytes and an increase in the white pulp in the spleen, on day 43 an increase in the size of the small intestine was observed 14% and 21% bowel reduction, intestinal atrophy, as well as pancreatic hypertrophy. After the 2-week rest, pancreatic hypertrophy reverted and atrophy was observed, and by day 100 it was found that the pancreas recovered. In the chronic treatment, there were no systemic or antinutritional effects, except for the increase in heart size. The results show that the administration of TBFL causes adverse effects related to its antinutritional properties without detrimental effect at the systemic level. It will be necessary to determine if the adverse effects are reversed completely using longer resting patterns.

Key words: Antinutritional effects, lectins, Tepary bean, *Phaseolus acutifolius*

Dedicatorias

Dedico de todo corazón mi tesis, a mi familia principalmente a mi hermana Graciela Catalina y a Héctor mi cuñado por su cariño y su apoyo incondicional en todo el trayecto de mi vida y de mi doctorado, los quiero muchísimo.

Se la dedico a mi esposo a quién tanto amo Ricardo por todo su amor, comprensión y su espera para finalizar mi doctorado que con todo cariño estoy concluyendo.

Dedico con mucho cariño a mis directores de tesis Dra. Tere y Dr. Alejandro que con todo cariño me han enseñado cosas maravillosas, siempre con el afán de que crezca y logre mis objetivos en mi vida, gracias por haberme brindado su apoyo incondicional los quiero mucho.

También se lo dedico con mucho cariño y respeto a mis profesores del comité tutoral que me han apoyado, enseñado muchísimo, quiénes siempre me dejaron reflexionando con sus excelentes recomendaciones para mejorar mi investigación.

Se las dedico con un agradecimiento enorme a mis amigos y compañeros de trabajo, quiénes en las buenas y malas me han apoyado en mi tesis con gran entusiasmo y me han enseñado a crecer más, los quiero y los respeto mucho a Carmen, Aarón, Liliana, Pao, Joss, Verito, Wen, Rosa, Octavio, Ricardo, Laura, Paco, Marce, Marielita, Lalo; en el CINVESTAV-Irapuato: Carmen, Bety, Tere, Marianita, Raquel, Iovana, entre otros.

Agradezco a Dios por darme la oportunidad de conocer a tanta gente hermosa en mi vida y que aparte contribuyan a mi vida a crecer y a luchar en mis logros personales.

Agradecimientos

Agradezco muchísimo a todas las personas que me apoyaron en mi proyecto, principalmente a la Dra. Teresa García Gasca por todo su apoyo, su conocimiento y su experiencia, porque siempre confío en mí desde que inicie el proyecto con ella, la quiero mucho.

Agradezco con mucho cariño también al Dr. Alejandro Blanco Labra quién siempre me apoyo, guío y motivó para que continuara con mucho cariño y entusiasmo mi proyecto, dándome los mejores consejos de vida.

A mi bellísimo comité tutoral Dra. Tércia, José Luis y Roberto quiénes siempre me aportaron cosas buenísimas para que creciera en mi proyecto y me enamorara cada vez más de él.

A mi hermoso equipo de trabajo de las ratas, Dra. Verito, Joss, Aarón, Wen, Liliana, Claudita, Selene y Rosa un equipo fabuloso lleno de entusiasmo.

Algunas personas quiénes participaron en algunos de mis sacrificios que me apoyaron de corazón también fueron Emiliano, Roberto, Ulisses.

Gracias a mis amigos por el apoyo en los trámites administrativos y técnicos con mucho entusiasmo, por su paciencia y cariño Joss y Nayelli, mil besos, los quiero.

A mi amiga Carmen Mejía quién con mucho cariño me apoyó, me orientó muchas veces y estuvo ahí en las buenas y en las malas. Te quiero.

A mi equipo de Irapuato que siempre estuvo conmigo Betty, Tere, Ricardo, Octavio, Carmen, Marianita, Jimena, Raquel, Olivia y varios estudiantes más que amablemente me escucharon en los múltiples seminarios, me aportaron y me dieron bastantes ideas para seguir adelante con este bello proyecto. Los quiero.

Agradezco a CONACYT por la beca que me dio de Doctorado y al Proyecto de Ciencia básica (CB-2014-01-241181), PFCE2017, FOFI-UAQ 2015.

Índice

Resumen	**1**
Dedicatorias	3
Agradecimientos	4
Índice	5
Índice de cuadros	7
Índice de figuras	8
I. INTRODUCCIÓN	10
II. ANTECEDENTES	12
2.1. Frijol Tépari	12
2.1.1. Lectinas como factores antinutricios	12
2.2. Lectinas e interacciones celulares	22
2.3. Efecto de lectinas del frijol Tépari sobre cáncer de colon	33
III. JUSTIFICACIÓN	37
IV. HIPÓTESIS	38
V. OBJETIVOS	38
5.1 Objetivo general	38
5.2 Objetivos específicos	38
VI. METODOLOGÍA	39
6.1 Obtención del frijol Tépari	39
VII. RESULTADOS	50
7.1 Experimento 1. Efecto de la administración intragástrica de TBFL a largo plazo intermitente en ratas Sprague Dawley jóvenes	50
7.2 Experimento 2. Efecto de la administración intragástrica de TBFL a largo plazo sostenido en ratas jóvenes	61

7.3 Experimento 3. Efecto de la administración intragástrica de TBFL en animales adultos en esquema a corto plazo 66

VIII. CONCLUSIONES 73

IX. LITERATURA CITADA 75

Índice de cuadros

Cuadro 1. Lectinas relacionadas con la coagulación 17
Cuadro 2. Lectinas utilizadas en estudios de reproducción asistida 18
Cuadro 3. Lectinas e interacción con células cancerígenas. 22
Cuadro 4. Características de las ratas Sprague Dawley según su edad 32
Cuadro 5. Variables de estudio 35
Cuadro 6. Peso y longitud de órganos a los 9, 22, 43 y 57 días de las ratas tratadas con TBFL comparadas con grupo control. 43
Cuadro 7. Biometría hemática y química sanguínea de las ratas tratadas con TBFL (12 semanas de tratamiento) 46
Cuadro 8. Química sanguínea de las ratas tratadas con TBFL (12 semanas de tratamiento) 56
Cuadro 9. Biometrías hemáticas en sangre de las ratas adultas tratadas con TBFL vs control en un período de 6 semanas 61

Índice de figuras

Figura 1. Efecto de la FCL sobre la proliferación de células cancerígenas 34

Figura 2. Peso promedio de ratas jóvenes tratadas con FCL vs control 51

Figura 3. Longitud total promedio de ratas jóvenes tratadas con FCL vs control 51

Figura 4. Ingesta promedio (g /día) semanal de ratas jóvenes 51

Figura 5. Grosor de intestino delgado de ratas jóvenes tratadas con TBFL durante el tratamiento intermitente 54

Figura 6. Grosor de intestino grueso de ratas jóvenes tratadas con TBFL durante el tratamiento intermitente 54

Figura 7. Acinos pancreáticos (zona exocrina del páncreas) después de la administración de la FCL en esquema intermitente 56

Figura 8. Efecto de la FCL sobre el área de los acinos pancreáticos en un esquema de administración intermitente 57

Figura 9. Acinos pancreáticos (zona exocrina del páncreas) después de la administración de la FCL en esquema intermitente con tinción rojo oleoso y hematoxilina. 58

Figura 10. Pulpa blanca (zonas obscuras) y roja (zonas rojizas) del bazo después de la administración de la FCL en esquema intermitente. 59

Figura 11. Hepatocitos y triada portal del hígado después de la administración de la FCL en esquema intermitente. 60

Figura 12. Placas de Peyer en duodeno después de los 43 días de tratamiento 60

Figura 13. Inmunohistoquímicas para poder corroborar la reactivación de estas placas de Peyer 61

Figura 14. Peso promedio de las ratas tratadas con FCL en tratamiento sostenido durante 12 semanas de tratamiento 62

Figura 15. Promedio de longitud las ratas tratadas con FCL en un tratamiento sostenido durante 12 semanas de tratamiento. 62

Figura 16. Ingesta promedio (g /día) semanal de las ratas tratadas con FCL en un tratamiento sostenido durante 12 semanas. 63

Figura 17. Pesos relativos de órganos de ratas Sprague Dawley de 5 semanas de edad durante 12 semanas de tratamiento con FCL. 63

Figura 18. Longitud relativa de órganos de ratas Sprague Dawley de 5 semanas de edad durante 12 semanas de tratamiento con FCL. 64

Figura 19. Corazones de ratas tratadas durante 12 semanas con FCL. 64

Figura 20. Determinación de medidas de zonas del corazón de ratas tratadas durante 12 semanas con FCL 64

Figura 21. Actividad enzimática de tripsina, quimotripsina y elastasa en páncreas. 66

Figura 22. Peso promedio de ratas adultas tratadas con FCL vs control en un período de 6 semanas. 67

Figura 23. Ingesta de alimento, promedio por día representada en gramos y de manera semanal en ratas adultas. 67

Figura 24. Corazones de ratas adultas tratadas durante 6 semanas con FCL por 6 semanas. 67

Figura 25. Determinación de medidas de zonas del corazón de ratas adultas tratadas durante 6 semanas con FCL. 68

Figura 26. Peso relativo de los órganos de las ratas adultas. 69

Figura 27. Longitud relativa de los órganos de las ratas adultas. 69

Figura 28. Zona endócrina (Z.I.) y acinos pancreáticos de zona exocrina (Z.E) del páncreas tras la administración subcrónica de la FCL a las 6 semanas de tratamiento. 70

Figura 29. Actividad enzimática de tripsina, quimotripsina y elastasa en páncreas. 71

I. INTRODUCCIÓN

Las lectinas son proteínas 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-Díaz y col., 1999 y Priescaru, 2005). Presentan afinidades de acuerdo a la estructura de sus grupos proteico y glucosídico. El efecto resultante dependerá de su receptor o de su antígeno (Bencomo y col., 1985; Bird, 1988; Muñoz y col., 1993; Álvarez y col., 1996; García y col., 1999; García y col., 2001; Aguilar-García, 2004; Merlín y col., 2006;). La unión de las lectinas a diversas fracciones glucídicas, principalmente en células del tracto digestivo, provocan que la absorción de los nutrimentos disminuya por una reducción de la capacidad de los transportadores específicos de nutrimentos, por lo que son consideradas como factores antinutricios (Campion y col., 2008).

Las lectinas de los alimentos son capaces de resistir la digestión (Rhodes, 1999; Lajolo y Genovese, 2002; Ferriz- Martínez y col., 2015) ya que presentan una unión efectiva con los receptores de las membranas celulares epiteliales del intestino, además resisten la degradación por parte de las bacterias intestinales (Pusztai y Bardocz, 1996). Por dicha razón sobreviven al paso a través del tracto digestivo y permanecen en su forma biológica e inmunológica intactas (Rhodes, 1999; Lajolo y Genovese, 2002; Ferriz-Martínez y col., 2015). Se ha reportado que las lectinas se recuperan con sus propiedades integras después de pasar por el tracto gastrointestinal de ratones en un período de 24 h (Nakata y Kimura, 1985).

Las lectinas purificadas de leguminosas como son el frijol y la soya afectan el crecimiento de las ratas e inducen 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 cuerpo y del músculo esquelético, lípidos y glucógeno (Lajolo y Genovese, 2002).

El frijol Tépari es muy tóxico en su estado crudo causando gran pérdida de peso, utilización neta negativa de proteínas, pobre digestión de las mismas y la muerte de ratas y ratones al cabo de 10 días. Navarro y col. (1978) 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 fitohemaglutinina (Osman y col, 2003). En el estudio de la toxicidad aguda en ratas Sprague Dawley a las que se les administró una fracción concentrada en lectinas de frijol Tépari (FCL) por vía intragástrica, se observaron signos clásicos de toxicidad por lectinas con las dosis más altas probadas (300 y 2000 mg/kg de peso corporal) tales como diarrea, piloerección y aletargamiento, con total recuperación después de 48 h. No se observaron alteraciones histopatológicas en colon, intestino delgado, estómago, hígado, riñones, corazón, pulmones, timo y bazo. La dosis de 50 mg/kg de peso mostró buena tolerabilidad sin toxicidad sistémica y un efecto positivo sobre el número de leucocitos, por lo que se utilizó dicha dosis para el estudio de toxicidad subcrónica, en el que tampoco se observaron alteraciones (López-Sánchez y col., 2010). Resultados recientes sugieren que las lectinas de frijol Tépari resisten a la digestión ya que se encuentra actividad aglutinante en heces de ratas 24 y 72 horas posteriores a la administración de una dosis de 50 mg de una fracción concentrada en lectinas/kg de peso (Ferriz-Martínez y col., 2015). La FCL ha mostrado efecto inhibitorio de la tumorogénesis temprana en colon de ratas mediante la inducción de apoptosis (Moreno-Celis y col., 2017). Por lo anterior, existe interés por desarrollar una aplicación farmacológica utilizando lectinas de frijol Tépari contra cáncer de colon. Sin embrago, es necesario caracterizar los efectos adversos de la administración oral de estas lectinas a fin de conocer los daños que podría producir y si éstos son reversibles.

II. ANTECEDENTES

2.1 Frijol Tépari

El Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) es nativo del desierto de Sonora en Norteamérica. Es una leguminosa que se caracteriza por su alta resistencia a sequías, a sales, a plagas y se adapta perfectamente a zonas áridas y semiáridas. Además, tiene un ciclo de producción muy corto, sus semillas son de alta calidad proteínica, por lo cual ha sido utilizado para mezclarse con el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) para su mejoramiento (López-Soto y col, 2005). Es una leguminosa poco consumida por el humano ya que necesita prolongados tiempos de cocción. Posee compuestos antinutricios como inhibidores de proteasas, fitatos y lectinas, que son eliminados casi en su totalidad por cocción, lo que hace seguro su consumo. Las lectinas del frijol Tépari son encontradas en menor concentración que en otros frijoles, pero tienen mayor actividad hemaglutinante (González de Mejía y col, 1989; Osman y col, 2003). Tanto los taninos como los inhibidores de tripsina se encuentran en mayor cantidad en Frijol común que el frijol Tépari (Reynoso y col. 1988).

2.1.1 Lectinas como factores antinutricios

Las lectinas son proteínas 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-Díaz y col., 1999; González de Mejía y Priescaru, 2005). Presentan afinidades de acuerdo a la estructura que presentan en sus grupos proteico y glucosídico. El efecto resultante dependerá de su receptor o de su antígeno (Bencomo y col., 1985; Bird, 1988; Muñoz y col., 1993; Álvarez y col., 1996; García y col., 1999; García y col., 2001; Aguilar-García, 2004; Merlín y col., 2006;). La unión de las lectinas a diversas fracciones glucídicas, principalmente en células del tracto digestivo, provocan que la absorción de los nutrimentos disminuya por una reducción de la capacidad de los transportadores específicos de nutrimentos (Campion y col., 2008).

Las lectinas de los alimentos son capaces de resistir la digestión (Rhodes, 1999; Lajolo y Genovese, 2002; Ferriz-Martínez y col., 2015) ya que presentan una unión efectiva con los receptores de las membranas celulares epiteliales del intestino, además resisten la degradación por parte de las bacterias intestinales (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; Ferriz-Martínez y col., 2015). Se ha reportado que las lectinas se recuperan con sus propiedades integras después de pasar por el tracto gastrointestinal de ratones en un período de 24 h (Nakata y Kimura, 1985). Se ha observado que la aglutinina de soya en ratas se encuentra intacta en su forma libre en un 8% después de su administración (Lajolo y Genovese, 2002). Un estudio demostró que la mayor parte de frijol Kintoki, administrada a ratones mediante cánula intragástrica, se encontró en el tracto digestivo a niveles de 88.7%, 99.4%, 99.5% y 78.6% después de 0.5, 2, 5 y 24 h posteriores a la intubación, respectivamente (Hara y col., 1984). La Concanavalina A fue recuperada el 90% de esta en heces fecales de ratas a las 4 horas después de su administración oral (Nakata y Kimura, 1985).

En el caso de las lectinas del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) se ha encontrado que pueden interferir en la función intestinal causando cambios en el metabolismo como disminución de la glucosa, lípidos, vitamina B12 y de la disponibilidad del nitrógeno hierro y zinc (Welch y House 1984, Welch y Graham 2004; Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005). La soya reduce la producción de insulina de las ratas (Pusztai y Bardocz, 1996) afectando la salud del sujeto (The World Health Report, 2002). Además, las fitohemaglutininas dañan las paredes intestinales y causan sobrecrecimiento microbiano en el lumen principalmente de coliformes (Pusztai y col., 1993), también, reducen la tasa fraccional de síntesis de proteínas en músculo esquelético (Palmer y col. 1987, Bardocz y col., 1992) y además se sugiere que aparece una interrupción del borde en cepillo del enterocito, reduciendo tanto la viabilidad de las células epiteliales, como la hiperplasia en las criptas y aumento en el peso del tejido (Pusztai, 1991).

Entre las lectinas, la lectina PHA es peligrosa para la salud de los mamíferos y algunos autores refieren que la Arcelina, es considerada tóxica para algunos insectos (Osborn y col., 1988), mientras que α-AI, presente en todas las leguminosas, parece reducir la eficiencia de la utilización de proteínas y los lípidos de la dieta y retarda el crecimiento de las ratas (Pusztai y col., 1995). El tratamiento térmico aplicado a las semillas o harinas (es decir, cocción de frijoles para el consumo humano) desnaturaliza en gran medida a las lectinas y con ello su toxicidad (Antunes y col., 1980; Bender y Reaidi 1982). Aunque los riesgos de toxicidad aguda son bajas, la exposición prolongada a las lectinas en niveles bajos, puede ser perjudicial para la salud humana y animales monogástricos (Belmar Casso, 1998).

Las ratas alimentadas con *Phaseolus vulgaris* muestran cambios morfológicos incluyendo la hipertrofia del riñón, corazón, atrofia pancreática acinar, hígado graso y múltiples lesiones histológicas como es el caso de la atrofia del timo, ulceración del epitelio intestinal (Liener, 1989, Pusztai, 1989; Gueguen y col., 1993), necrosis del intestino (Herzing y col., 1997) atrofia muscular; modulación del sistema endocrino, aumento en el catabolismo proteico, lipídico y de carbohidratos corporales; inhibición del crecimiento e incluso produciendo la muerte (Pusztai, 1989). También se ha visto que las leguminosas *Erythrina poeppigianaand* y *Erythrina steyermarkii* tienen efectos mitogénicos (Quesada y col., 1998).

Las lectinas purificadas de frijoles o de soya afectan el crecimiento de las ratas e inducen 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 cuerpo y del músculo esquelético, lípidos y glucógeno (Lajolo y Genovese, 2002). Existen reportes de que la Concanavalina A, una potente lectina, tiene efectos depresores del consumo. Entre las leguminosas destacan por su alto contenido de lectinas *Psophocarpus tertanologobus*, *Canavalia ensiformis*, *Phaseolus lunatus* y *Vigna unguiculata*. Algunas lectinas son termolábiles y también

se ha demostrado su solubilidad en medios alcalinos (Ologhobo y col., 1993, D'Mello, 1995).

Estudios han reportado que el frijol Tépari es muy tóxico en su estado crudo causando pérdida de peso, utilización neta negativa de proteínas, pobre digestión de proteínas y la muerte de ratas y ratones al cabo de 10 días. Sotelo y col. (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 fitohemaglutinina (Osman y col., 2003). En el estudio de una fracción concentrada en lectinas (FCL) de frijol Tépari, la toxicidad aguda en ratas Sprague Dawley mostró signos clásicos de toxicidad por lectinas con las dosis más altas probadas (300 y 2000 mg/kg de peso corporal) tales como diarrea, piloerección y aletargamiento, dichas lectinas se podrían recuperar después de 48 h. No fue reportada ninguna alteración histopatológica en colon, intestino delgado, estómago, hígado, riñones, corazón, pulmones, timo y bazo. La dosis de 50 mg/kg de peso mostró buena tolerabilidad sin toxicidad sistémica, así como efecto positivo sobre el número de leucocitos, por lo que se utilizó dicha dosis para el estudio de toxicidad subcrónica, en el que tampoco se observaron alteraciones, excepto por pérdida en la ganancia de peso de hasta el 10% (López-Sánchez y col., 2010; Ferriz-Martínez y col., 2015). Resultados recientes sugieren que las lectinas de frijol Tépari resisten a la digestión ya que se observó actividad aglutinante en heces de ratas 24 y 72 horas posteriores a la administración de una dosis de 50 mg de una fracción concentrada en lectinas/kg de peso (Ferriz-Martínez y col., 2015).

2.1.2 Lectinas y toxicidad

Las leguminosas son relativamente tóxicas para el hombre y los animales debido, en parte, a la presencia de lectinas. Dichas proteínas representan una herramienta importante para la investigación estructural y funcional de carbohidratos complejos, para la evaluación de cambios a nivel de la superficie celular y para la identificación

de células de cáncer (García y col., 2005; Campion y col., 2009; García y col., 2009; Singh y col., 2012). Existen evidencias claras de que aparte de ser factores antinutricios, ciertas lectinas tienen efectos tóxicos que pueden llegar a ser letales, tal es el caso de la ricina que fue la primera lectina descrita en cuanto a la capacidad tóxica en humanos (Pita y col., 2004).

A mediados del siglo XIX, Wander y Waddell identificaron la toxicidad de un concentrado de los frutos de *Abrus precatorius*. Más tarde, Dixon también obtuvo un concentrado altamente tóxico de *Ricinus communis*. Fue hasta finales del siglo XIX que obtuvieron las primeras evidencias de la presencia de proteínas en los extractos de plantas con la habilidad de aglutinar eritrocitos a las que llamó hemaglutininas o fito-hemaglutininas. En 1888, Stillmark describió que los extractos de ricino y otros vegetales eran capaces de aglutinar eritrocitos de animales. En ese mismo año Hellín demostró que la abrina era una fracción tóxica hemaglutinante de *Abrus precatorius* (Pita y col., 2004; Singh y col., 2012). Tanto la abrina como la ricina fueron estudiadas por Paul Ehrlich en 1890 y fueron probadas como antígenos en estudios inmunológicos (Endo y Tsurugi, 1987; Vázquez-Luna y col., 2012).

Las leguminosas rara vez son consumidas por los humanos sin un previo tratamiento térmico. 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, González Mejía y Prisecaru, 2005; Hernández-Cruz y col., 2005). La muerte de los animales causada por las lectinas puede ser producida por diferentes mecanismos

que incluyen sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado, además de la acción de las lectinas sobre las células sanguíneas (Reynoso y col., 2003). Sin embargo, no todas las lectinas son tóxicas, esto es dependiente de la dosis y el tipo, mientras que otras como las de frijol rojo son altamente tóxicas y la gran mayoría es destruida por tratamientos térmicos (Rhodes, 1999).

a) Toxicidad de las lectinas: Estudios clínicos

Diferentes estudios epidemiológicos indican que el consumo de una dieta basada en vegetales se encuentra fuertemente asociada con una disminución en el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer. Esto se puede deber al hecho de que las plantas contienen numerosos componentes activos fitoquímicos lo cuales pueden alterar las vías bioquímicas asociados con la iniciación, promoción o progresión del cáncer (Prisecaru, 2005). La especificidad que posee las lectinas ha desencadenado numerosas aplicaciones en la ciencia de la medicina experimental básica utilizando diferentes rutas de administración (Hernández-Cruz y col., 2005). No obstante, es necesario considerar que la ingestión de éstas, algunas veces causen envenenamiento (Freed, 1999).

A pesar de que las lectinas tienen actividad antitumoral, presentan efectos adversos. La toxicidad de algunas lectinas se caracterizó por su capacidad de inhibir ribosomas y se clasifican en RIPs II. La ricina es una lectina tóxica que manifiesta efectos secundarios como gripa, fatiga, dolor muscular ocasionalmente náusea y vómito. Dicha sintomatología se presenta posterior a las 4-6 horas de la administración con una duración de 1 a 2 días. En el caso de la abrina se reportaron dos casos de muerte en la fase I de ensayos clínicos. En los pacientes se presentaron ataques generales y signos de toxicidad a nivel sistema nervioso central (Castillo y Adbullaev, 2005). La lectina del muérdago por otro lado causó en tres casos clínicos choque anafiláctico severo después de su administración de manera inyectada; dos de ellos presentaban cáncer y uno sujeto era propuesto para prevención de cáncer (Hutt y col., 2001).

b) Toxicidad de las lectinas: Estudios *in vivo*

- Administración inyectada

Las lectinas en los animales producen un efecto más dañino cuando se administran de manera inyectada que cuando son administradas de manera oral, debido a la propiedad hemaglutinante y comportamiento como antígeno para el cuerpo (Badui, 1993). La ricina, abrina, crotina y toxinas relacionadas producen lesiones patológicas macroscópicas y microscópicas similares. La intensa inflamación con destrucción de las células epiteliales, edema, hiperemia y hemorragias en los tejidos linfáticos son muy comunes. Algunos signos de toxicidad pueden incluir degeneración de grasa y necrosis hepática, lesiones degenerativas en el miocardio y la extensión y presencia de coágulos en los capilares de todos los órganos. En el sitio de la aplicación de la lectina frecuentemente se observan hemorragias locales. La ricina es más tóxica cuando se inyecta que cuando se administra oralmente. Después de haber sido administrada la ricina de manera intravenosa tanto el tejido y jugo intestinal de los conejos se vuelve altamente tóxico sugiriendo que se concentra en este tejido, sin embargo, no se detecta en orina. En lechones, la ricina si atraviesa la barrera y aparece en la leche de los cerdos que están lactando. En gatos se observó también que la ricina causa disminución de magnesio. En otro estudio en ratas alimentadas con soporte nutricional parenteral (NPT) se observó que la administración intravenosa de fitohemaglutinina (PHA) y de la aglutinina de cacahuate (PNA) revierte de manera consistente la atrofia gastrointestinal y el crecimiento pancreático asociado con la NPT (Jordinson y col, 1999).

Los efectos adversos más importantes producidos por la lectina de frijol Tépari se han observado en el timo y en el bazo. El timo presentó una disminución significativa de su peso mientras que el incremento en el tamaño del bazo concuerda con las observaciones previas realizadas por Reyes-Rocha (2011), al estudiar la toxicidad de las lectinas de lenteja y de chícharo vía intraperitoneal. El incremento en el peso del bazo pudiera deberse a un estímulo de linfocitos requerida para el sistema inmune reaccionando a la lectina. La dosis letal media (LD_{50}) observada para la

lectina de frijol Tépari administrada por vía intraperitoneal fue de 1100 y 1120 mg/kg peso corporal para ratones machos y hembras, respectivamente. En comparación con otras leguminosas como la ricina con una LD50 de 0.028 mg/kg peso, todo esto implica que la lectina del Frijol Tépari presenta menor toxicidad que la ricina, por lo tanto, se podría utilizar con más confiabilidad en estudios clínicos de cáncer (Reynoso y col., 2003). La inyección intraperitoneal del extracto crudo del Frijol Tépari presentó efectos crudos, sin embargo, al someterlo a autoclave se produjo una pérdida de la toxicidad por vía intraperitoneal (Osman y col., 2003).

- Administración oral

Se considera que la adherencia de las lectinas de plantas a las células del tracto gastrointestinal atrofia las vellosidades intestinales, también bloquean la absorción de nutrimentos, como el nitrógeno proteico, vitamina B12, minerales entre otros. Además, adelgazan las paredes de los intestinos haciéndolos más laxos y tienen una menor capacidad para realizar sus funciones (Banwell y col., 1983; Ros-Berruezo y col., 2010). En el caso extremo de toxicidad se provoca la muerte del animal tras la administración de lectinas, esto puede ser producido por diferentes mecanismos incluyendo la reducción de la disponibilidad de nitrógeno en el cuerpo, la inducción de la proliferación y sobrepoblación bacteriana en el intestino delgado, tiene efectos sobre las células sanguíneas e incluso en la inactivación de las proteínas de ribosoma (Banwell y col., 1983; Girbés, 2000). Para leguminosas como *Phaseolus vulgaris* se muestra una clara relación entre especificidad hemaglutinante y toxicidad dado que se muestra daño en el borde estriado de las vellosidades del duodeno y yeyuno e interfieren con la utilización de nutrimentos a nivel intestinal, inhibe la digestión de carbohidratos de la dieta y la absorción de glucosa en el intestino (Banwell y col., 1983; Ros- Berruezo y col., 2010).

Estudios *in vivo* en donde se administró la fitohemaglutinina del frijol purificada en la dieta de ratones se redujo el grado de crecimiento tumoral de una manera dependiente de dosis, sugiriendo una competencia por los nutrimentos 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 y col., 2003). Muchos de los efectos tóxicos son dependientes de la interacción con la flora intestinal, debido a que dichas lectinas son resistentes a la digestión, lo que puede causar lesiones e interferencias con la absorción de nutrimentos. Además, las lectinas pueden ser internalizadas y circular intactas en la sangre periférica (Rhodes, 1999).

La administración oral de la lectina PHA de frijol común en ratas, a dosis elevadas de 0.5-1 g /kg de peso corporal durante un período de 10 días, resultó en una pérdida de músculo esquelético de aproximadamente el 30%. Además se presentaron cambios atróficos en el timo y bazo y moderada reducción del 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 e indujo el crecimiento del epitelio del intestino delgado, hiperplasia de las criptas y síntesis de DNA (Díaz-González, 2010). 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 peso corporal) no presentó manifestaciones o efectos antinutricionales en los animales y condujo a un incremento hiperplásico reversible dosis-dependiente de la pared intestinal. Se ha observado que la exposición durante 3 días a la preparación cruda del frijol rojo, que contiene el 25% de lectina, afectó a cerdos provocando la disminución de crecimiento y algunos desarrollaron diarrea posterior a la primera administración, recuperándose a las 24 h (Radberg y col., 2001).

El estudio de una fracción concentrada en lectinas (FCL) de frijol Tépari administrada por vía intragástrica mostró un NOAEL de 50 mg/kg peso (López-Sánchez y col., 2010), no observándose efectos toxicológicos en los marcadores bioquímicos hepáticos, pancreáticos, hematológicos, e incluso histológicos. Lo anterior sugiere una buena tolerabilidad sin embrago, se ha observado disminución

en el consumo de alimento y pérdida de la ganancia de peso corporal hasta en un 10% (Ferriz-Martínez y col., 2015), lo que sugiere un efecto antinutricio.

c) Toxicidad de las lectinas: estudios *in vitro*

El efecto antitumoral por parte las lectinas están asociados a procesos antiproliferativos, de diferenciación, proliferación, apoptosis, necrosis y autofagia mediados por receptores de superficie. Los efectos bioquímicos que se han reportado de las lectinas de las plantas en las células malignas son la inhibición de la síntesis de DNA, RNA y proteínas (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005). Ciertas lectinas pueden producir mitogénesis de linfocitos, agregación de inmunoglobulinas e inducir la liberación de histamina desde los basófilos y mastocitos. La interacción célula y lectina se basa en la afinidad con los grupos glicosilados presentes en la membrana celular. Los cambios pueden influir en propiedades celulares tales como la agregación y deformación de eritrocitos, permeabilidad, resistencia eléctrica y propiedades de unión a mitógenos, hormonas y receptores de lipoproteínas (Díaz-González, 2010).

Estudios han mostrado una fuerte correlación entre ciertos modelos de unión y su acción biológica en varios tumores. En la lectina de trigo (WGA) induce citotoxicidad mediada por macrófagos en contra de las células de cáncer de vejiga T-24. La lectina de trigo, WGA, indujo condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y liberación del DNA, la cual es consistente con apoptosis (González de Mejía y Prisecaru, 2005). La actividad antitumoral de los monocitos sanguíneos puede ser inducida por la WGA, siendo capaces de producir citotoxicidad a 4 diferentes líneas celulares carcinoma de vejiga T-24, melanoma A-375, carcinoma renal ACHN y glioblastoma U373MG. Se han realizado estudios con aglutinina de haba VFA (*Vicia faba*) sobre la proliferación celular, la incorporación de aminoácidos y en la diferenciación de 3 líneas celulares derivadas de adenocarcinoma colorrectal (LS174T, SW1222 y HT29). En las 3 líneas se observó agregación e incremento en la diferenciación de las líneas celulares de una manera dosis-dependiente y

reversible que no está asociada a citotoxicidad con un aumento de incorporación de aminoácidos (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).

La FCL de frijol Tépari presentó efectos importantes sobre la proliferación celular de fibroblastos transformados 3T3/v-mos asociados a la presencia de una lectina en la fracción proteínica estudiada. Presenta un efecto citotóxico diferencia sobre células normales y cancerígenas en función de la concentración La FCL presenta efecto selectivo por líneas celulares de cáncer de colon CaCo2 y de cáncer de mama MCF-7 (García-Gasca y col., 2012).

2.2 Lectinas e interacciones celulares

La gran importancia de las lectinas se debe fundamentalmente a sus propiedades de reconocer y enlazarse específicamente a carbohidratos de membrana (Hernández-Díaz y col., 1999). El sitio de unión del carbohidrato en la mayoría de las lectinas de leguminosas involucra una combinación de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals (Linda y col., 2004). La estructura cuaternaria de las lectinas también puede contribuir al reconocimiento del glicano. La habilidad de cada subunidad de ligar azúcares individualmente puede llevar a la única unión cruzada de la estructura. Esta habilidad de formar estructuras tipo red, permite a las lectinas a formar interacciones complejas con las superficies de las células y glicoconjugados de la matriz que contienen sitios de unión múltiples que determinan la actividad biológica de las lectinas en las plantas, entre ellas (Albersheim y Anderson, 2007; Vázquez–Luna, 2012):

- La interacción con Gal-3 provoca mitosis celular.
- Laricina y abrina modifican químicamente a los ribosomas y promueven elongación de la pared celular en el piñón de la india.
- La interacción de lectina con manosa está vinculados con la defensa de plantas.
- Unión de bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas.
- Protección contra fitopatógenos.

- Regulación de mecanismos enzimáticos.
- Almacenamiento de nitrógeno
- Protección contra agentes antivirales.
- Poseen actividad mitogénica, germinación.
- Almacén de carbohidratos y glicoproteínas.
- Transporte.
- Movilización de sustancias de reserva.
- Elongación de pared celular.
- Regulación en el crecimiento.

En animales, las lectinas cumplen diversas funciones como (Hohl y Balsiger, 1988; Berg, 2002; Hernández-Cruz y col., 2005):

- Interacción de lectina de unión a manosa-manosa.
- Interacción reversible entre carbohidratos-lectinas
- Regulación de migración y adhesión celular.
- Endocitosis y traslocación intracelular de glicoproteínas.
- Reconocimiento de la adhesión no inmune en la fagocitosis.
- Reconocimiento y eliminación de glicoproteínas y del sistema circulatorio, así como células envejecidas, células tumorales, microorganismos mediante opzonización y la participación de células con actividad fagocítica.
- Reconocimiento para diferentes organogénesis.
- Migración de linfocitos.
- Factores determinantes de la metástasis.

2.2.1 Efecto de lectinas sobre eritrocitos.

Los eritrocitos están definidos por antígenos que son la cadena de carbohidratos unidos a ceramida que componen las glicoproteínas de la membrana de eritrocitos en la sangre. Los antígenos situados en la membrana de los hematíes reaccionan con los anticuerpos y el resultado de la reacción es la formación de grumos de hematíes o aglutinados. En una trasfusión sanguínea, la aglutinación del hematíe

degrada su membrana, hasta transformarla en un “grumo” el cual puede ser fagocitado por los macrófagos (Pusztai y col., 1987; Sharon y Lis, 2004). Los antígenos de los eritrocitos tienen las siguientes características:

- Grupo O. El Antígeno H (Grupo O) está compuesto por una galactosa, una acetilglucosa, una galactosa y una fructosa, unida a la ceramida en la primera galactosa.
- Grupo A. El Antígeno A (grupo A) está compuesto por el antígeno H y en la galactosa más externa tiene unida una acetilgalactosa.
- Grupo B. El antígeno B (grupo B), tiene la misma base del antígeno H, pero tiene unida una galactosa al final.
- Grupo AB. El grupo AB tiene antígenos A y B alternados a lo largo en su membrana y no posee antígenos H.

Existen antígenos adicionales, de manera que se pueden clasificar hasta 32 grupos sanguíneos. Todos los sujetos normales sintetizan un glucano central común, denominado antígeno O, que está unido a un esfingolípido. Un único locus genético codifica tres alelos comunes de una enzima glucotransferasa. El producto genético del alelo O carece de actividad enzimática, mientras que el producto génico del alelo A transfiere una porción N-acetilgalactosamina terminal y el producto génico del alelo B transfiere una porción galactosa terminal. La lectina obtenida de *Phaseolus lunatus* es capaz de aglutinar a los eritrocitos humanos Grupo A, la lectina de la semilla de *Lotus tetragonolobus* es específica para eritrocitos humanos Grupo O y la lectina de la semilla de *Bandeirma simplicifolia* es específica para los hematíes humanos Grupo B. El extracto de semilla de *Ulex europaus* ha sido utilizado ampliamente en los laboratorios como un reactivo para tipificar eritrocitos tipo O, para determinar subgrupos de A y AB y para identificar el carácter secretor de ciertos individuos (presencia de substancia H en saliva). La lectina obtenida de la semilla de *Dolichos biflorus* reacciona más intensamente con los glóbulos rojos del tipo Al que con los del tipo A, y esta circunstancia ha permitido su uso diagnóstico para identificar individuos del primer grupo. Otras lectinas de origen vegetal tienen una especificidad menos definida: los extractos de *Euonymus europmus* contienen anti-

B y anti-H, los de *Sophora japonica* aglutinan sangre del Grupo B más intensamente que la del Grupo A, en tanto que *Marasmius oreades* suministra extractos anti-B (Micucci, 1987).

Ciertas lectinas vegetales también poseen especificidad para otros sistemas de grupos sanguíneos humanos: extractos de *Bauhinia purpurea* y *Vicia gramínea* poseen actividad anti-N. También se ha comprobado la actividad de ciertos extractos de semillas frente a hematíes animales; las lectinas de semillas de *Dolichos biflorus* y *Phaseolus vulgaris* (anti-ABO) reaccionan frente a hematíes de cerdo, mientras que lectinas de *Utex eurpmus* y *Phaseolus lunatus* no lo hacen (Micucci, 1987; Pusztai y col., 1987; Sharon y Lis, 2004).

2.2.2 Efecto de lectinas sobre linfocitos

Las selectinas L (tipo de lectina endógena) presente en la superficie de los linfocitos se unen específicamente a los hidratos de carbono en el revestimiento de los vasos linfáticos nodos. La selectina L (CD62L) se expresa constitutivamente en la membrana de granulocitos, monocitos y la mayoría de los linfocitos de sangre venosa periférica. Al activarse estas células, la mayor parte de la selectina L es eliminada de la membrana mediante un mecanismo enzimático, el cual genera una forma soluble de la molécula, que es liberada al medio extracelular. Las galectinas participan en la regulación de la respuesta inflamatoria. Galectina 1 se expresa en el antígeno que estimula las células T, células B activadas y macrófagos (CITA). Las lectinas vegetales pueden provocar diferentes efectos sobre linfocitos (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005, Hernández-Cruz y col., 2005; Elifio-Esposito y col., 2007):

- Adhesión celular.
- Activa la señalización.
- Potenciación de las respuestas de los neutrófilos a otros estímulos.
- Estimulan la apoptosis.
- Mitosis.

- Efectos citotóxicos.
- Aglutinación.

2.2.3 Efecto de lectinas sobre plaquetas

Las selectinas P (lectinas endógenas) se unen específicamente a los carbohidratos en los ganglios linfáticos, el endotelio, o plaquetas activadas. La selectina P (CD62P) se expresa constitutivamente, pero es almacenada en gránulos intracitoplásmicos de plaquetas y células endoteliales. Al activarse estas células, la selectina P es translocada a la membrana plasmática, permitiendo la interacción con sus ligandos. Estas interacciones permiten la adhesión plaquetaria y, con ello, aumento del riesgo cardiovascular (Sában-Ruíz, 2012). El Cuadro 1 muestra el papel de lectinas sobre la coagulación.

Cuadro 1. Lectinas relacionadas con la coagulación.

Lectina	Especie de procedencia	Diana	Función
Mucetina	Trimeresurus mucrosquamatus	GPIb	Agonista plaquetario
Mucrocetina	Trimeresurus mucrosquamatus	GPIb	Aglutinante
Flavocetina A	Trimeresurus flavoviridis	GPIb	Antagonista plaquetario
Mumushigina	Agkistrodon halys blomhoffli	GPIb	Agonista plaquetario
Alboaggregina B	Trimeresurus albolabris	GPIb	Agonista plaquetario
Alboaggregina C	Trimeresurus albolabris	GPIb	
Aglucetina	Agkistrodon acutus	GPIb	Pro-aglutinante
Agkicetina	Agkistrodon acutus	GPIb	Antiaglutinante
Echicetina	Echis carinatus	GPIb/IgMk	Antagonista plaquetario
Agkistina	Agkistrodon acutus	GPIb	Antiaglutinante/Antagonista plaquetario

2.2.4 Efecto de lectinas sobre espermatozoides

La función de reconocimiento de los carbohidratos e membrana de espermatozoides permite el reconocimiento por el ovocito. Los carbohidratos de membrana de los espermatozoides son α-L-fucosa y N-acetil-glucosamina, estos

interaccionarán con las lectinas. El contenido de α-L-fucosa disminuye en los espermatozoides de cauda, lo que podría surgir como consecuencia de la acción de fucosidasas de esta región Los residuos de N-acetil-glucosamina se incrementan progresivamente en una población de espermatozoides, desde la cabeza a la cauda, por lo que se piensa que la enzima ß-NAG no cumplirían actividad catalítica alguna. Sin embargo, no se puede descartar la acción conjunta de otras glicosidasas, transferasas y/o proteasas que modifiquen los residuos en los espermatozoides. La interacción espermatozoide ZP es un proceso dependiente de carbohidratos, mediado por el ácido siálico con unión α2, 3 a N-acetil-lactosamina contenida en las glicoproteínas de la ZP de ovocitos de vaca. La interacción entre carbohidratos de membrana de espermatozoides y lectinas es irreversible y se conoce la acción de diferentes lectinas vegetales sobre este tipo de células. Las lectinas son útiles como marcadores de evaluación de la morfología espermática, del estado funcional de la población y para predecir su valor fecundante (Van Lis y Kalsbeek, 1973; Hafez, 1987; Velásquez y col., 2005; Montoya-Ureta y col., 2008). El Cuadro 2 muestra el papel de lectinas utilizadas en reproducción asistida.

Cuadro 2. Lectinas utilizadas en estudios de reproducción asistida.

Lectina	Localización	Secuencia oligosacarídica reconocida
Con A	Cannavalia enzyformis	α-D-glucosa y α-D-manosa
WGA	Triricum vulgaris	N-acetilglucosamina y ác. Siálico.
PNA	Arachis hypogaea	B-galactosa
SBA	Soja	N-acetil-D-galactosamina
DBA	Dolichos bilorus	Metil-2acetamina-2-desoxi-D-galactosa
PSA	Pisim sativum	Residuos de manosa
AAA	Anguilla anguilla	Restos de fucosa
LEA	Licopersicum esculentum	N-acetil-lactosamina
TPA	Tetragonolobus purpureus	Residuos de fucosa
UEA-I	Ulex Europaeus	Antígeno fucosilado H

2.2.5 Efecto de lectinas sobre bacterias

En las bacterias existen interacciones entre azúcares hidrofóbicos y aminoácidos aromáticos, tienen baja afinidad de unión a grupos de azúcares hidroxilados con enlaces de Van der Waals. La interacción reversible entre carbohidratos-lectinas permite mecanismos de patogénesis como adhesión, protección en la degradación proteolítica, incremento de solubilidad, protección del sistema inmunológico,

variación antigénica. Sin embargo, el uso de lectinas específicas permite el reconocimiento para su detección y eliminación, la determinación de la patogenicidad de baterías y de parásitos, el reconocimiento de determinantes no inmunes en la fagocitosis y el reconocimiento de determinantes de la adhesión celular. De esta forma, diversas lectinas constituyen una nueva área de diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades (Weis y Drickamer 1996; Berg y col., 2002; Annabel y col., 2005; Córdova Dávalos, 2009).

2.2.6 Efecto de lectinas sobre células tumorales

Las lectinas funcionan como marcadores de superficie para el reconocimiento de células cancerígenas, se adhieren a la célula, afectan la transducción de señales, causan citotoxicidad celular para posteriormente inducir apoptosis (Singh y Partha, 2012; Vázquez-Luna y col., 2012; Jiang y col., 2015). Para explicar el efecto antitumoral de las lectinas a nivel bioquímico y molecular, se proponen diferentes mecanismos de acción, incluida la inducción de apoptosis, citotoxicidad e inhibición de la proliferación tumoral. Estas acciones tienen que ver con el enlace de la lectina a los carbohidratos de membrana, a pesar de que este enlace es reversible y débil, los muchos sitios de unión dan como resultado un enlace fuerte (González de Mejía y Prisecaru, 2005). Se ha sugerido que el efecto de las lectinas sobre células cancerígenas está asociado con su habilidad para modular el crecimiento, la diferenciación, proliferación y apoptosis donde la mayoría de éstos está mediada por los receptores de superficie. Los efectos bioquímicos que se han reportado de las lectinas de plantas en células malignas son la inhibición de la síntesis de DNA, RNA y proteínas (Schumacher y col., 1995; Kiss y col., 1997).

Un primer mecanismo describe la unión de las lectinas a moléculas de adhesión de superficie (epCAM) que participan en una gran variedad de señales de traducción que son importantes para la regulación celular. Este es el caso de la aglutinina *Vicia fabba* (VFA), la cual estimuló la diferenciación de células de colon, pero cuya acción fue truncada por un anticuerpo monoclonal contra epCAM (González de Mejía y Prisecaru, 2005). Un segundo mecanismo sugiere que la lectina internaliza en la

célula y afecta el proceso celular fundamental para la división celular. Un tercer mecanismo explica que la lectina induce apoptosis por diversas vías (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005; Jiang y col., 2015): 1) Dependiente de la activación intracelular de la caspasa 8/FLICE, está vía requiere de la internalización de la lectina e involucra su actividad inhibitoria ribosomal y de la síntesis de proteínas; 2) A través de la activación de caspasa 3 y la ruptura de proteínas Poli (ADP-ribosa) polimerasas (PARP); 3) Por la activación de Bax (acelerador de apoptosis) y la inhibición tanto de Bcl-2 (supresor de apoptosis) como de telomerasas. Se ha propuesto que las lectinas inducen la muerte celular apoptótica a través de la desfosforilación de Akt en correlación con la inhibición de la actividad de la telomerasa y la activación de la caspasa 3 (Choi y col., 2004; Sasaki y col., 2014; Moreno-Celis y col., 2017).

También se ha observado que son capaces de estimular el sistema inmunológico, tal fue el caso de la lectina del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) que mostró una acción mitogénica sobre las células inmunitarias además de tener la capacidad de aglutinar las células malignas (Ferriz-Martínez y col., 2010). La lectina de la planta *Aralia elata* (aralina) proteína inactivadora de ribosomas Tipo II, se une a una lipoproteína de alta densidad HDL de 110 kDa que funciona como un receptor HDL, lo que induce la apoptosis en células cancerígenas transformadas con virus comparándolas con células no transformadas (Hiroko y col., 2014).

En estudios *in vitro* realizados en diferentes líneas celulares, entre ellas HT-29 de cáncer de colon y ZR-75-1 de cáncer de mama, han mostrado que la TBFL de frijol Tépari activa caspasa 3 y que la muerte celular no está relacionada con necrosis (datos no publicados). En células HT-29 se determinó que la TBFL provocó apoptosis en un 42.2% e incrementó la expresión de caspasa 3 y caspasa 9 pero una disminución de caspasa 8. La TBFL exhibió efectos antiproliferativos y proapoptóticos relacionados con una disminución de la señal de la proteína de la vía de transducción Akt en su forma activada y un aumento de la actividad de la caspasa 3, pero no a la activación de p53 (Moreno-Celis y col., 2017).

La activación de Akt controla la supervivencia celular a través de la fosforilación de las dianas que dependen de ella, con el resultado neto del incremento en la supervivencia celular, proliferación, crecimiento y metabolismo. Las dianas para la activación de Akt pueden ser clasificadas en tres grupos distintos: proteínas apoptóticas, factores de transcripción y proteína-quinasas. Akt fosforila directamente dos proteínas apoptóticas, BAD y caspasa 9, inhibiendo su actividad apoptótica y promoviendo por tanto la supervivencia celular. Los factores de transcripción pueden bien ser activados o inhibidos tras la fosforilación de Akt. Además, Akt activa el factor de transcripción NF-kB, HIF-la y CREB, lo que tiene como consecuencia un incremento en la transcripción de genes anti-apoptóticos (Pinzón y col., 2009). El Cuadro 3 muestra el efecto de diferentes lectinas sobre células cancerígenas (Castillo–Villanueva y Abdullaev, 2005; González de Mejía y Prisecaru, 2005; Ferriz-Martínez y col., 2010):

Cuadro 3. Lectinas e interacción con células cancerígenas.

Tipo de cáncer	Carbohidratos de superficie que interaccionan lectinas	Interacción entre diferentes lectinas y líneas celulares	Efecto
Vejiga	**ND**	Mistletoe lectin I--- Carcinoma de vejiga	• Antitumoral y citotóxico
Mama	GalNAcalpha1-Ser(Thr), Galectina -1, α distroglicano	Lectina *P. cyrtonema*: células MCF-7 Lectina hoja de mulberry: células MCF-7 TBFL frijol Tépari: células MCF-7 y ZR-75-1 Iscador Mistletoe—células de MAXF 401 NL Aglutinina de soya --- MCF7 SVL – Células T-47D WGA--- Células de cáncer de mama MCF7, T47D, HBL 100, BT 20	• Reconocimiento de la presencia de cáncer de mama. • Defectos en la adhesión celular • Apoptosis • Citotoxicidad
Melanoma	α distroglicano (Jasso *y col.,* 2012).	VCA (Viscum álbum, L coloratum): células de melanoma B16-BL6 Melanoma metastásico Concanavalina A: células de melanona humano A375 +Lectina *P. cyrtonema*: células de melanona humano A375 VCA--- Melanoma B16-BL6	• Defectos en la adhesión celular • Inhibición de proliferación dosis dependiente, con inducción de apoptosis. • Apoptosis • Autofagia • Antimetastásico • Inhibición de la angiogénesis

Leucemia	**ND**	Abrina – células T Kurokawa Mushroom ---Leucemia U937 Mistletoe lectin II--- Leucemia U937	• Citoaglutinación • Inhibición de proliferación
Cerebro	**ND**	DSA (Datura stramonium): C-6 glioma, U251, SNB-75, SNB-78.	• Inducción de diferenciación irreversible e inhibición de proliferación
Cervicouterino	α distroglicano	Concanavalina A: células HeLa Lectina *P. cyrtonema*: células HeLa Lectina *S. Flavescens:* células HeLa AMML: carcinoma celular humano y células HeLa TBFL frijol Tépari: células HeLa, SiHa y C33A AAL Agrocybe agerita AHL – células HT-29 Alocasia cucullata—células de SiHa ATL --- células de c SiHa ATL --- OVCAR-5 células de carcinoma de ovario Lectina con semillas de Mezquite--- células HeLa Mistletoe lectin II--- Células HeLa S3 SVL--- OVCAR-5 células de carcinoma de ovario PCL—HeLa Viscum álbum--- cáncer ovárico SVL – Células SiHa	• Defectos en la adhesión celular • Citotoxicidad • Autofagia • Apoptosis • Antiproliferativo
Próstata	Galectina-1, α distroglicano	SVL---Células de cáncer de próstata PC-3	• Defectos en la adhesión celular • Inhibición de la proliferación
Hígado	**ND**	VCA (Viscum álbum, L coloratum): Sk, Hep-1, Hep3B Concanavalina A: carcinoma hepatocellular Muérdago: carcinoma hepático humano Muérdago: carcinoma hepatocellular Aglutinina *Pinellia ternata*: células de hepatocarcinoma Bel.7404 VAA-I: células de Hepatocarcinoma SMMC7721 AHL – células HEP-2 Lectina Pleurotus ostreatus --- células H3B. Aglutinina de soya—Hepatoma Hep-G2 SVL--- Hep2 VCA--- Hepatocarcinoma SK-Hep-1	• Inhibición de la telomerasa. • Apoptosis • Autofagia • Activación de células NK
Estómago	α distroglicano	SWA (Triticum aestivum)--- mucosa celular gástrica PHA (Phaseolus vulgaris) --- Túbulo-vesículas de las células gástricas. PNA (Arachis hypogaea) --- Células parietales gástricas LCA--- Células mucoides gástricas. UEA --- Células mucoides gástricas. SNA--- Células mucoides gástricas.	• Defectos en la adhesión celular

Pulmón	**ND**	AHL – células A-549 Iscador- cáncer de pulmón Mistletoe- KM-110--- cáncer de pulmón VAA-1---- células A-549	• Inhibición de la proliferación • Inhibición de metástasis
Colon	GalNAcalpha1-Ser(Thr), α distroglicano	PHA- (*Phaseolus vulgaris*) : células de cáncer de colon LoVo, HCT-15, SW837 Con A: células de cáncer de colon (LoVo, HCT-15, SW837) WGA (*Triticum vulgare*): células de cáncer de colon LoVo, HCT-15, SW837 GSA (*Griffonia simplicifolia* I-A): células de cáncer de colon LoVo, SW837 ABL (*Agaricus bisporus* I): células de adenocarcinoma de colon humano HT-29 VFA (*Vícia faba*): Células de cáncer de colon humano LS174T, SW1222 y HT29. Lectina hoja de mulberry: células de HCT-15 TBFL frijol Tépari: CaCo2, HT-29 ABL- células cáncer de colon HT29 ATL --- células de cáncer de colon HT-29 SVL--- células de cáncer de colon SW-620 VFA ---células de adenoma colorectal LS174T, SW1222, y HT-29	• Interacción entre diferentes lectinas y líneas celulares • Reconocimiento dela presencia de cáncer de colon. • Inhibición del crecimiento a altas concentraciones. • Defectos en la adhesión celular. • Inhibición de proliferación sin citotoxicidad. Se internaliza y selectivamente bloquea la importación de proteínas nucleares dependientes de NLS a través de Orp-150 truncada. • Inhibición de proliferación no asociado a citotoxicidad, posible interacción con la molécula de adhesión epCAM. • Citotoxicidad • Apoptosis • Internalización • Importación de proteínas nucleares.

Otras lectinas como la Concavalina A, *Viscum album*, *P. cryrtonema*, *Phaseolus multifloorus* willd, *Pinellia ternata* aglutinina, Pea, Mulberry han mostrado mecanismo apoptótico en diversas líneas celulares como células de melanoma humano A375, células de leucemia U937, células de cáncer cervical HeLa, células de fibrosarcoma murina L929, células de hepatocarcinoma Bel-7404, Células de carcinoma de ascitis de Ehrlich (EAC) y células de cáncer de mama MCF-7. Además, existen otros mecanismos como son la autofagia provocada por ciertas lectinas como la del muérdago en carcinoma hepatocelular del hígado SK-Hep-1; Concavalina A en Gliastoma U87 y P. cryrtonema y en células de fibrosarcoma L929 (Jiang y col., 2015).

2.3 Efecto de lectinas del frijol Tépari sobre cáncer de colon

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en 2012 se le atribuyeron 8.2 millones de muertes. Los cánceres que causan un mayor número anual de muertes son los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. Se reporta una incidencia de 6,437 casos (5%) y una mortalidad 4,009 casos (5.2%) (Ferlay y col., 2010). En 2014, el cáncer de órganos digestivos presentó la tasa más alta de mortalidad por tumores malignos en la población de 20 años y más, siendo causal de 33 muertes por cada 100 mil habitantes. Por sexo, los fallecimientos aumentan a 35 en los hombres, mientras que en las mujeres son 31 (por cada 100 mil habitantes para cada sexo) (INEGI, 2017).

Lectinas de diferentes fuentes vegetales han mostrado efectos sobre cáncer de colon. Particularmente, la FCL de frijol Tépari presenta efectos sobre la proliferación y muerte celular de células de cáncer de colon. Estudios sobre distintas líneas celulares de cáncer humano han permitido determinar que la FCL induce apoptosis a través del aumento en la expresión de caspasas 3 y 9, sin que se presente efecto necrótico (datos no publicados). Para determinar el efecto de TBFL en células cancerosas humanas, se realizaron curvas de dosis-respuesta en células de cáncer de mama (MCF-7 y ZR-75-1), las células de cáncer de cervico uterino (HeLa, SiHa y C33-A) y las células de cáncer de colon (CaCo2). El efecto diferencial de la TBFL sobre la proliferación celular que está en función de la concentración y el tipo de célula. Las células del cáncer de cervico-uterino fueron los menos sensibles a TBFL (HeLa <SiHa <C33-A), seguido de células cancerígenas de mama. Las células del cáncer de colon fueron las más sensibles a la efecto antiproliferativo de la FCL con la IC_{50} más baja (García-Gasca y col., 2012) (Figura 1).

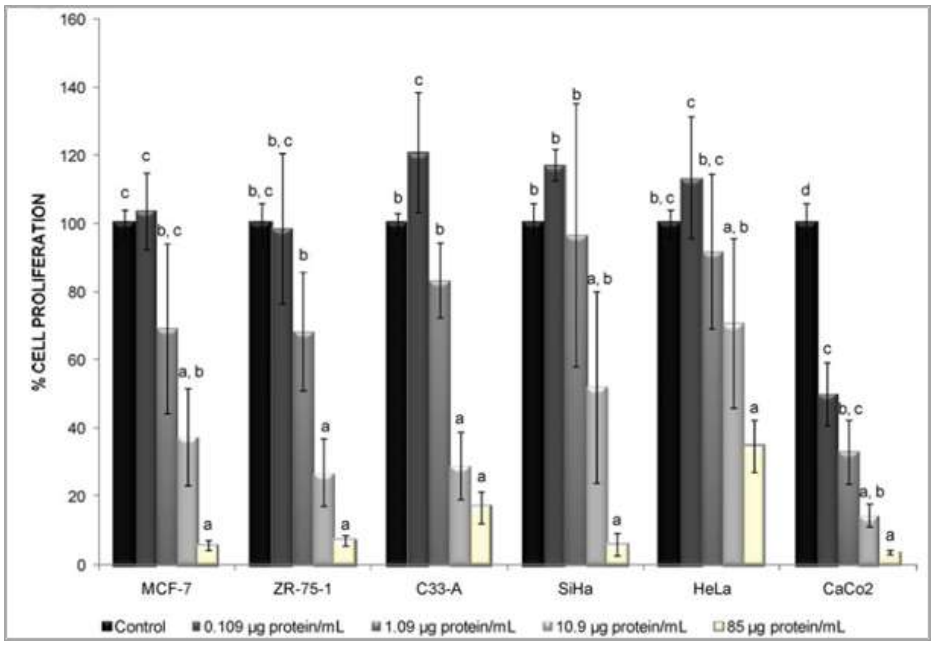

Figura 1. Efecto de la TBFL sobre la proliferación de células cancerígenas (García-Gasca y col., 2012).

Estudios *in vivo* en donde se administró a ratas Sprague Dawley dimetilhidrazina como inductor de cáncer de colon por vía intramuscular y posteriormente la FCL (50 mg/kg de peso) por 6 semanas mostraron que las ratas control no presentaron lesiones y solo un 8% con efectos inflamatorios. El grupo tratado con la FCL no presentó lesiones, pero sí un 33% de proceso inflamatorio. El grupo tratado con la dimetilhidracina presentó lesiones premalignas de bajo grado, premalignas de alto grado y neoplasias en un 50, 33 y 17 %, respectivamente. Para el caso del grupo tratamiento (DMH/FCL) el patrón de las lesiones se presentó de la siguiente manera: 23% tejido sin lesiones, 15% proceso inflamatorio, 15% lesiones premalignas de bajo grado, 31% lesiones premalignas de alto grado y un 16% de neoplasias. Lo anterior muestra que la FCL disminuyó en un 38% la formación de lesiones premalignas de bajo grado. (Moreno-Celis y col. 2017).

Cuando se utilizó azoximetano (AOM) como inductor de cáncer de colon se observó que el tejido sano teñido con hematoxilina-eosina presentó fosas cripticas formadas y las características propias del tejido colónico normal, el grupo tratado solo la FCL presentó zonas con incremento de actividad leucocitaria característico de procesos

inflamatorios del colon. En el grupo tratado con AOM se encontró proliferación displásica y pérdida de las estructuras características del epitelio en diferentes grados que representan los efectos producidos por el AOM, identificadas como fosas crípticas aberrantes. El grupo tratado con AOM/FCL, presentó las mismas características que el grupo anterior, sin embargo, se observó una disminución de los tejidos premalignos de bajo grado. Lo anterior sugiere que la FCL actúa en etapas tempranas del cáncer de colon y tiene efecto antiprofilerativo, sin embargo, no mostró tener efectos en estadios tardíos del cáncer (Moreno-Celis y col., 2017).

Con la finalidad de contar con la información necesaria para el diseño de un fitofármaco se han identificado los efectos adversos de la administración intragástrica de la FCL en diferentes esquemas de tratamiento en ratas sanas. Los esquemas probados han sido:

a) Esquema de tratamiento de tipo agudo, en donde a las ratas se les administró una sola dosis, registrando cualquier síntoma durante 14 días consecutivos. Los efectos frecuentes en las primeras horas de tratamiento fueron diarrea, piloerección e ictericia desapareciendo de inmediato. En este experimento se realizó la dosis-respuesta, encontrado los mínimos efectos adversos con la dosis de 50 mg/kg peso (NOAEL) (López-Sánchez y col., 2010).
b) Esquema subcrónico, consistió en administrar diariamente la FCL de manera intragástrica la dosis especificada de 50 mg/kg peso durante 28 días. Se observaron efectos sobre el sistema hematopoyético en cuanto a la diferencia significativa de la proporción de linfocitos: granulocitos de 70:30 referida en el grupo tratado comparándolo con la del grupo control 90:10, respectivamente. El incremento ligero de la pulpa blanca en bazo, refiriéndose a un incremento de linfocitos en el bazo (Ferriz-Martínez y col., 2015).
c) Esquema subcrónico consistió en administrar 50 mg/kg peso de la FCL de manera intragástrica durante 6 semanas en animales adultos jóvenes que ya finalizaron su desarrollo y crecimiento, cada tercer día fue la administración. Se observó pérdida de la ganancia de peso del 10% a partir de la segunda semana de los animales considerándose importante a comparación del control, aunado

a ello se encontró una disminución en la ingesta en donde a partir de la primera semana de tratamiento con FCL, pero con recuperación tras la quinta semana de tratamiento, mientras que a nivel sanguíneo no se encontró ninguna toxicidad (Ferriz-Martínez y col., 2015).

La información disponible permite determinar que las lectinas de frijol Tépari presentan efectos sobre la tumorogénesis temprana de colon, lo que las postula como posibles agentes terapéuticos. Sin embargo, se han observado efectos adversos que es necesario caracterizar. Se requiere conocer el efecto sobre los efectos adversos en animales jóvenes y adultos, así como también resulta importante estudiar si los efectos adversos son reversibles utilizando un esquema de administración intermitente.

III. JUSTIFICACIÓN

Nuestro equipo de trabajo ha mostrado que una fracción concentrada en lectinas del Frijol Tépari (FCL) presenta efecto citotóxico sobre células de cáncer de colon. El efecto in vivo ha mostrado que la administración intragástrica de 50 mg/kg de peso cada tres días por seis semanas inhibe la tumorogénesis colónica temprana en ratas. La FCL no presenta toxicidad sistémica, pero si efectos adversos que son necesarios caracterizar. Por lo anterior, es necesario conocer los efectos sistémicos y locales en ratas de diferentes edades, por lo que en el presente estudio se consideraron ratas más jóvenes y adultas maduras que pudieran presentar mayor susceptibilidad a los efectos antinutricios por parte de la FCL, así como saber si los efectos adversos son reversibles.

IV. HIPÓTESIS

La administración intragástrica de la FCL presenta efectos adversos locales en ratas SD, en función de la edad y del esquema de administración por vía oral.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar los efectos adversos sistémicos y/o locales y remanentes, tras de la administración intragástrica de la FCL del frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*), en ratas SD de diferentes edades.

Objetivos específicos

1. Determinar los efectos adversos generales de la administración de la FCL intragástrica en ratas en desarrollo y adultas maduras, bajo un esquema de administración intragástrica cada tercer día por 6 semanas.
2. Determinar los efectos adversos remanentes de la administración de la FCL vía intragástrica en ratas en desarrollo en desarrollo bajo un esquema de administración intermitente a mayor plazo.
3. Determinar los efectos adversos generales de la administración de la TBFL vía intragástrica en ratas en desarrollo bajo un esquema de administración sostenido a mayor plazo.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Obtención de la fracción concentrada en lectinas de frijol Tépari

La harina se obtuvo mediante la trituración de las semillas de frijol Tépari en un molino Tekmar modelo A-10 Analytical mill, se desgrasó con una mezcla de cloroformo-metanol 2:1 en una proporción 4:1 p/v con agitación por 15 min y después se filtró al vacío, este proceso se repitió 2 veces más. Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente en una campana de extracción. Se pesaron 100 g de harina y se mezclaron con 500 mL de agua desionizada, se dejó en agitación durante 12 h a 4º C o a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó en una centrífuga Bekman JU2 con rotor JA-20 a 39,200 g, durante 60 min para obtener el extracto crudo y se determinó la actividad aglutínate de cada uno.

Después de haber determinado el mejor solvente para la extracción, se recuperó el sobrenadante y se realizó una precipitación secuencial con sulfato de amonio, inicialmente se realizó una precipitación al 40% de saturación con sulfato de amonio, con agitación lenta por 30 min y se dejó equilibrar por 30 min a 4º C, posteriormente se centrifugó a 39,200 g durante 60 min. El sobrenadante se llevó a 60% de saturación con sulfato de amonio con agitación lenta por 30 min y se dejó equilibrar por 30 min a 4º C. Posteriormente se centrifugó a 39,200 g durante 60 min, se recuperó el precipitado (P60) y se desechó el sobrenadante. La fracción P60 se resuspendió en un volumen mínimo de agua desionizada, para ser dializada en membrana de 3 kDa de tamaño de poro hasta la eliminación total de sales. Para eliminar partículas suspendidas se centrifugó y se prepararon alícuotas de 4 mL que se cargaron en una columna de 167 x 1.7 cm para filtración en gel con Sephadex G-75 (Pharmacia Biotech; Uppsala, Suiza), dicha columna se equilibró con buffer de bicarbonato de amonio 0.01 M (pH 7.8). El experimento se realizó a 4° C y las fracciones fueron recolectadas a una velocidad de 0.3 mL/min, con la misma solución amortiguadora. El volumen colectado en cada fracción fue de 4 mL y a cada fracción se le midió absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-65. Las fracciones que indicaron presencia de proteínas se sometieron a un

análisis de actividad aglutinante para colectar sólo las fracciones con actividad de lectina (Jaffé, 1980).

6.2 Diseño de la investigación

Se trató de un estudio longitudinal, prospectivo y experimental. Se utilizaron ratas Sprague Dawley sanas de 5 y 25 semanas de edad adquiridas en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (INB-UNAM) y colocadas en cajas individuales con agua y alimento *ad libitum*. El alimento utilizado fue Rodent Laboratory Chow 5001 (Saint Louis, MO, USA). Los animales tuvieron una semana de aclimatación con un ciclo circadiano ajustado a 12 h luz/ 12 h obscuridad, a 21-23° C con una humedad relativa de 30%. El protocolo experimental fue basado en los estándares oficiales mexicanos de acuerdo a la Norma Oficiala Mexicana 062 y aprobado por el comité de bioética de la FCN-UAQ.

De acuerdo a las características de las ratas Sprague Dawley según su edad, se deben considerar los siguientes aspectos:

Respecto a ratas, tanto los parámetros bioquímicos, la línea de crecimiento, la ganancia de peso, son distintos de acuerdo al tipo, edad y sexo de la rata. Estos efectos tendrán que ser comparados con sus respectivos cuadros de acuerdo a la edad para concluir que hay un efecto inmediato o remanente. Las condiciones que se sugieren para medir los efectos remanentes en el presente estudio dependerán de la edad las ratas, debido a que se presentan diferentes procesos biológicos a través de las etapas de la vida, como la madurez sexual, la pubertad, la adultez, los cambios hormonales, la gestación y el decaimiento de las funciones biológicas. La susceptibilidad a las sustancias naturales o químicas dependerá de cada sujeto, encontrándose algunos signos y síntomas de manera similar en ambos sexos, como distensión abdominal, diarrea, alergia, piloerección, aletargamiento, entre otros. Si la condición de la rata fuera de enfermedad, la administración de alguna sustancia provocaría su mejoría en sujetos experimentales o en el caso negativo fallaría el tratamiento e incluso se observarían efectos negativos e incluso letales (Ruiz Bedolla y Fuentes Peña, 1996; Alemán y col., 1997; León-Goñi y col., 2011; Taconic

Biosciences; Ferriz-Martínez y col., 2015). En el presente estudio, las ratas Sprague Dawley fueron machos sanos lo cual implica una condición importante para observar efectos positivos o negativos exclusivos de las lectinas del Frijol Tépari. Sus condiciones fisiológicas se explican en el Cuadro 4 (Alemán y col., 1998).

Cuadro 4. Características de las ratas Sprague Dawley según su edad.

Ratas menores de 6 meses (Adulto joven sin completar su crecimiento)	Peso al nacimiento: 5-6 g Edad del destete: 21 días Peso del destete: 35-40 g Edad pubertad: 45-75 d (5- 10 semanas) 5+6= 11 Peso adulto: 250-400 g Descenso testicular 15-50 días Madurez sexual 40-60 días (8 semanas)
Ratas de 6 a 18 meses (Adulto que ha completado su crecimiento y se encuentra en la madurez)	100-300 días fertilidad hembra (13-40 semanas) presente estudio: 25-31 semanas Gestación: 22- 24 días Lactancia No vomitan, ni regurgitan
Ratas de 18 a 32 meses (Adulto que sobrepasa la madurez, llegando a 80% de la expectativa de vida)	Celo 12-18 meses ratas (48-72 semanas) La ganancia de peso de órganos en ratas esta principalmente asociada con la deposición de grasa. Incremento en la incidencia de lesiones neoplásica. Lesiones histopatológicas Muerte

6.2.1 Experimentos biológicos

Experimento 1. Efecto de la administración intragástrica de FCL a largo plazo-intermitente en ratas Sprague Dawley jóvenes. Se utilizaron 144 ratas macho Sprague Dawley (SD) jóvenes de 5 semanas de edad (n=72 ratas por grupo). El grupo control fue administrado con solución salina por vía intragástrica cada tercer día por 6 semanas, se dejaron 2 semanas de descanso y se administraron por 6 semanas más. El grupo tratado con la FCL fue administrado bajo el mismo esquema con 50 mg FCL/kg de peso corporal. Los animales fueron sacrificados por decapitación a los días 1, 9, 22, 43, 57 y 100. El día 43 correspondió al término de las primeras 6 semanas de tratamiento, el día 57 correspondió al término de las dos

semanas de descanso y el día 100 correspondió al término de las segundas 6 semanas de tratamiento.

6.2.2 Experimento 2. Efecto de la administración intragástrica de FCL en animales jóvenes a largo plazo. Se utilizaron 12 ratas Sprague Dawley (SD) hembras adultas de 5 semanas de edad que fueron aleatorizadas para formar 2 grupos por edad (n=6 ratas por grupo). Las ratas control recibieron solución salina por vía intragástrica cada tercer día durante 12 semanas mientras que el grupo tratado con la FCL recibió 50 mg FCL/kg de peso corporal. La ingesta alimentaria fue determinada pesando el alimento dos veces a la semana durante todo el tratamiento, calculando el promedio de ingesta por día, también los animales fueron pesados cada semana en una balanza específica para roedores. Los animales tanto jóvenes como adultos fueron sacrificados al finalizar las 12 semanas de tratamiento por decapitación recolectando su sangre y órganos para pruebas posteriores.

Experimento 3. Efecto de la administración intragástrica de FCL en animales adultas maduras en esquema a corto plazo. Se utilizaron 12 ratas Sprague Dawley (SD) de 25 semanas de edad que fueron aleatorizadas para formar 2 grupos por edad (n=6 ratas por grupo). Las ratas control recibieron solución salina por vía intragástrica cada tercer día durante 6 semanas mientras que el grupo tratado con la TBFL recibió 50 mg TBFL/kg de peso corporal. La ingesta alimentaria fue determinada pesando el alimento dos veces a la semana durante todo el tratamiento, calculando el promedio de ingesta por día, también los animales fueron pesados cada semana en una balanza específica para roedores. Los animales tanto jóvenes como adultos fueron sacrificados al finalizar las 6 semanas de tratamiento por decapitación recolectando su sangre y órganos para pruebas posteriores.

En todos los experimentos se siguió la siguiente metodología:

a) La ingesta alimentaria fue determinada pesando el alimento dos veces a la semana durante todo el tratamiento, calculando el promedio de ingesta por día. Al finalizar los tratamientos las ratas fueron sacrificadas por decapitación y su sangre fue colectada en tubos vacutainer con y sin anticoagulante. Para obtener el suero

se centrifugó el paquete sanguíneo a 1500 g, durante 15 min y fue almacenado a -80° C hasta ser usado para la determinación de algunos parámetros bioquímicos. Los tubos vacutainer con $EDTAK_2$ con el paquete globular de las ratas fueron utilizados para la determinación de biometrías hemáticas utilizando el equipo (CellDyn® 1600) mientras que los tubos vacutainer con gel separador fueron empleados para obtener únicamente el suero de las muestras, éste se centrifugó a 1500 g, durante 15 min y fue almacenado a -80° C hasta ser usado para la determinación de algunos parámetros bioquímicos.

b) Los marcadores sanguíneos determinados en el suero fueron urea sérica (Marca Catalogo No. 283-17), α- amilasa (Marca Catalogo No. 341-10), insulina (Merck, EZRMI-13K, E.U.), marcadores para detectar función renal y pancreática respectivamente. Además se determinaron proteínas totales (Marca Catalogo No. 200-55), creatinina sérica (Marca Catalogo No. 221-30) y albúmina sérica (SL ELITech, Clinical Systems, Francia, Catalogo No. ALBU-0600) considerándose marcadores para detectar el estatus nutricional; glucosa (BS-120 Chemistry Analyzer) marcador metabólico y alanina aminotransferasa (ALT, Elitech, Catalogue No. 318-10).

c) Peso y longitud de órganos: El hígado, riñones, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, timo y bazo fueron separados y pesados en una balanza analítica de laboratorio con una precisión de 300g x 0.0001g. Además, fueron medidas las longitudes de intestino delgado y grueso con una cinta de fibra de vidrio (Dry Mark). El peso y longitud de los órganos fue ajustado por el peso corporal individualmente y se normalizaron respecto al promedio del grupo control.

d) Evaluación histopatológica: El páncreas, intestino, bazo e hígado fueron fijados en formalina al 10% en PBS y teñidos con eosina-hematoxilina, para su posterior análisis histológico usando la técnica de Hematoxilina-Eosina, para su posterior análisis en el microscopio (Microscopio invertido Axiovert A1 Zeiss) utilizando el analizador de imagen IMAGEJ.

e) Adicionalmente, en el caso de las ratas adultas se determinó la de actividad enzimática de páncreas. Los páncreas de las ratas del grupo control y tratadas con TBFL de frijol Tépari fueron conservados en nitrógeno líquido y almacenadas -70°

C. Posteriormente se cortó con bisturí y se pesó la cantidad de 0.1 g de muestra para luego tratarse con Tris HCL pH 8 0.1 M, después se sonicaron durante 5 minutos, y finalmente se centrifugaron a 15,000 rpm, 30 min a 4°C. Se realizó cuantificación de proteína por el método de micro-Bradford (Bradford, 1976). Para determinar la actividad enzimática de los páncreas se utilizó como sustrato a tripsina y quimotripsina utilizando 1 mg/ml. Se determinó la actividad enzimática mediante espectrofotometría (405 nm) (Técnica modificada de Rey y col., 2015). Los experimentos se realizaron por triplicado.

f) Inmunohistoquímica: La detección de IL-6, TNFα y NFKb *in situ* en placas de Peyer del tejido intestinal de rata se realizó por Inmunohistoquímica por el método de la peroxidasa con anticuerpos específicos (Santa Cruz, CA). Se eliminó la parafina de las muestras de las placas de Peyer en el horno a 54°C durante 45 min y se hidrataron en xileno, alcohol al 100%, alcohol al 90%, alcohol al 80% y agua destilada durante 20 minutos. Posteriormente las laminillas se incubaron con una solución de peróxido al 3% en metanol absoluto (1:9 volumen/ volumen) durante 30 minutos, para eliminar la actividad de peroxidasa endógena. Los sitios de pegado inespecífico se bloquearon con anticuerpos provenientes leche Svelty durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los tejidos se incubaron por 24 horas a 4° C con el anticuerpo anti IL-6 de cabra policlonal IgG HPR (Santa Cruz, CA), Rabbit NFKb policlonal antibody IgG HPR (Invitrogen, Termo fisher), y anti TNFα Antibody (H-156) en conejo IgG HPR; diluidos a una concentración (1:2000). Los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario biotinado correspondiente en cabra anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology, CA, EU) o en conejo anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology, CA, EU) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se empleó el complejo avidina-peroxidasa, con el que se incubó por una hora a temperatura ambiente. La reacción se desarrolló empleando una solución de 6 mg de diaminobencidina en 10 mL de Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4 y 10 µL de H_2O_2 al 30% durante 10 min. Esta reacción produjo un precipitado de colores sepia en las células inmunorreactivas. Las muestras se contra-tiñeron con hematoxilina de Harris y se deshidrató el tejido con alcohol al 96%, alcohol absoluto, solución de alcohol

absoluto/xileno (v/v), xileno y se montaron con resina. Las laminillas fueron analizadas a 10x.

En el Cuadro 5 se muestra la descripción de las variables estudiadas.

Cuadro 5. Variables de estudio

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	REGISTRO	UNIDAD DE MEDICIÓN	TIPO	EFECTO GENERAL	EFECTO ESPERADO
Peso	Es un parámetro reproducible de crecimiento y un buen índice del estado nutricional agudo y crónico.	Semanal	Gramos	Cuantitativa continua	Antinutricio Adverso Inmediato o remanente	Disminución o mantenimiento en el peso de las ratas tratadas con TBFL vs el grupo control
Ingesta de alimento	Acción de introducir un alimento o bebida u otra cosa en la boca para digerirlo.	Cada tercer día	Gramos	Cuantitativa continua	Antinutricio Adverso Inmediato o remanente	Disminución o mantenimiento en la ingesta del grupo tratado con TBFL vs el grupo control.
Peso de órganos	Es un parámetro reproducible de crecimiento o disminución de algún órgano.	Al sacrificio	Gramos	Cuantitativa continua	Antinutricio Adverso Remanente Toxicológico	Disminución o incremento del peso de ciertos órganos.
Longitud de órganos	Es un parámetro de crecimiento basado en la longitud de órganos.	Al sacrificio	Centímetros	Cuantitativa continua	Antinutricio Adverso Remanente	Disminución o incremento de la longitud de ciertos órganos.
Nivel de Glucosa sanguínea	Es la fuente primaria de carbono para la obtención de energía a todo el cuerpo. Medida estática de la glucosa en sangre.	Quincenal	43.0-152.7 mg/Dl	Cuantitativa	Sistémico	Disminución o mantenimiento en la concentración de Glucosa de las ratas tratadas con TBFL vs el grupo control
Creatinina sérica	En suero es un producto de degradación de la creatina, una parte importante del músculo.	Al sacrificio	0.32-0.71 mg/dL	Cuantitativa	Antinutricio Remanente o inmediato	Mantenimiento de los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Albúmina	Proteína que transporta muchas moléculas pequeñas (bilirrubina progesterona, medicamentos entre otros). Es fundamental para el mantenimiento de la presión oncótica, necesaria para la distribución correcta de los líquidos corporales entre el compartimento intravascular y el extravascular, localizado entre los tejidos.	Al sacrificio	2.63-4.59 mg/dL	Cuantitativa	Antinutricio Sistémico Corto y largo plazo	Disminución de la concentración de Albúmina de las ratas tratadas con TBFL vs el grupo control.

ALT	Unidades enzimáticos de Alanina aminotransferasa que cataliza: Alanina + α-Cetoglutarato ⇔ Piruvato + Glutamato	Al sacrificio	26.32-68.5 UI/L	Cuantitativa	Toxicológico Remanente o inmediato	Mantenimiento de los valores normales de las pruebas hepáticas en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Urea	Mide la concentración de urea o nitrógeno ureico presente en la sangre. Es el resultado final del metabolismo de las proteínas. Se forma en el hígado a partir de la destrucción de las proteínas.	Al sacrificio	38.0-63.3 mg/dL	Cuantitativa	Toxicológico Sistémico	Mantenimiento de los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
α-amilasa	Denominada también sacarasa o ptialina, es un enzima hidrolasa que tiene la función de catalizar la reacción de hidrólisis de los enlaces 1-4 del componente α-amilasa al digerir el glucógeno y el almidón para formar azúcares simples. Se produce principalmente en las glándulas salivales (sobre todo en las glándulas parótidas) y en el páncreas.	Al sacrificio	2 U/L No hay valores normales reportados	Cuantitativa	Toxicológico Sistémico Remanente	Mantenimiento de los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Proteínas Totales	Tiempo de protrombina. Es un examen de sangre que mide el tiempo que tarda la porción líquida de la sangre (plasma) en coagularse	Al sacrificio	10- 13 segundos	Cuantitativa	Toxicológico Adverso	Mantenimiento o incremento de los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Hemoglobina	Es una proteína que transporta oxígeno en los eritrocitos, compuesta por aminoácidos y un compuesto heme. El heme contiene átomos de hierro y pigmento de porfirina. Cada eritrocito contiene aproximadamente 300 millones de moléculas de hemoglobina. Proteína tetramérica de los eritrocitos que transporta oxígeno y CO2 en el grupo hemo, el cual está constituido de un anillo tetrapirrólico y un átomo de hierro	Quincenal	12.31-15.18 mg/dl	Cuantitativa	Antinutricio	Mantenimiento o disminución de los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Hematocrito	Es el porcentaje de eritrocitos en un volumen	Al sacrificio	33.9-48.5 %	Cuantitativa	Antinutricio	Mantenimiento o disminución de los valores normales en

	determinado de sangre entera.					ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Conteo de eritrocitos (RBC)	Es la cantidad total de eritrocitos circulante. Estos acarrean el O2 de los pulmones hacia los tejidos orgánicos y transferir el CO2 de tejidos de los pulmones.	Al sacrificio	6.06-7.74x 10^6/µL	Cuantitativo	Sistémico	Mantenimiento de los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Volumen globular medio (VGM)	Se asocia al tamaño de los eritrocitos. Es la descripción de las dimensiones de la célula individual, es el mejor índice para clasificar las anemias, Indica cuando el eritrocito se presenta en forma normicitica, microcíica o macrocítica.	Al sacrificio	56.9-62 fL	Cuantitativo	Sistémico Antinutricio Adverso	Mantenimiento de los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Cuenta de leucocitos (WBC)	Glóbulos blancos. Combaten infecciones mediante fagocitosis contra invasión de microorganismos, distribuyendo anticuerpos.	Al sacrificio	5.04-12.36 x 10^3/µL	Cuantitativo	Sistémico Adverso	Mantenimiento o incremento de los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Neutrófilos	Son los más abundantes y el más importante en la reacción del organismo a la inflamación.	Al sacrificio	2-13.85%	Cuantitativo	Sistémico Adverso	Mantenimiento de los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Monocitos	Segunda línea de defensa del organismo, células más grandes de la sangre.	Al sacrificio	0-2%	Cuantitativo	Sistémico Adverso	Mantenimiento o incremento de los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Eosinófilos	Células capaces de fagocitar, activos en las reacciones alérgicas e infecciones parasitarias.	Al sacrificio	0-1%	Cuantitativo	Sistémico Adverso	Mantenimiento o incremento los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Basófilos	Son fagocitos y contiene heparina, histaminas y serotonina. Combaten discrasias sanguíneas y enfermedades mieloproliferativas.	Al sacrificio	0.09-0.4%	Cuantitativo	Sistémico Adverso	Mantenimiento o incremento de los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Cuenta plaquetaria (trombocitos)	Son células sin núcleo en forma de disco, que participan en la formación del coagulo hemostático, retracción del coágulo, activación de factores de coagulación.	Al sacrificio	446-852 x 10^3/µL	Cuantitativo	Sistémico Adverso	Mantenimiento o disminución de los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).

Proteínas totales	Mide la cantidad total de dos clases de proteínas encontradas en la porción líquida de la sangre: albúmina y globulinas.	Al sacrificio	5.45-7.67 g/L	Cuantitativo	Antinutricio	Mantenimiento o disminución de los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Bilirrubinas en orina*	Es un pigmento amarillento que se encuentra en la bilis, un líquido producido por el hígado, en orina.	Interpretación: Tira positiva Enfermedades hepáticas	Ausencia (0) Presencia (1)	Dicotómica	Sistémico Adverso	Mantenimiento de los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Glucosa en orina*	Es la fuente primaria de carbono para la obtención de energía a todo el cuerpo en la orina.	Su aparición en orina puede deberse a 2 factores: Disminución de reabsorción tubular Niveles sangre que superan el umbral renal como Diabetes	Ausencia (0) Presencia (1)	Dicotómica	Sistémico Adverso	Mantenimiento de los valores normales en ambos grupos (tratados con TBFL y grupo control).
Tipo de evacuaciones	Es la forma de las heces esto depende del tiempo que pasan en el colon.	Registro de cada tercer día, en base a la escala de Bristol (Minguez-Perez, 2009)	1.Estreñimiento 2. Diarrea 3. Heces con sangre 4. Heces con grasa	Categórica	Adverso	Consistencia dura o blanda.
Diarrea	Es la deposición, tres o más veces al día (o con una frecuencia mayor que la normal para la persona) de heces sueltas o líquidas.	Registro cada tercer día.	Ausencia (0) Presencia (1)	Dicotómica	Adverso Secundario	Presencia o ausencia
Piloerección	Pelos que se erizan debido a la acción de los músculos erectores del pelo, llamados piloerectores o pilomotores.	Registro cada tercer día.	Ausencia (0) Presencia (1)	Dicotómica	Adverso Secundario	Presencia o ausencia

6.3 Análisis estadístico.

Las diferencias entre tratamientos fueron analizados mediante 3 tipos de pruebas estadísticas: una prueba paramétrica t-student para muestras independientes, una

prueba multivariada t-Hotelling y una regresión multinivel para medidas repetidas, usando el software STATA versión 12. Se realizaron pruebas t de student para muestras independientes, control/tratamiento (biometrías hemáticas, marcadores sanguíneos, pesos y longitudes relativas de los órganos). La prueba multivariada t-Hotelling se utilizó para explicar el efecto que tiene la FCL con todas las variables explicativas (peso y longitud de órganos, biometría hemática, marcadores sanguíneos) en un solo modelo. Las regresiones multinivel se realizaron para las variables con datos agrupados y/o anidados por sujeto a través del tiempo, debido a que no se pueden utilizar procedimientos estadísticos que asumen independencia de las observaciones, donde se incluye la semana de la medición y el grupo (tratamiento/control) como variables independientes, así como una variable interacción que indicaría si la alteración del peso/ingesta/longitud a través del tiempo es distinto entre los grupos ($p<0.05$).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Experimento 1. Efecto de la administración intragástrica de la FCL a largo plazo intermitente en ratas Sprague Dawley jóvenes.

Las ratas Sprague Dawley de 5 semanas de edad fueron tratadas con la FCL durante seis semanas, dos semanas de descanso intermedio y seis semanas más de tratamiento (Figura 2). Se observaron diferencias significativas en el peso aplicando una regresión multinivel $p=0.013$, con disminución del 4% del peso en las ratas tratadas con FCL respecto al control. No se consideró malnutrición ya que para ello es necesario que el peso disminuya al menos un 10%, como se observó para el caso de ratas adultas jóvenes (Ferriz-Martínez y col., 2015). No se encontraron diferencias para la longitud de los animales entre el grupo tratado y grupo control mediante regresión multinivel ($p=0.304$) (Figura 3). Otro parámetro nutricio fue la ingesta diaria representada de manera semanal, en donde no se observaron diferencias significativas ($p=0.624$) entre el grupo tratado y grupo control mediante regresión multinivel (Figura 4).

Ni el peso ni la longitud relativa de los órganos de las ratas tratadas con FCL contra el control en el primer día de tratamiento presentaron diferencias significativas ($p<0.05$) en la prueba t de student para muestras independientes (Cuadro 6). Este resultado era de esperarse debido a que se administró una dosis única y no afectó ningún parámetro. Se midieron y pesaron órganos a diferentes tiempos, encontrando que al día 9 hubo un incremento del 20% del peso del corazón (t-student $p=0.03$). Algunos autores refieren que a los 9-10 días después de haber consumido las lectinas de soya, PHA entre otras, presentan atrofias o alteraciones en los órganos blancos, manifestándose una respuesta agudizada de su consumo, desapareciendo a través del tiempo (Liener, 1989, Pusztai, 1989; Gueguen y col., 1993). Para el día 22 de tratamiento no se observaron diferencias significativas en los órganos medidos ($p>0.05$), lo que sugiere un proceso adaptativo al consumo de lectinas. A los 43 días tras el consumo de la FCL se observó un incremento del peso del intestino delgado en 14% para los animales tratados con TBFL respecto al

control (t-student p=0.02). Además, se observó disminución del peso del intestino grueso del 21% en los animales tratados (t-student p=0.02).

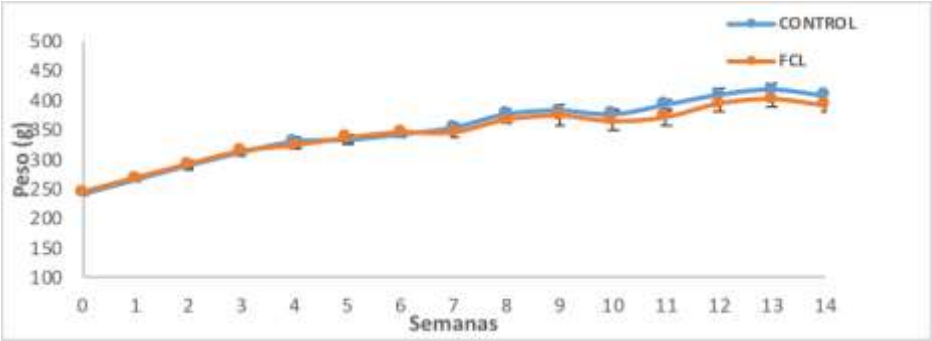

Figura 2. Peso promedio de ratas jóvenes tratadas con FCL durante el tratamiento intermitente. Las ratas se trataron durante seis semanas con FCL, seguidas de dos semanas de descanso y otras seis semanas de tratamiento. Se observan las medias +/- DE. Regresión multinivel (p=0.013).

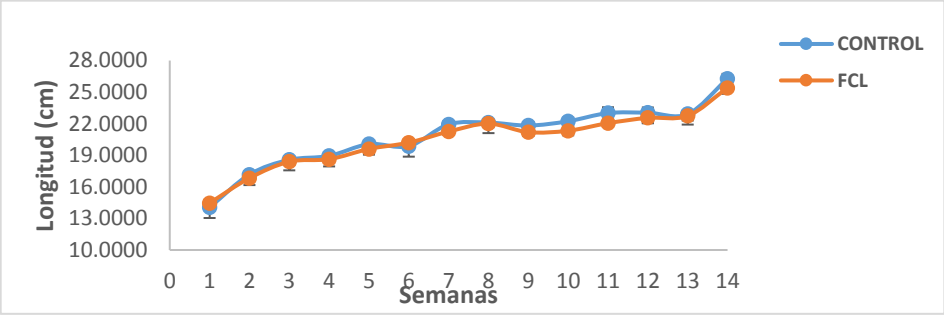

Figura 3. Longitud promedio de ratas jóvenes tratadas con FCL durante el tratamiento intermitente. Las ratas se trataron durante seis semanas con FCL, seguidas de dos semanas de descanso y otras seis semanas de tratamiento. Se observan las medias +/- DE. Regresión multinivel (p=0.304).

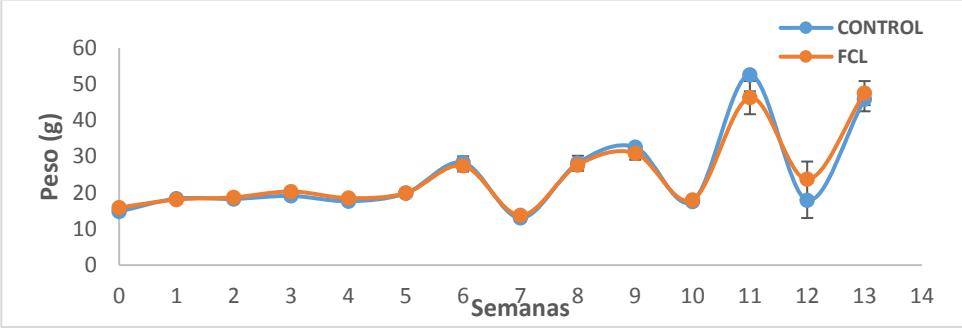

Figura 4. Ingesta promedio (g/día) semanal de ratas jóvenes tratadas con FCL durante el tratamiento intermitente. Las ratas se trataron durante seis semanas con FCL, seguidas de dos semanas de descanso y otras seis semanas de tratamiento. Se observan las medias +/- DE. Regresión multinivel (p=0.624).

Cuadro 6. Peso y longitud de órganos de las ratas tratadas con FCL

9 DÍAS			
Peso	**CONTROL**	**FCL**	***p***
Hígado	1±0.05	0.95±0.14	0.86
Bazo	1±0.49	0.65±0.07	0.36
Riñones	1±0.05	1.01±0.04	0.82
Páncreas	1±0.06	1.03±0.07	0.62
Intestino delgado	1±0.09	1.16±0.15	0.21
Intestino grueso	1±0.20	0.94±0.05	0.79
Corazón	1±0.06	1.15±0.05	***0.03****
Timo	1±0.09	1.12±0.08	0.18
Longitud			
Intestino delgado	1±0.07	0.90±0.12	0.34
Intestino grueso	1±0.09	0.98±0.06	0.82
22 DÍAS			
Peso	**CONTROL**	**FCL**	***p***
Hígado	1±0.04	0.99±0.08	0.91
Bazo	1±0.14	1.06±0.20	0.65
Riñones	1±0.05	1.06±0.09	0.30
Páncreas	1±0.17	0.95±0.07	0.71
Intestino delgado	1±0.12	1.02±0.04	0.78
Intestino grueso	1±0.17	1.01±0.12	0.90
Corazón	1±0.09	1.02±0.08	0.77
Timo	1±0.08	0.98±0.06	0.80
Estómago	1±0.14	1.04±0.11	0.67
Longitud			
Intestino delgado	1±0.12	1.13±0.16	0.29
Intestino grueso	1±0.11	0.94±0.06	0.50
43 DÍAS			
Peso	**CONTROL**	**FCL**	***p***
Hígado	1±0.06	1.03±0.09	0.96
Bazo	1±0.12	1.00±0.08	0.64
Riñones	1±0.10	1.03±0.11	0.51
Páncreas	1±0.26	1.04±0.12	0.92
Intestino delgado	1±0.06	1.14±0.11	***0.02****
Intestino grueso	1±0.19	0.79±0.14	***0.02****
Corazón	1±0.09	0.99±0.11	0.65
Timo	1±0.14	0.91±0.20	0.67
Estómago	1±0.13	1.04±0.26	0.39
Longitud			
Intestino delgado	1±0.09	1.07±0.07	0.35
Intestino grueso	1±0.15	0.98±0.10	0.30
57 DÍAS			
Peso	**CONTROL**	**FCL**	***p***
Hígado	1±0.08	1.07±0.09	0.12
Bazo	1±0.16	0.95±0.15	0.52
Riñones	1±0.05	1.02±0.06	0.35
Páncreas	1±0.41	1.01±0.27	0.92
Intestino delgado	1±0.59	0.88±0.11	0.58
Intestino grueso	1±0.29	0.93±0.25	0.65
Corazón	1±0.07	1.03±0.09	0.44
Timo	1±0.21	1.12±0.39	0.45
Estómago	1±0.24	0.93±0.12	0.48
Longitud			
Intestino delgado	1±0.11	1.00±0.10	0.99
Intestino grueso	1±0.18	0.91±0.20	0.39

(*) Indica la diferencia estadística significativa (t-student, $p \leq 0.05$).

Tras el período de descanso del tratamiento durante dos semanas, se esperaba observar una recuperación del intestino que resultó ser ligera y no significativa ($p>0.05$), ya que la atrofia histopatológica en vellosidades continuaba y el adelgazamiento del tejido del intestino aún se presenciaba. Se pudo observar que el peso del intestino delgado fue mayor que el del grupo control ($p=0.02$), y el peso del intestino grueso fue menor que el de las ratas del grupo control ($p=0.02$).

Se realizó la medición del grosor del intestino delgado observando diferencias al tiempo 43 y 100 días tras la administración de la FCL, sin embargo, tras el descanso de 15 días se alcanzó a recuperar con respecto al control ($p<0.05$) (Figura 5), esto corrobora los datos observables del adelgazamiento del tejido intestinal, mientras que el tejido del colon no se observaron cambios significativamente diferentes de los 3 tiempos que se tomaron en cuenta en el presente estudio (Figura 6).

En cuanto a los parámetros bioquímicos, el Cuadro 7 muestra que al Día 43 la albúmina y la glucosa disminuyeron de manera significativa con respecto al control (t-student $p=0.02$ y $p=0.04$, respectivamente) sin evidencia de afectación sistémica. Al Día 57, la albúmina y la urea disminuyeron de manera significativa con respecto al control (t-student $p=0.01$ y $p=0.02$, respectivamente) sin efectos clínicamente detectables. Tras la sospecha de que el páncreas presentó hipertrofia se determinó insulina sanguínea explorando la zona endocrina del órgano, resultando que en general la insulina no presentó alteraciones en ningún tiempo explorado, exceptuando un ligero cambio a los 22 días, sin embargo, este dato no es clínicamente relevante.

La insulina sanguínea es un parámetro importante en el metabolismo anabólico de la glucosa, y este se observó normal pese a la hipertrofia pancreática exceptuando un ligero incremento a los 22 días, pero sin alteraciones clínicas aparentes. Este resultado es contrastante con la administración de PHA y *Phaseolus vulgaris* L. var. *Athropurpurea* las cuales disminuyen sus niveles implicando un catabolismo tanto lipídico como glucosídico, de esta manera pueden afectar la composición corporal de las ratas (Bardocz y col., 1996).

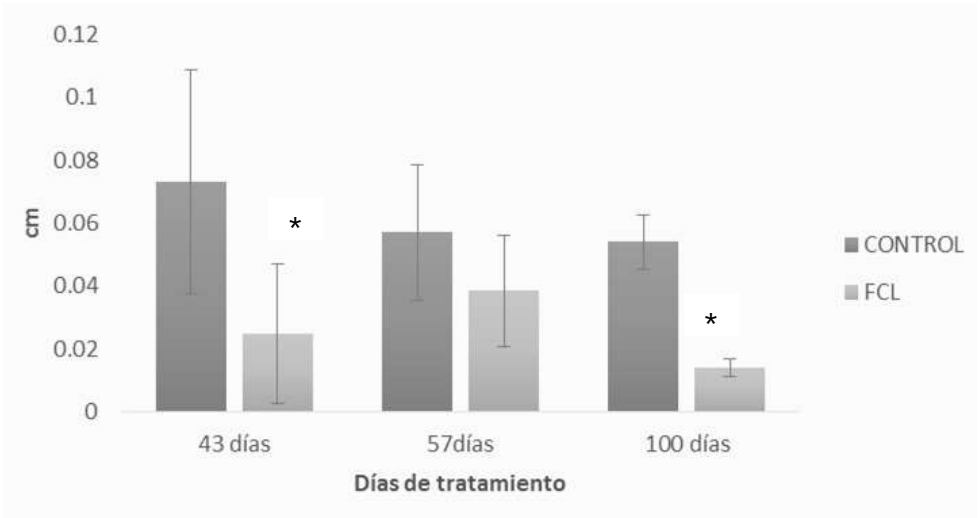

Figura 5. Grosor de intestino delgado de ratas jóvenes tratadas con FCL durante el tratamiento intermitente. Las ratas se trataron durante seis semanas con FCL, seguidas de dos semanas de descanso y otras seis semanas de tratamiento. Se observan las medias +/- DE**.** Los asteriscos indican diferencia estadística significativa (t-student $p<0.05$).

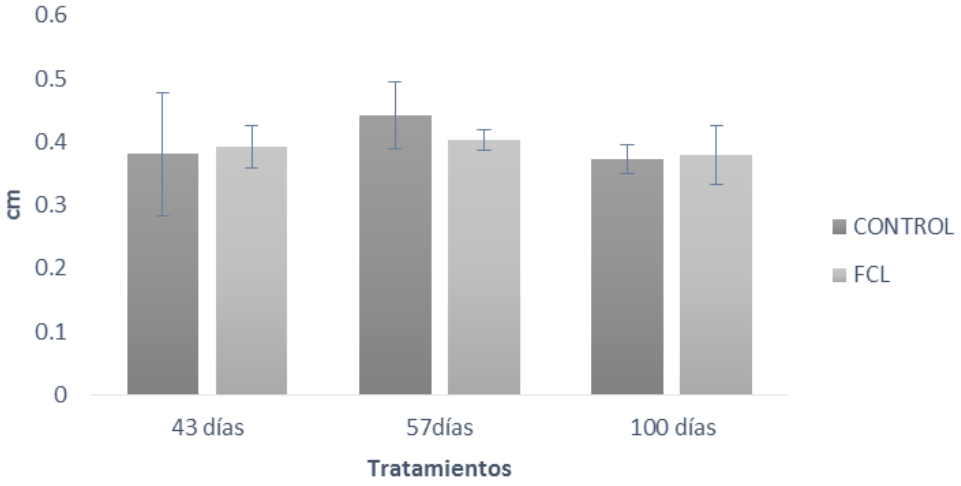

Figura 6. Grosor de intestino grueso de ratas jóvenes tratadas con FCL durante el tratamiento intermitente. Las ratas se trataron durante seis semanas con FCL, seguidas de dos semanas de descanso y otras seis semanas de tratamiento. Se observan las medias +/- DE**.** No se observó diferencia estadística significativa (t-student $p<0.05$).

Cuadro 7. Marcadores bioquímicos en sangre de las ratas jóvenes tratadas con FCL bajo esquema intermitente.

9 DÍAS				
Marcadores sanguíneos	CONTROL	FCL	Rango normal	*P*
Albumina (mg/dL)	3.67±1.38	3.39±1.87	3.8-4.8	0.13
Proteínas totales (mg/dL)	4.4±0.63	5.11±0.73	5.9-7.9	0.22
α-Amilasa U/L	896.3±216.5	886.7±256.5	40 a 140	0.46
Urea (mmol/L)	29.2 ± 3.7	31.4 ± 2.15	9.28-22.13	0.40
Creatinina sérica (mg(dL)	0.59 ± 0.16	0.52± 0.03	0.5-1.5	0.49
GPT (U/L)	60.6 ±3.8	61.3±13.8	90-96	0.9
Glucosa	139.4 ±8.4	128.9±12.5		0.37
22 DÍAS				
Marcadores sanguíneos	CONTROL	FCL	Rango normal	*P*
Albumina (mg/dL)	3.83±1.68	3.72±1.9	3.8-4.8	0.95
Proteínas totales (mg/dL)	5.05±1.11	5.02±1.02	5.9-7.9	0.34
α-Amilasa U/L	1219.2±537.43	992.46±183.7	40 a 140	0.65
Urea (mmol/L)	33.35 ± 6.3	37.6 ± 6.5	9.28-22.13	0.38
Creatinina sérica (mg(dL)	0.59 ± 0.08	0.6± 0.03	0.5-1.5	0.85
GPT (U/L)	42.3 ±8.5	60.25±16.9	90-96	0.21
Glucosa	133.5±0.1	131.9±4.3		0.69
43 DÍAS				
Marcadores sanguíneos	CONTROL	FCL	Rango normal	*P*
Albumina (mg/dL)	3.92±1.65	3.89±2.01	3.8-4.8	***0.02****
Proteínas totales (mg/dL)	4.6±1.57	5.22±1.25*	5.9-7.9	0.07
α-Amilasa U/L	1047.57±187.15	712.35±222.1*	40 a 140	0.33
Urea (mmol/L)	36.1 ± 8.5	42.4 ± 6.6	9.28-22.13	0.11
Creatinina sérica (mg(dL)	0.57 ± 0.16	0.5± 0.10	0.5-1.5	0.28
GPT (U/L)	46.0 ±4.7	44.1±7.5	90-96	0.56
Glucosa	136.4±13.1	121.2±12.6		***0.04****
57 DÍAS				
Marcadores sanguíneos	CONTROL	FCL	Rango normal	*P*
Albumina (mg/dL)	5.04±0.8	3.77±1.01*	3.8-4.8	***0.01****
Proteínas totales (mg/dL)	4.6±1.6	4.55±1.74	5.9-7.9	0.95
α-Amilasa U/L	933.08±245.53	848.5±209.5	40 a 140	0.44
Urea (mmol/L)	42.69 ± 9.7	33.7 ± 5.89*	9.28-22.13	***0.02****
Creatinina sérica (mg(dL)	0.54 ± 0.06	0.59± 0.12	0.5-1.5	0.26
GPT (U/L)	44.6 ±7.6	49.7±12.5	90-96	0.46
Glucosa	147.9±14.1	144.4±39.8		0.86
100 DÍAS				
Marcadores sanguíneos	CONTROL	FCL	Rango normal	*P*
Albumina (mg/dL)	4.76±0.83	4.5±1.1	3.8-4.8	0.69
Proteínas totales (mg/dL)	4.55±0.65	4.65±0.25	5.9-7.9	0.74
α-Amilasa U/L	931.6±136.1	970.2±175.9	40 a 140	0.67
Urea (mmol/L)	32.52 ± 3.5	39.3 ±11.6	9.28-22.13	0.24
Creatinina sérica (mg(dL)	0.51 ±0.12	0.58±0.1	0.5-1.5	0.34
GPT (U/L)	49.5 ±5.5	49.1±4.3	90-96	0.91
Glucosa	118.5±16.6	135.2±10.0		0.09

(*) Indica la diferencia estadística significativa (t-student, p≤0.05).

Mediante el análisis histopatológico del páncreas resalta un incremento en el tamaño del acinos pancreáticos (zona exocrina del órgano) en ratas tratadas con FCL en la sexta semana. El área promedio de los acinos pancreáticos del grupo control de 41531.6 ± 9406.15 μ^2 mientras que para el grupo tratado fue de 68308.3 ±31868.4 μ^2 (p=0.011), lo que revela hipertrofia pancreática. También se observó incremento en el número de vacuolas en la zona acinar exocrina del páncreas, efecto adverso no reportado ni esperado tras el consumo de lectinas. El área de os acinos fue de 849.6 ± 316.3 μ^2, mientras que en los acinos pancreáticos del grupo control no se visualizaron vacuolas (Figuras 7 y 8).

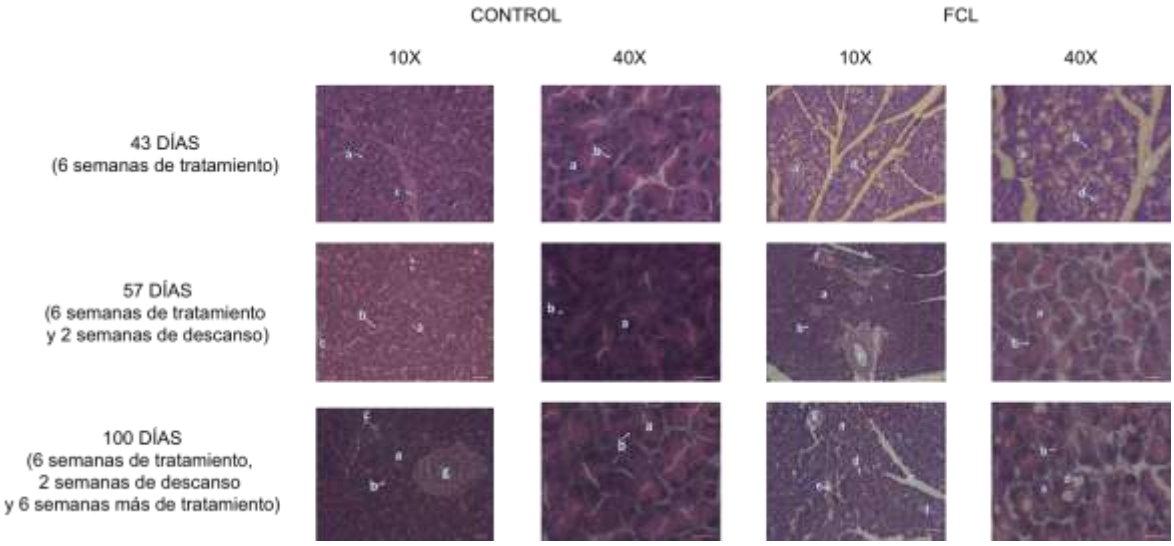

Figura 7. Acinos pancreáticos (zona exocrina del páncreas) después de la administración de la FCL en esquema intermitente. Las ratas se trataron durante seis semanas con FCL, seguidas de dos semanas de descanso y otras seis semanas de tratamiento. Se aprecia la disminución de vacuolas (óvalos blancos dentro de los acinos) en los acinos pancreáticos (FCL 10x y 40x) para los días 57 y 100 días en comparación de los 43 días tratados con FCL. acinos pancreáticos, a) Núcleos b) Trabéculas (tejido conectivo), c) Vacuolas, d) Ductos, e)Vasos sanguíneos y f) Glándulas endocrinas.

Las vacuolas observadas eran dismórficas y no ovaladas, los núcleos de las células exocrinas se encontraron en la periferia y no centralizados como marca la morfología clásica, al conjunto de la presencia de vacuolas y de la alteración en la morfología de las células es definida la hipertrofia acinar (Dillberger, 1994).

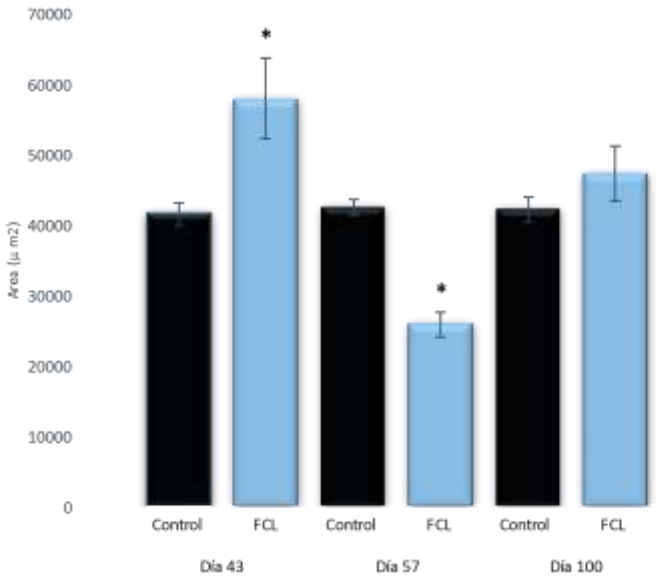

Figura 8. Efecto de la FCL sobre el área de los acinos pancreáticos en un esquema de administración intermitente. Las ratas se trataron durante seis semanas con FCL, seguidas de dos semanas de descanso y otras seis semanas de tratamiento. Los asteriscos representan diferencia estadística significativa entre grupos (t-student p>0.05), las barras de error representan el error estándar.

Al reiniciar nuevamente la administración de la FCL durante 6 semanas más, los acinos pancreáticos no mostraron diferencia respecto al control (p=0.131), debido a que la media del área de los acinos del grupo control fue de 42068.2 ± 9316.9 μ^2 mientras que los acinos del grupo tratado fue de 52778.2 ±10108.6 μ^2, lo que sugiere una posible recuperación y adaptación del acino pancreático. En el análisis histopatológico se pudo observar que las células eran mucho más pequeñas de las del grupo control lo cual podría referirse a una atrofia acinar, además, disminuyeron de manera considerable el número de vacuolas a comparación del control, los núcleos se visualizaron más redondeados y centralizados. Después de administrar FCL otras 6 semanas más (Día 100), reincidieron la presencia de vacuolas pero en menor cantidad que a los 43 días, se incrementó el área de los acinos pancreáticos pero sin evidencia de hipertrofia o atrofia debido a que los acinos presentaron un tamaño similar a los del grupo control. Dado que la presencia de vacuolas podría deberse a un cúmulo de grasa o de enzimas digestivas, se realizó una tinción con Rojo Oleoso donde dicha técnica tiene como fundamento teñir la grasa de color rojo. Se rechazó dicha hipótesis sobre las vacuolas formadoras de acúmulos de grasa (Figura 9).

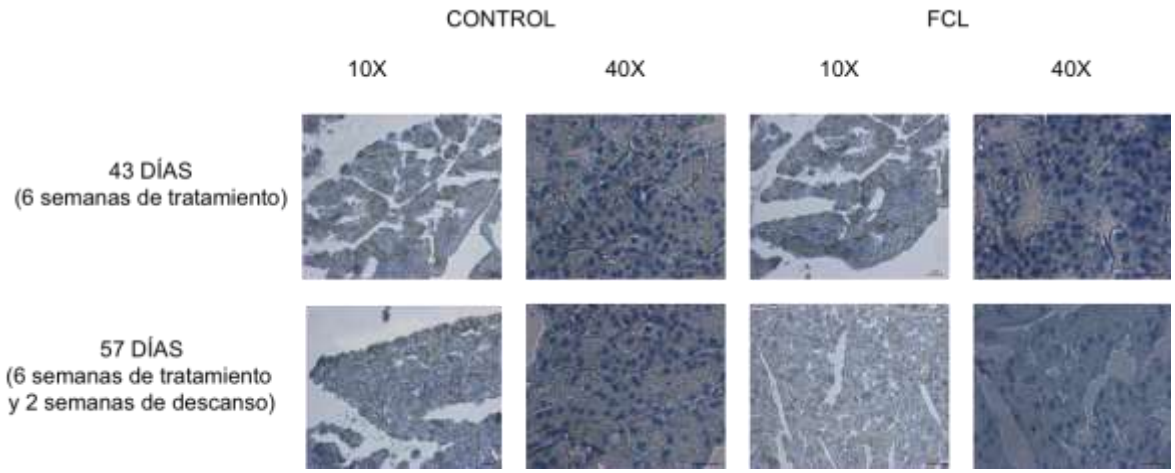

Figura 9. Acinos pancreáticos (zona exocrina del páncreas) después de la administración de la FCL en esquema intermitente con tinción rojo oleoso y hematoxilina. El color azul obscuro refiere a la tinción de núcleos con hematoxilina. El rojo oleoso tiñe de rojo a las células en presencia de grasa (no se encuentra grasa en el tejido).

En dicho período, también se analizaron los intestinos encontrándose que los que fueron tratados con FCL disminuyeron 75 µm aproximadamente con respecto al control, lo que resultó en atrofia intestinal. La profundidad de las criptas en el intestino grueso incrementó 55 µm sobre el promedio con respecto al control. Tras el periodo de descanso no se recuperó el efecto negativo sobre intestino delgado y colon (Alatorre-cruz y col., 2018). Los resultados sugieren que la administración de la FCL, bajo el esquema utilizado, afecta la zona exocrina pancreática sin afectar su función. Dicho efecto puede ser debido a un esfuerzo del páncreas por compensar el daño que se provoca en el intestino delgado, sin embargo, fue reversible al dejar de administrar la FCL.

El peso del bazo no se vio afectado tras el tratamiento con la FCL, sin embargo, se observó una tendencia de incrementar la pulpa blanca (refiere a las células leucocitarias que se encuentran dentro del bazo) de manera no significativa el cual fue evidente en los días 43 y 57 (Figura 10). Lo anterior sugiere la activación del sistema inmune. Los centros germinales (GC) son estructuras en las cuales se da la maduración de los anticuerpos y tiene lugar durante la respuesta primaria. En el presente trabajo, los GC no mostraron cambios, en contraste con estudios anteriores a las 15 semanas de edad de las ratas (Alatorre-Cruz y col., 2018).

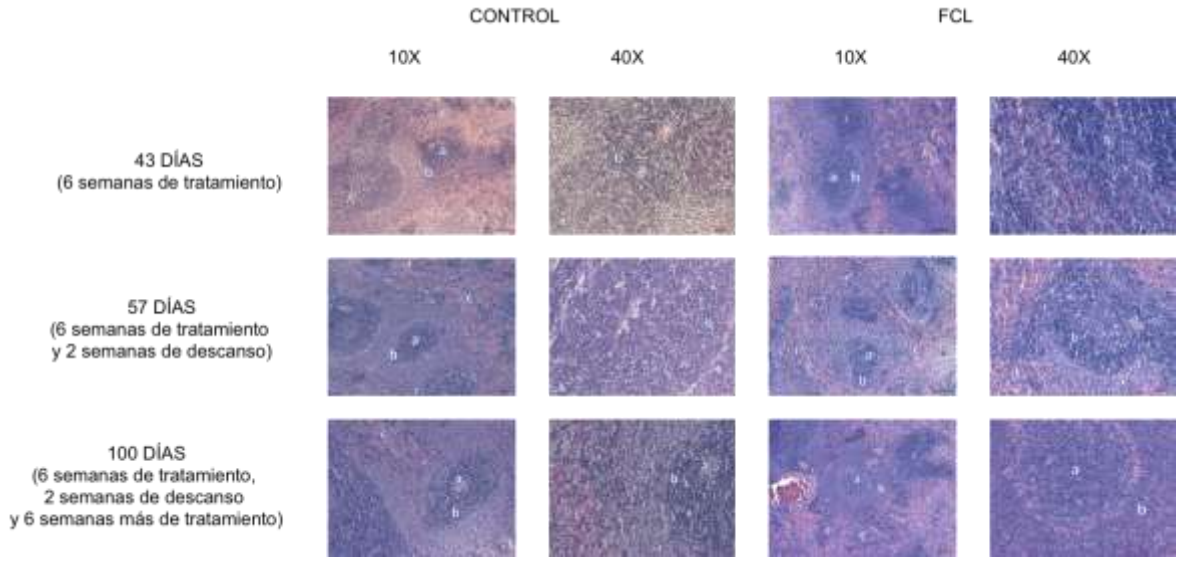

Figura 10. Pulpa blanca (zonas obscuras) y roja (zonas rojizas) del bazo después de la administración de la FCL en esquema intermitente. Las ratas se trataron durante seis semanas con FCL, seguidas de dos semanas de descanso y otras seis semanas de tratamiento. Se puede apreciar un ligero aumento de la pulpa (5x y 20x). a) Centros germinales, b) Pulpa blanca c) Pulpa roja.

Se realizó el análisis histopatológico de hígado en ratas a los 9 días de tratamiento (Figura 11). Se observó un incremento de células Kupffer pertenecientes a la respuesta inmune del hígado, incremento de linfocitos y células polimorfonucleares refiriendo a una inflamación producto del tratamiento con la FCL. Además, se observó hiperplasia en la triada hepática considerándose refiriéndose a una toxicidad hepática, sin embargo, este hallazgo no se correlacionó de manera sistémica tras la medición de la transaminasa ALT sanguínea. Estos datos deben corroborarse en los diferentes tiempos medidos en dicho estudio, para observar la posible recuperación del tejido dañado.

La Figura 12 muestra dos fotografías de placas de Peyer de intestino delgado observándose un incremento de folículos linfoides dentro de la placa de Peyer del grupo tratado durante 43 días con TBFL en comparación con las del grupo control.

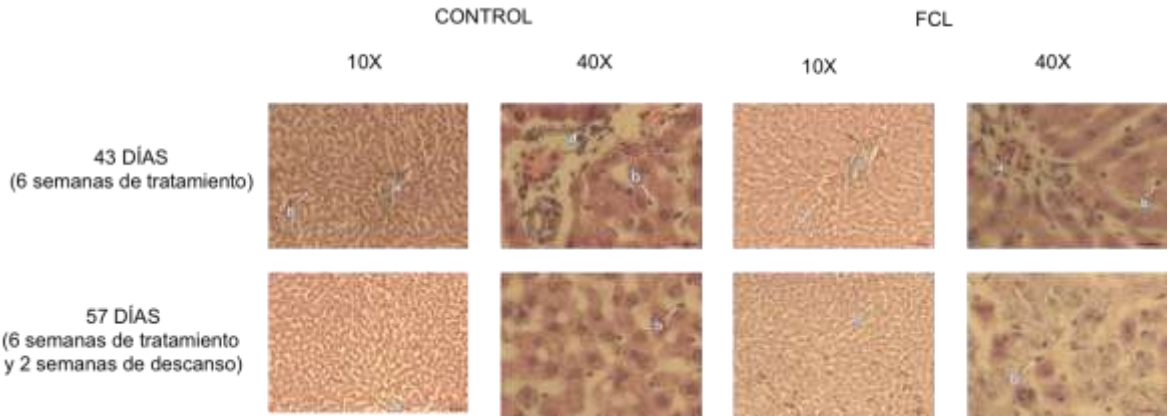

Figura 11. Hepatocitos y triada portal del hígado después de la administración de la FCL en esquema intermitente. Las ratas se trataron durante seis semanas con FCL, seguidas de dos semanas de descanso y otras seis semanas de tratamiento. Se muestra el análisis histopatológico a los 9 días de tratamiento. Se puede apreciar un incremento de células Kupffer, linfocitos y células polimorfonucleares refiriendo a una inflamación producto de la administración con FCL (10x y 40x). a) Triada portal, b) Células de Kuffer.

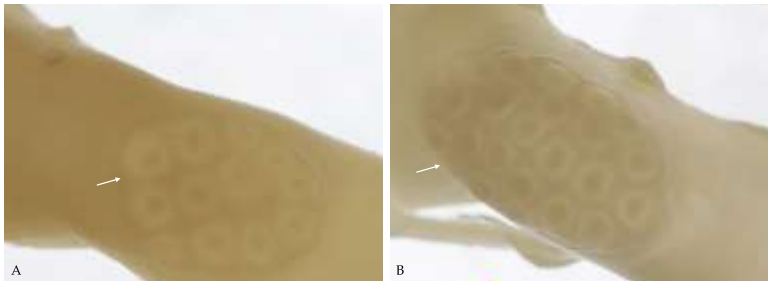

Figura 12. Placas de Peyer en duodeno después de los 43 días de tratamiento. A) Ratas del grupo control. B) Ratas tratadas con FCL. Las placas de Peyer en las ratas tratadas muestran más folículos linfoides y una apariencia más delgada en el espesor Del intestino en comparación con las del grupo control. Fotografías tomadas usando una cámara Carl Zeiss macro lentes 100 con extensión de tubos.

En la Figura 13 se muestra la Inmunohistoquímica para poder corroborar la reactivación de estas placas de Peyer frente a las lectinas, los anticuerpos que estaban incrementados de manera significativa fueron IL-6 y NF-kB, mientras que TNF-α no estaba activada, este fenómeno fue confirmado en sangre.

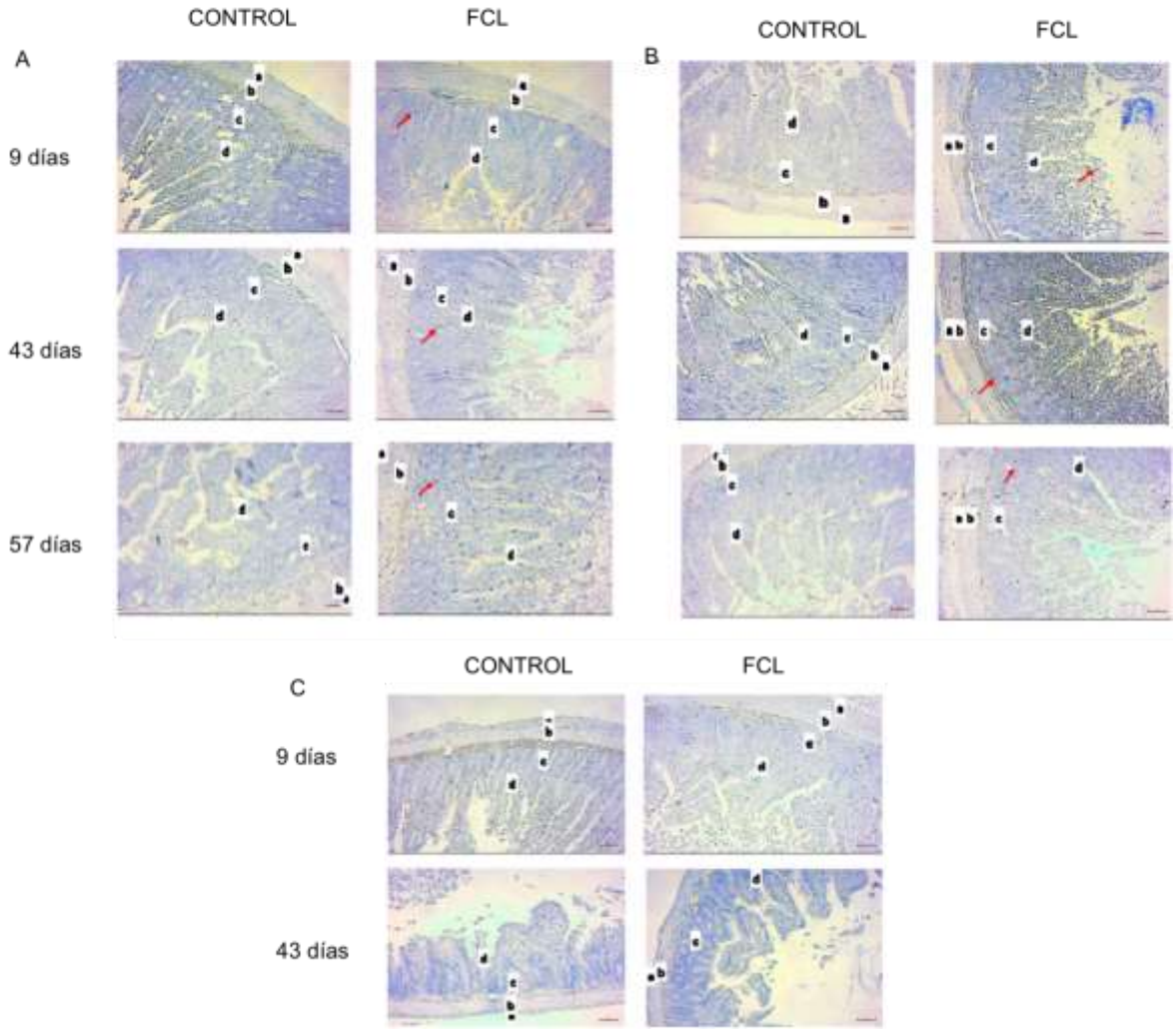

Figura 13. Inmunohistoquímica de Placas de Peyer en los períodos 9, 43 y 57 días de tratamiento con FCL vs control. Se midió IL-6 (1era y 2da. columna) y NF-kB (3era. y 4ta. columna) y TNFα (sólo se midió a los 9 y 43 días) siendo este último negativo.

7.2 Experimento a largo plazo sostenido en ratas jóvenes

Las ratas de 5 semanas de edad fueron tratadas con FCL durante 12 semanas continuas de tratamiento no mostraron diferencias significativas en el peso corporal mediante t de student y regresión multinivel ($p>0.05$ y $p=0.861$ respectivamente) (Figura 14). Otro parámetro nutricio medido fue la longitud total de la rata, dónde tampoco se observaron cambios con respecto al control (regresión multinivel $p>0.05$) (Figura 15). La ingesta diaria representada de manera semanal no mostró diferencias entre grupos (regresión multinivel $p>0.05$) (Figura 16). Al realizar un

modelo multivariado (*t* de Hotelling) donde se observa de manera conjunta las variables que fueron tomadas en un solo momento, no se encontraron diferencias significativas (p=0.202*)* tales aspectos evaluados fueron: peso y longitud relativos de órganos de hígado, bazo, timo, intestino delgado, intestino grueso, riñones, corazón, páncreas no presentaron cambios entre grupos de tratamiento (Figuras 17 y 18), excepto el corazón el cual disminuyó en tamaño cuando se administró la FCL (control 18.78±0.9 mm y TBFL 16.4±0.38, t-student p=0.032), refiriendo una posible atrofia (Figuras 19 y 20). Se encontró disminución del tamaño del corazón en las ratas tratadas con FCL (p<0.05). Por el contrario, las mediciones de trabécula no mostraron diferencias significativas.

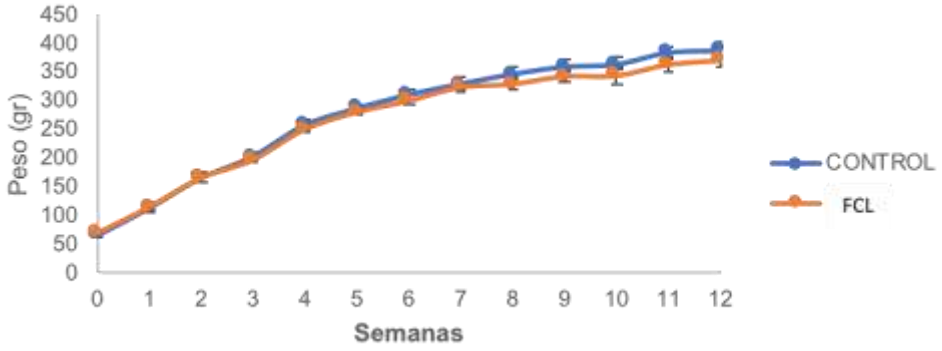

Figura 14. Peso promedio de las ratas tratadas con FCL en tratamiento sostenido durante 12 semanas de tratamiento. Se muestran los promedios con sus respectivas desviaciones estándar *p<0.05. Regresión multinivel: Intercepto *(p=0.861)*, Pendiente: *(p=0.183).*

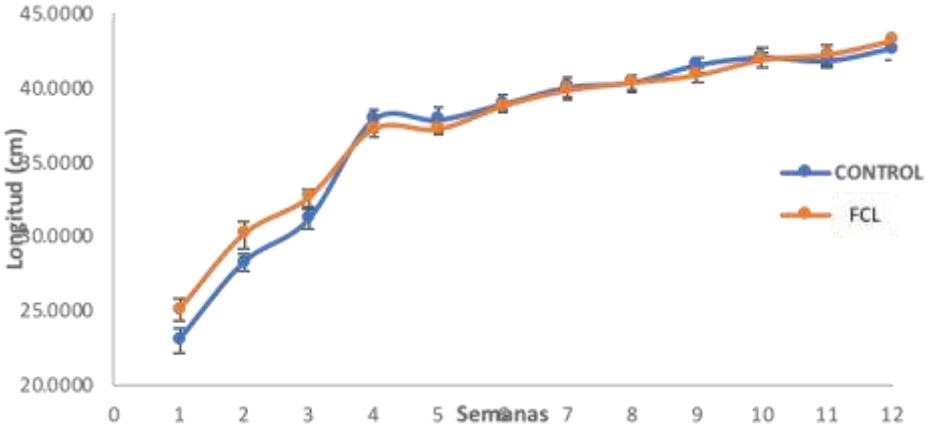

Figura 15. Promedio de longitud las ratas tratadas con FCL en un tratamiento sostenido durante 12 semanas de tratamiento. Se muestran los promedios con sus respectivas desviaciones estándar *p<0.05. Regresión multinivel: Intercepto (p= 0.248), Pendiente (p=0.362)

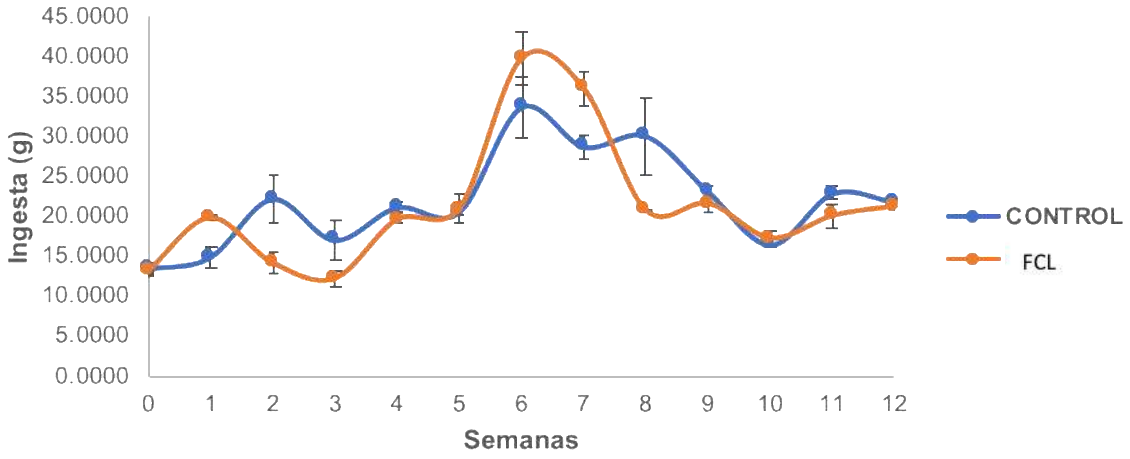

Figura 16. Ingesta promedio (g /día) semanal de las ratas tratadas con FCL en un tratamiento sostenido durante 12 semanas. Se muestran los promedios con sus respectivas desviaciones estándar *p<0.05. Regresión multinivel: Intercepto (p= 0.756), Pendiente (p=1.00)

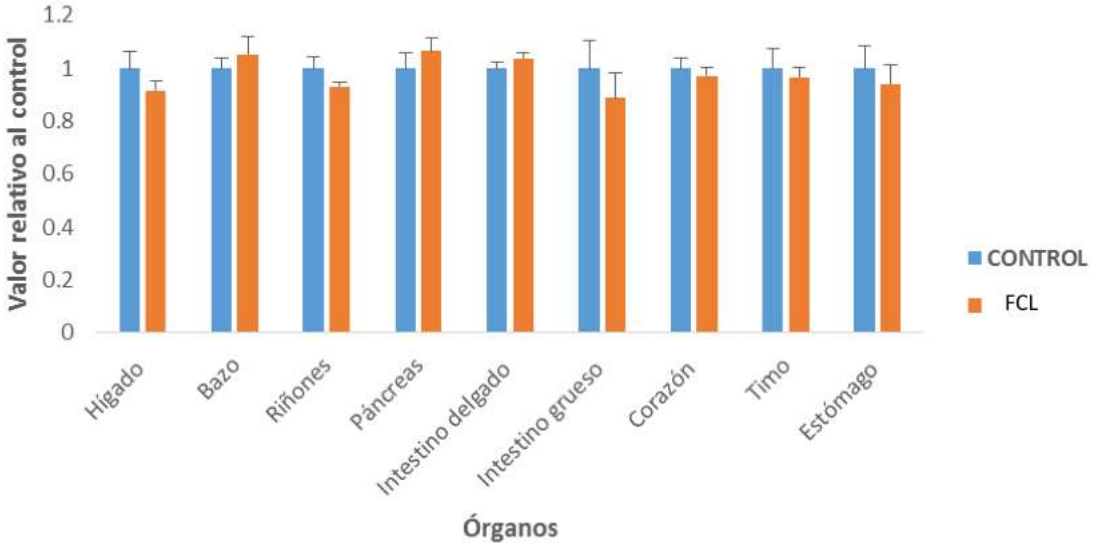

Figura 17. Pesos relativos de órganos de ratas Sprague Dawley de 5 semanas de edad durante 12 semanas de tratamiento con FCL. Se muestran los promedios con sus respectivas desviaciones estándar.

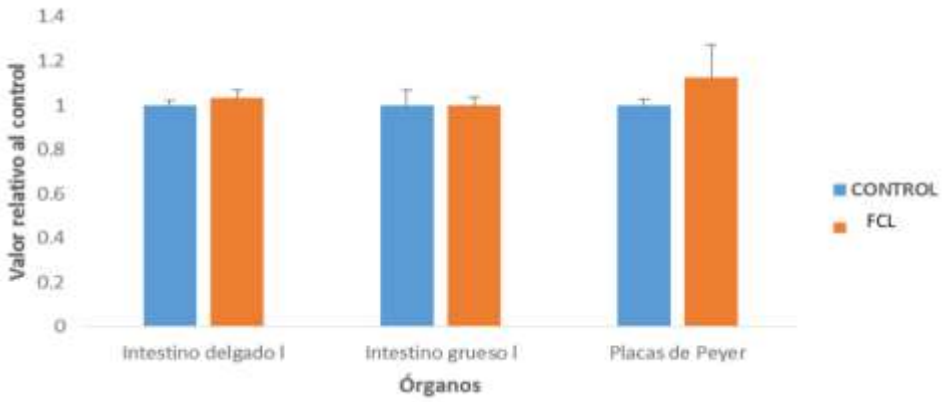

Figura 18. Longitud relativa de órganos de ratas Sprague Dawley de 5 semanas de edad durante 12 semanas de tratamiento con FCL. Se muestran los promedios con sus respectivas desviaciones estándar.

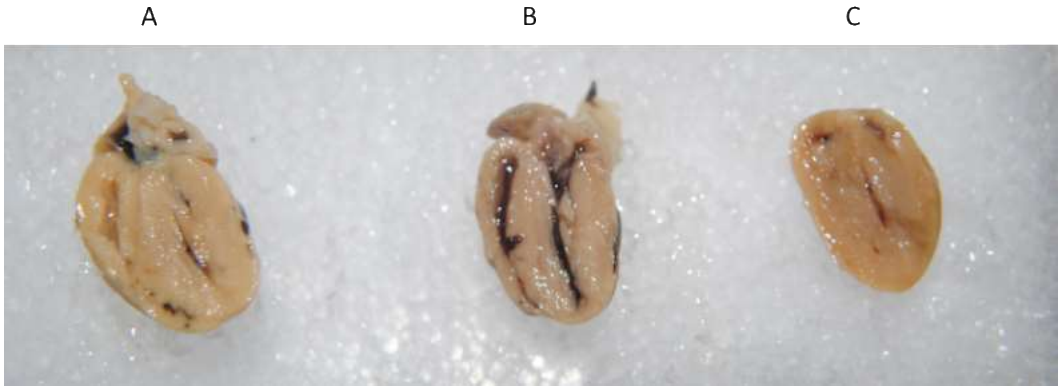

Figura 19. Corazones de ratas tratadas durante 12 semanas con FCL. A) Control (sin tratamiento) B, C) Corazones tratados con FCL. Cámara Nikon D-3000.

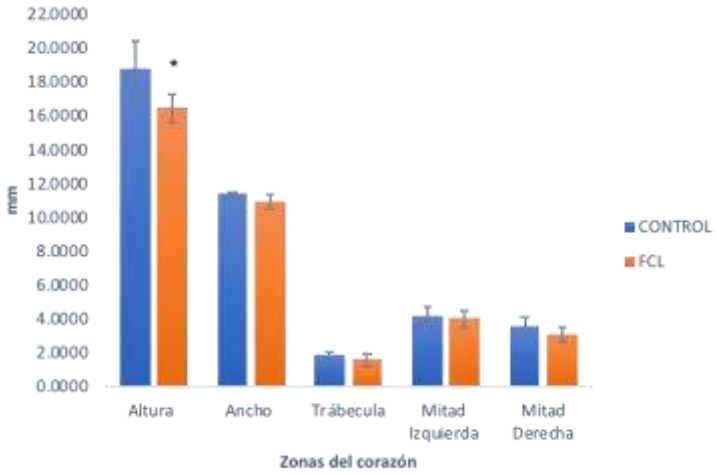

Figura 20. Determinación de medidas de zonas del corazón de ratas tratadas durante 12 semanas con FCL. Se muestran los promedios con sus respectivas desviaciones estándar. *significativo t-student ($p<0.05$).

En cuanto a los marcadores metabólicos: biometría hemática, proteínas totales, alfa amilasa, creatinina, urea, albúmina, ALT, glucosa e insulina (Cuadro 8), no se encontraron diferencias importantes, excepto en la insulina plasmática donde se detectó un incremento de manera significativa en las ratas tratadas con TBFL versus control, (t-student p=0.05). Lo anterior podría sugerir un efecto adverso sobre la zona endocrina del páncreas, sin embargo, no fue clínicamente significativo comparado con los valores normales bioquímicos para la edad de la rata. En cuanto a los hallazgos clínicos, el intestino presentó estenosis y adelgazamiento en las paredes, se observó piloerección y diarrea, datos que son observados de manera constante en otros estudios y en diferentes edades con FCL.

Cuadro 8. Química sanguínea y biometría hemática de las ratas tratadas con TBFL (12 semanas de tratamiento)

Ratas Jóvenes				
Química sanguínea	CONTROL	TBFL	Rango normal	*P*
Albumina (mg/dL)	4.48 ±0.33	4.36±0.36	3.8-4.8	0.56
Proteínas totales (mg/dL)	4.35±0.15	4.5±0.17	5.9-7.9	0.17
α-Amilasa U/L	920.0±164.3	865.1±26.3	40 a 140	0.47
Urea (mmol/L)	37.51 ± 5.29	42.07 ± 3.57	9.28-22.13	0.14
Creatinina sérica (mg(dL)	0.67 ± 0.13	0.55± 0.04	0.5-1.5	0.09
Glucosa	134.2±	130.96±10.05	58.0 –160.2	0.68
ALT	43.4±0.16	55.33±7.9	32.2 –80.9	0.16
Biometría hemática				
WBC (µl x 10^3)	8.43±2.62	7.6±1.55	6.33 –8.64	0.51
HB (g/dL)	17.68±0.34	17.28±0.59	12.09–15.18	0.18
HTO (%)	44.98±2.57	44.43±1.86	33.1 – 45.8	0.59
MCV (fL)	54.5±2.01	54.46±1.55	52.4 –59.9	0.97
MCH (pg)	21.45±0.99	21.2±0.41	15.6 –21.2	0.58
MCHC (pg)	39.35±1.75	38.91±0.56*	28.1 –93.3	0.57
RBC	8.2±0.24	8.15±0.24	1.68 –4.32	0.5
PLT (µl x 10^4)	925.5±144.5	847.5±89.0	428 –857	0.17
LINFOCITOS (%)	83.31±3.6	86.0±2.75	82.67–96.71	0.16

Histopatológicamente, se observó que los tejidos de páncreas en la zona exocrina específicamente se encontraron nuevamente presencia de vacuolas, que podrían referirse a grasa o enzimas pancreáticas como la tripsina, quimotripsina y elastasa. Se procedió a la determinación de la actividad enzimática de tripsina, quimotripsina y elastasa en páncreas (Figura 21). No se encontraron diferencias significativas

excepto en la tripsina dónde la concentración encontrada fue menor con respecto al control (t-student $p<0.05$), con tendencia positiva en cuanto al incremento de la quimotripsina y elastasa. Lo anterior sugiere que la presencia de vacuolas se puede deber al acúmulo de enzimas.

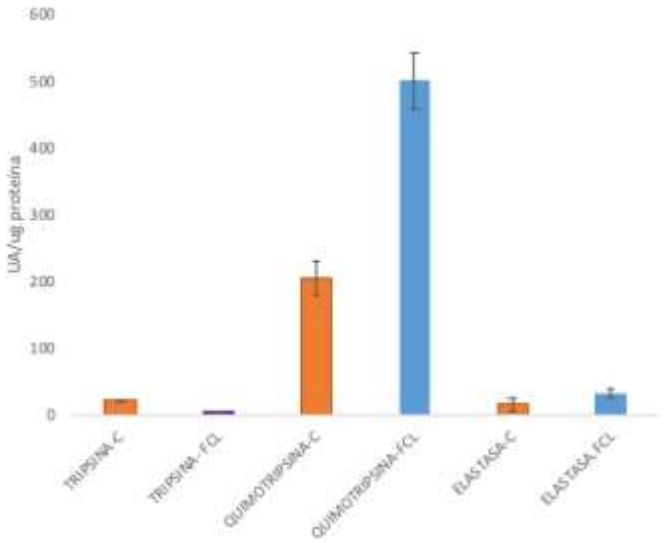

Figura 21. Actividad enzimática de tripsina, quimotripsina y elastasa en páncreas.
Páncreas de ratas tratadas con FCL durante 12 semanas versus control.

7.3 Experimento 3. Efecto de la administración intragástrica de FCL en animales adultos en esquema a corto plazo.

En el caso del peso mediante un modelo de regresión multinivel resultó por primera vez observar en el presente trabajo, la pérdida en la ganancia de peso ($p=0.009$), de -0.27gr/semanales (Figura 22). La ingesta diaria mostrada de manera semanal de las ratas adultas control fue de 13.9 ±0.78 gramos y de las tratadas con FCL de frijol Tépari fue de 13.6 ±0.46 durante 6 semanas de tratamiento, por lo que no se observó diferencia con el mismo modelo (Figura 23).

Un resultado interesante (Figura 24) es que no se observó atrofia ni hipertrofia del corazón en comparación con su grupo control, lo que muestra una diferencia en comparación con las ratas jóvenes que si presentaron atrofia (Figura 25).

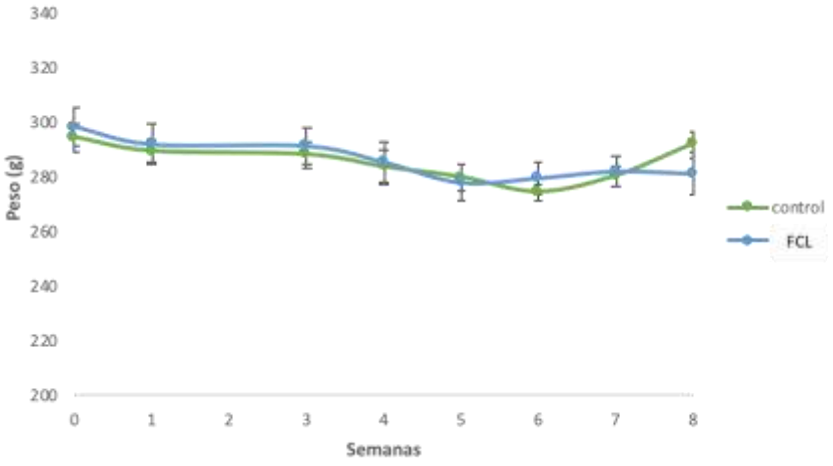

Figura 22. Peso promedio de ratas adultas tratadas con FCL vs control en un período de 6 semanas. En un período de 6 semanas. Se muestran las medias +/- D.E.

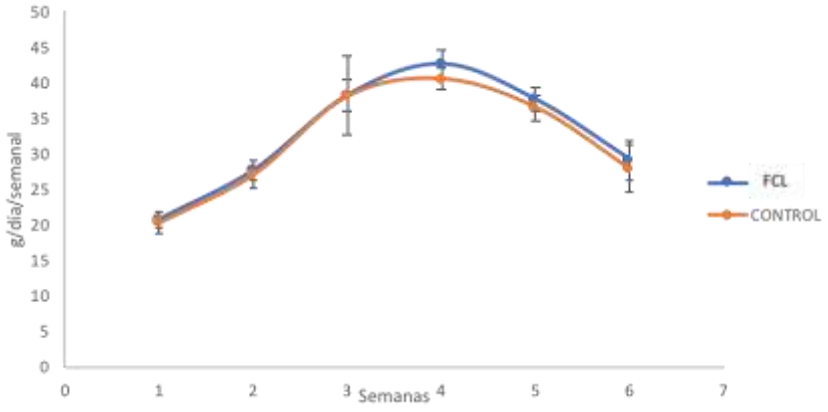

Figura 23. Ingesta de alimento, promedio por día representada en gramos y de manera semanal en ratas adultas. En un período de 6 semanas. Se muestran las medias +/- D.E.

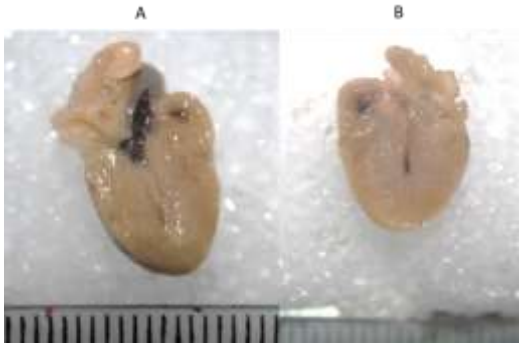

Figura 24. Corazones de ratas adultas tratadas durante 6 semanas con FCL por 6 semanas.

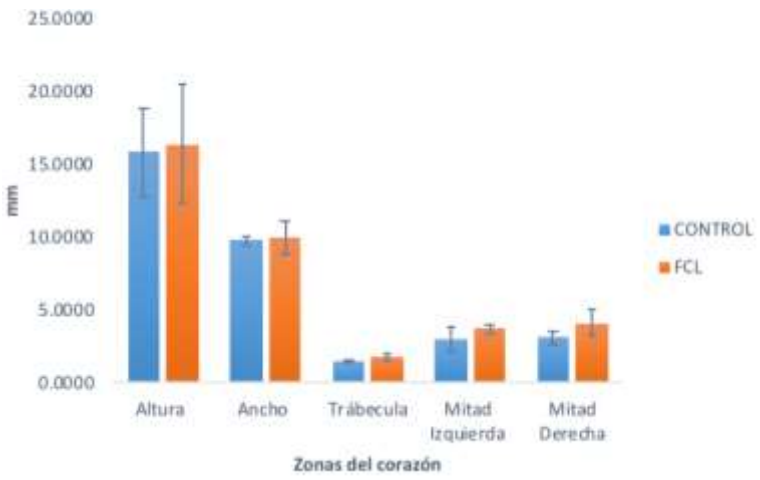

Figura 25. Determinación de medidas de zonas del corazón de ratas adultas tratadas durante 6 semanas con FCL. Se muestran las medias +/- D.E.

El Cuadro 9 muestra los resultados obtenidos para los parámetros sanguíneos. Ninguno de los valores resultantes presentó diferencias estadísticamente significativas bajo un modelo multivariado t de Hotelling ($p=0.457$) ni con t de Student ($p>0.05$), lo que sugiere que la FCL no causa algún efecto adverso sistémico en las ratas de dicha edad así como en las de varias edades que se han tratado en dicho trabajo.

El análisis estadístico con el modelo multivariado t- de Hotelling mostró que solo el páncreas incrementó su peso en el grupo tratado con la FCL respecto al control ($p=0.008$) (Figuras 26 y 27). En la Figura 28 se muestra el análisis histopatológico del páncreas. Los acinos pancreáticos de las ratas tratadas con FCL mostraron un incremento de tamaño en la glándula exocrina. Además, se observó un moderado incremento de vacuolas en las células acinares exocrinas tratadas con FCL en comparación con el grupo control. Otra de las características histológicas del páncreas normal es que los núcleos de los acinos pancreáticos están centralizados regularmente (visto en acinos pancreáticos de ratas no tratadas) en comparación a los núcleos los acinos en el grupo de ratas tratadas con FCL que se observaron en la periferia mostrándose así como incremento de vacuolas y el contenido granulado de los acinos, lo que sugiere hiperactividad pancreática (Figura 27). Dicho efecto no fue diferencial en ninguno de las etapas de la vida como lo es el peso y algunos valores bioquímicos.

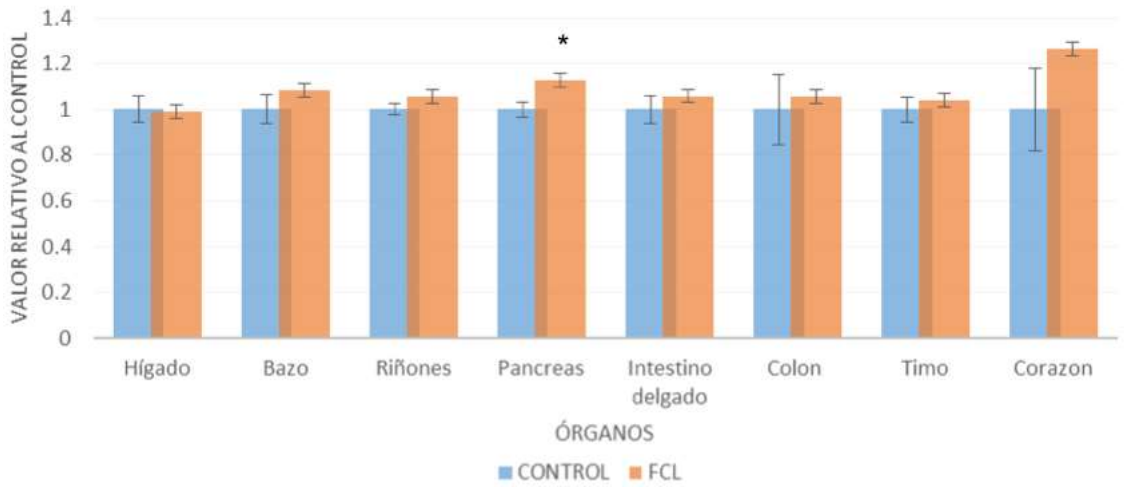

Figura 26. Peso relativo de los órganos de las ratas adultas. Se observaron diferencias significativas en el promedio de peso de páncreas (*p=0.008*) de las ratas Sprague Dawley de 25 semanas de edad tratadas con FCL. En los demás órganos no hubo diferencia significativa entre los grupos (t Hotelling, p ≥ 0.05). *Diferencia significativa (p=0.008)

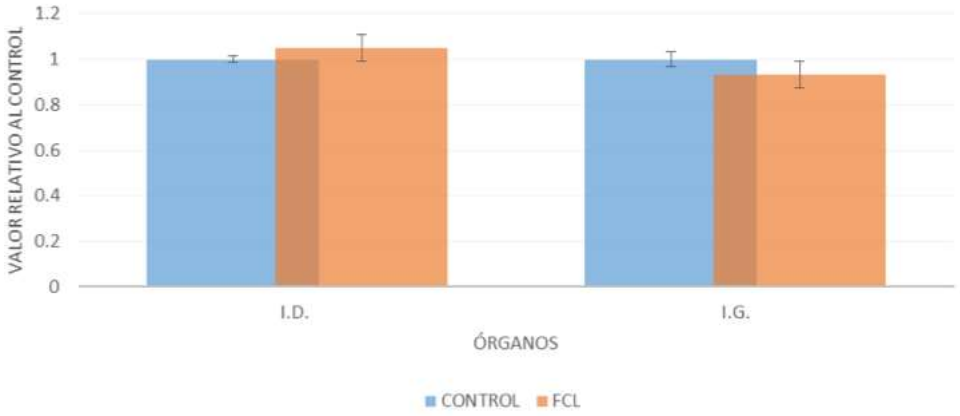

Figura 27. Longitud relativa de los órganos de las ratas adultas. No se observaron diferencias significativas en el promedio de la longitud del intestino delgado e intestino grueso de las ratas Sprague Dawley de 25 semanas de edad tratados con FCL, comparados con las ratas del grupo control (*p>0.05*).

Cuadro 9. Biometría hemática y química sanguínea en sangre de las ratas adultas tratadas con FCL vs control en un período de 6 semanas.

Ratas Adultas				
Química sanguínea	CONTROL	FCL	Rango normal	*P*
Albumina (mg/dL)	2.16±0.55	2.0±0.44	3.8-4.8	0.64
Proteínas totales (mg/dL)	5.37±1.37	5.51±1.34	5.9-7.9	0.85
α-Amilasa U/L	680.38±281.08	604.2±219.9	40 a 140	0.61
Urea (mmol/L)	44.41±19.39	44.26±12.5	9.28-22.13	0.98
Creatinina sérica (mg(dL)	0.65±0.12	0.65±0.09	0.5-1.5	0.77
Glucosa	132.7± 12.7	152.13.96±7.24	54.7 – 189.7	0.12
Biometría hemática				
WBC (µl x 10^3)	3.73±0.42	3.25±0.45	5.81 –7.19	0.49
HB (g/dL)	14.86±0.26	13.41±1.35	11.97–15.18	0.36
HTO (%)	43.81±0.6	39.96±4.13	31.4 –39.4	0.42
MCV (fL)	53.83±0.64	55.16±0.54	51.3 –56.2	0.72
MCH (pg)	18.6±0.26	18.55±0.16	19.4 –22.7	0.88
MCHC (pg)	33.91±0.17	33.66±0.21	36.9 –41.3	0.42
RBC	7.99±0.11	7.21±0.71	2.30 –3.65	0.35
PLT (µl x 10^4)	928±16.01	747.4±98.02	474 –895	0.17
LINFOCITOS (%)	83.3±1.64	84.86±2.33	83.64–96.93	0.62
Granulocitos (%)	16.7±1.64	15.16±2.36		0.63

Se muestran las medias con sus respectivas +/- D.E.
No hubo diferencia significativa (*T* Hotelling, $p \geq 0.05$).

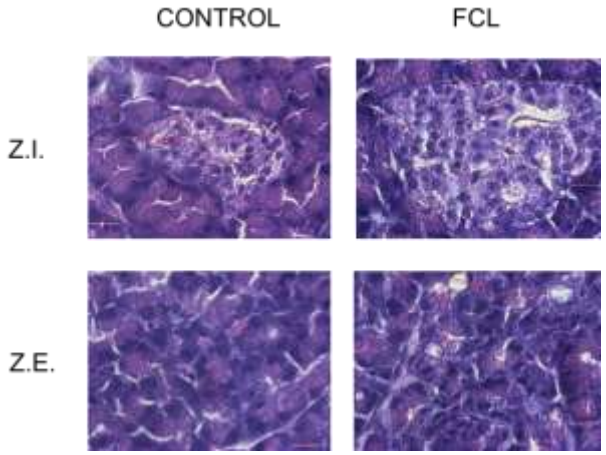

Figura 28. Zona endócrina (Z.I.) y acinos pancreáticos de zona exocrina (Z.E) del páncreas tras la administración subcrónica de la FCL a las 6 semanas de tratamiento. Se puede apreciar un aumento y presencia de vacuolas (óvalos blancos dentro de los acinos) en los acinos pancreáticos Z.E. (TBFL 40x) en comparación al control.

La morfología de las células acinares pancreáticas normales es de tipo alveolar, sin embargo, en las tratadas con FCL se observaron más redondeadas, perdiendo su morfología característica. No se observó presencia de inflamación ni necrosis en el

páncreas, tampoco se visualizaron cambios en la glándula endocrina del órgano, limitándose principalmente en la zona exocrina. El área promedio de los acinos pancreáticos del grupo control fue 5228.5±1294.07 μ^2 mientras que los acinos pancreáticos del grupo tratado con FCL fue de 9154.1±2834.06 μ^2 *(p=0.004),* sugiriendo una hipertrofia pancreática acinar. Las vacuolas, que únicamente estuvieron presentes en los páncreas de las ratas tratadas con FCL, tuvieron un promedio de área de 669.20± 220.02 μ^2. De la misma manera que en otros esquemas de administración de la FCL en el presente estudio, se determinó si las vacuolas se deben a un cúmulo de enzimas pancreáticas. Los resultados de dichas enzimas (tripsina, quimotripsina y elastasa) mostraron una tendencia en el incremento de la tripsina y quimotripsina de manera significativa respecto el control (t-student $p<0.05$) (Figura 29). Lo anterior sugiere que el acúmulo de vacuolas observadas en el páncreas puede deberse al incremento de enzimas digestivas pancreáticas en los acinos secundarias a la atrofia intestinal.

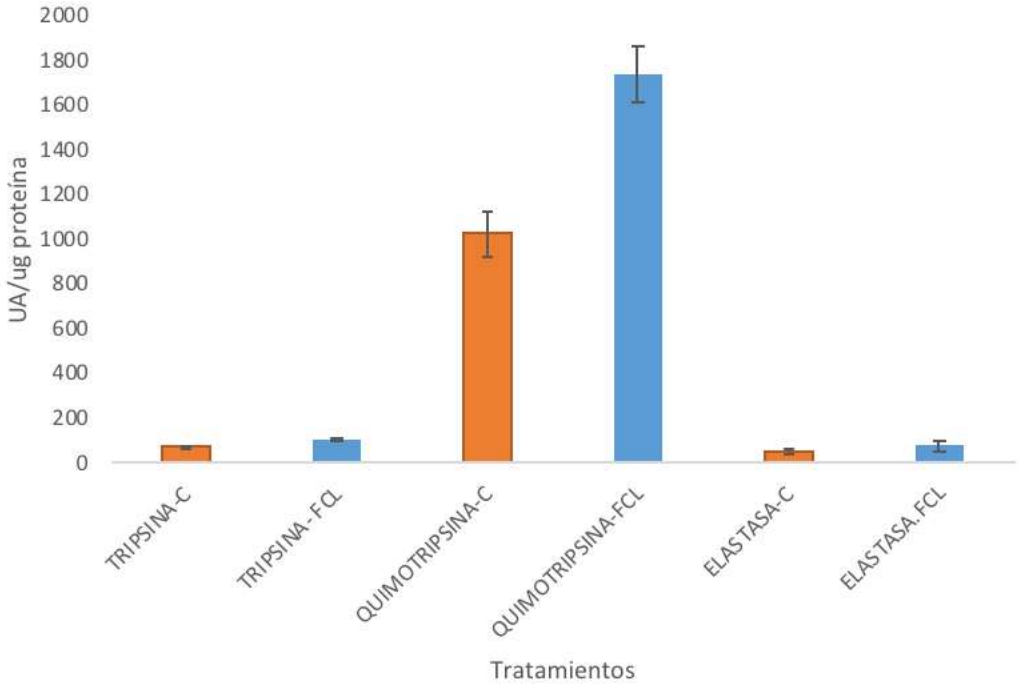

Figura 29. Actividad enzimática de tripsina, quimotripsina y elastasa en páncreas. Páncreas de ratas adultas tratadas con FCL durante 6 semanas versus control.

La FCL afectó el peso en ratas adultas maduras, pero no en la magnitud en que afecta a ratas adultas jóvenes (Ferriz-Martínez y col., 2015). Se conoce que las

lectinas del frijol común tienen efectos sobre el catabolismo proteico incluso lipídico, disminuyendo el tejido muscular de los animales, pero en el caso de la administración de FCL sólo se evalúo el peso y la creatinina sanguínea, considerándose esta última como indicador metabólico proteico y no se encontraron diferencias significativas con respecto al control.

La administración de FCL afectó el peso del páncreas y se confirmó con el análisis de imagen la presencia de hipertrofia pancreática, principalmente de acinos pancreáticos situados en la zona exocrina. La zona endócrina del páncreas fue evaluada y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Anteriormente se había evaluado parámetros bioquímicos del metabolismo glucosídico (glucosa sanguínea) que podrían indicar indirectamente la afectación de la producción de insulina del páncreas en ratas jóvenes tratadas con FCL y no se encontraron diferencias ni en los niveles de glucosa. Además, se determinó alfa amilasa que es un indicador de función pancreática de la zona exocrina y no hubo diferencia significativa, sugiriendo que la FCL no afecta sistémicamente al individuo.

Otro de los efectos observados en otros trabajos es la atrofia al corazón, sin embargo, se realizaron medidas específicas del corazón tanto de altura, ancho, trabécula, lado izquierdo y derecho y no se encontraron diferencias significativas como en el caso de las ratas tratadas a largo plazo que eran más jóvenes siendo la edad un diferencial entre estás etapas y sus efectos adversos. Lo anterior sugiere que en las ratas jóvenes, debido a que están en su etapa de desarrollo y crecimiento, la formación de sus órganos se ve mermada a comparación con animales adultos que ya concluyó su crecimiento.

IX. CONCLUSIONES

El efecto de la administración de la FCL fue diferencial respecto a la edad de los animales. En ratas jóvenes no se observaron los efectos sobre peso corporal que se han observado para ratas adultas. En el presente trabajo se corroboró que la administración de la FCL afecta el peso corporal de ratas adultas maduras.

Los efectos adversos encontrados tras la administración de la FCL de frijol Tépari, fueron la hipertrofia pancreática en la zona endocrina, incremento de vacuolas sugiriendo un incremento de enzimas pancreáticas, atrofia intestinal, estenosis, adelgazamiento del intestino delgado de manera importante, atrofia o hipertrofia de corazón, hipertrofia de estómago, diarrea, piloerección. Se observó activación del sistema inmunológico reflejado en el incremento ligero de pulpa blanca del bazo, un incremento de placas de Peyer específicamente los folículos linfoides presentes en el intestino donde se encuentran activados por el incremento de IL-6 y NFKb.

Al tratar a las ratas durante 6 semanas seguidas de 2 semanas de descanso fue posible observar regresión parcial de la hipertrofia pancreática, aunque en estudios llevados a cabo sobre intestino delgado y colon no muestran efectos reversibles sobre la atrofia intestinal. No se observó efecto adverso sobre páncreas endócrino. El efecto fue únicamente sobre la zona exocrina, sin acumulación de grasa.

Se determinó que las vacuolas acumuladas tras la administración de la FCL se deben probablemente a enzimas pancreáticas. La tripsina disminuyó de manera importante en las ratas tratadas con FCL y una tendencia no significativa de incrementarse la elastasa y en ratas adultas bajo un esquema subcrónico.

Se encontró disminución del peso y altura del corazón en ratas jóvenes, pero no en ratas adultas maduras.

Los hallazgos del presente trabajo permiten determinar que la administración de la FCL presenta efectos diferenciales con la edad, sus efectos no presentan afectación sistémica y están localizados principalmente a nivel de tracto digestivo con

probabilidad de ser reversibles. Resulta importante determinar los efectos a largo plazo relacionados con la edad en cuanto a peso, tamaño del corazón, atrofia intestina, hipertrofia pancreática y efectos inflamatorios.

X. LITERATURA CITADA

Alatorre-Cruz, J. M., Pita-López, W., López-Reyes, R. G., Ferriz-Martínez, R. A., Cervantes-Jiménez, R., de Jesús Guerrero Carrillo, M., Vargas, P., López-Herrera, G., Rodríguez-Méndez, A. J., Zamora-Arroyo, A., Gutiérrez-Sánchez, H., de Souza, T. R., Blanco-Labra, A., … García-Gasca, T. (2017). Effects of intragastrically-administered Tepary bean lectins on digestive and immune organs: Preclinical evaluation. Toxicology reports, 5, 56-64. doi:10.1016/j.toxrep.2017.12.008

Aguilar-Garcia V. VI. Reacciones de aglutinación. Gac Méd Méx, 2004; 140 (3): S50-S52.

Albersheim P, Anderson A.J. Proteins from Plant Cell Walls Inhibit Polygalacturonases Secreted by Plant Pathogens. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971; 68 (8): 1815-1819.

Alemán C.L., Más R.M., Rodeiro I., Noa M., Hernández C., Menéndez R. y Gámez R. Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months. Lab Animals Ltd. 1998; 32: 457-466.

Álvarez Montes de Oca D.M., De la Fuente J.L., Villarrubia Montes de Oca O.l., Menéndez de San Pedro J.C., Ortiz L.E., Actividad biológica de Ricinus communis sobre mosca doméstica (Musca doméstica). Rev Cub Med Trop, 1996; 48 (3): 192-194.

Annabel H. A. Parret, Koen Temmerman, and Rene´ De Mot. Novel Lectin-Like Bacteriocins of Biocontrol Strain Pseudomonas fluorescens Pf-5. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5197–5207.

Antunes, P. L. y Sgarbieri V. Effect of heat treatment on the toxicity and nutritive value of dry bean (Phaseolus vulgaris var. Rosinha (G2)) protein. J. Agric. Food Chem., 1980; 28: 935-938.

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

Banwell JG, Boldt DH, Meyers J, Weber FL Jr. Phytohemagglutinin derived from red kidney bean (Phaseolus vulgaris): a cause for intestinal malabsorption

associated with bacterial overgrowth in the rat. Gastroenterology, 1983, 84 (3):506-515.

Bardocz, S., D. S. Brown, G. Grant, A. Pusztai, J. C. Stewart, and R. M. Palmer, 1992: Effect of the no receptor agonist clenbuterol and phytohaemagglutinin on growth, protein synthesis and polyamine metabolism of tissues of the rat. Br. J. Pharmcol., 1992; 106: 476—482.

Belmar-Casso, R. 1998. Recursos no convencionales en la alimentación de animales no rumiantes. La experiencia del Departamento de Nutrición Animal. Universidad Autónoma de Yucatán, México. pp 10.

Bencomo A., Gómez P., Basanta P. Lectinas. Propiedades biológicas, aplicaciones y perspectivas. Rev Cub de Hematol e Inmunol, 1985; 1(2):130-141.

Bender, A. E., G. B. Reaidi, 1982: Toxicity of Kidney beans (Phaseolus vulgaris) with particular reference to lectins. J. Plant Foods, 1982; 4: 15—22.

Berg J. M., Tymoczko J.L. y Stryer L. Ed. W H Freeman; 2002. Chapter 11. Carbohydrates. 11.4 Lectins are specific carbohydrate-binding proteins. Biochemistry. 5th edition. New York

Bird GMG. Lectins: A hundred year. Inmunohematoloyi, 1988; 4(3):45-48.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72(1-2):248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Campion B., Perrone D., Galasso I. y Bollini R. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines devoid of major lectin proteins. Plant Breeding, 2009; 128: 199—204.

Castillo–Villanueva A., Abdullaev F. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. Rev. Invest. Clín, 2005; 57:56-64.

Choi, S.H.; Lyu, S.Y.; Park, W.B. Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of Akt. Arch. Pharm. Res. 2004, 27, 68–76.

Córdova Dávalos L.E. Glicosilación de proteínas en bacterias patógenas. 2009; 4(3):105-110.

D´Mello, J.P.F. 1995. Anti-nutricional substances in legumes seeds. In: Tropical Legumes in Animal Nutrition. D´Mello, J.P.F. and C. Devendra (Eds.). CAB International. U.K. 1995; 135-165.

Díaz-Gónzalez G.J. Plantas tóxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia. 2010.

J.E. Dillberger, Age-related pancreatic islet changes in Sprague-Dawley rats, Toxicol. Pathol. 1994; 22 (1):48–55, http://dx.doi.org/10.1177/019262339402200107.

Elífio-Esposito S. L., Hess P. L., Moreno A. N., Lopes-Ferreira, M., Ricart C. A. O., Souza M. V., Hasselman-Zielinski F., Becker J. A., Pereira L. F. A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom can adhere to extracellular matrix proteins and induce the rolling of leukocytes. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis., 2007; 13(4):782-799.

Endo Y., Tsurugi K. RNA N-Glycosidase Activity of Ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosome. J Biol Chemistry., 1987; 262(17): 8128-8130.

Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C and Parkin D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int. J. Cancer, 2010: 127, 2893–2917.

Ferriz-Martínez RA, Torres-Arteaga IC, Blanco-Labra A, García-Gasca T. The role of plant lectins in cancer treatment. En: The New Approaches in the Treatment of Cancer. Nova Science Publishers, 2010; 71-90.

Ferriz-Martínez R, García-García K, Torres-Arteaga I, Rodríguez-Méndez AJ, Guerrero-Carrillo MJ, Moreno-Celis U, Angeles-Zaragoza MV, Blanco-Labra A, Gallegos-Corona MA, Robles-Alvarez JP, Mendiola-Olaya E, Andrade-Montemayor HM, García OP, García-Gasca T. Tolerability assessment of a lectin fraction from Tepary bean seeds (Phaseolus acutifolius) orally administered to rats. Toxicology Reports, 2015; 2:63-69.

Freed D. Do dietary lectins cause disease? British Medical J., 1999; 318:1023-1024.

García, D.E., Medina, María G.; Soca, Mildrey; Montejo, I.L. Toxicidad de las leguminosas forrajeras en la alimentación de los animales monogástricos. Pastos y Forrajes, 2005; 28(4): 279-289.

García, D. E., Medina, M. G., Moratinos, P., Cova, L. J., Torres A., Santos, O. y Perdomo, D. Chemical-nutritional characterization of leguminous fodder and other botanic families using descriptive and multivariate analysis. AIA., 2009. 13(2): 25-39.

García P.T., Nordet C.I., Machín G.S. González O.A., Muñíz F.A. Martínez A.G. Aportes al estudio de la drepanocitosis: Análisis clínico y hematológico en los primeros años de la vida. Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter 1999; 15(2): 96-104.

García Rosasco M., Lippi S. y Valverde J. Frecuencia de los grupos sanguíneos A1, A2, Aint, B y O en individuos normales. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2001;17(3):171-174.

García-Gasca T, García-Cruz M, Hernández-Rivera E, López-Martínez FJ, Castañeda-Cuevas AL, Yllescas-Gasca L, Rodríguez-Méndez AJ, Mendiola-Olaya E, Castro-Guillen JL, Blanco-Labra A. Effects of Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Protease Inhibitor and Semipure Lectin Fractions on Cancer Cells. Nutr and Can: An Inter J., 2012; 64(8):1269–1278

Girbés Juan T. Proteínas Inactivadoras de Ribosomas (RIPs) y sus Aplicaciones en la Construcción de Inmunotoxinas para la Terapia Experimental del Cáncer. Anal. Real Acad. Farm. 2000, 66(3):1-21.

González Mejía E. y Prisecaru. Lectins as bioactive plant proteins: A potencial in cancer treatment. Critical Reviews in Food Sciense and Nutrition, 2005; 45:425-445.

Gueguen, J., M.G. van Oort, L. Quillien y M. Hessing. The composition, biochemical characteristics and analysis of proteinaceous antinutritional factors in legume seeds. A review. In: Recentes advances of research in antinutritional factors in legume seeds: proceedings of de Second International Workshop on 'Antinutritional Factors (ANFs) in Legume Seeds', Wageningen, The Netherlands, 1-3 December 1993. Poel, A.F.B. van der, J. Huisman and H.S. Saini (Editors). EAAP Publication no. 70. Wageningen Pers, Netherlands. 1993, 9-30.

Hafez E.S.E. Animales de laboratorio, manual para técnicos. Organización panamericana de la salud. Reproducción e inseminación artificial. Manual de prácticas de fisiología animal. 1987.

Hara T., Mukunoki Y., Tsukamoro I., Miyoshi M., Hasegawa K. Susceptibility of Kintoki bean lectin to digestive enzymes in vitro and its behavior in the digestive organs of mouse in vivo J Nutr Science a Vitaminology 1984, 30(4):381-394.

Hernández Cruz P., Pérez Campos E., Martínez Martínez L., Ortiz B., Martínez G. Las lectinas vegetales como modelo de estudios de las interacciones proteína-carbohidrato. REB, 2005; 24(1): 21-27.

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

Herzing, K. H., Bardocz, S., Grant, G., Nustede, R., Folsch, U. R. and Pusztai, A. Red kidney bean lectin is a potent cholecystodinin releasing stimulus in the rat inducing pancreatic growth. Gut 1997, 41:333-338.

Hiroko O., Yoshitaka G., Takashi K., Takahide O., Yasushi K., Naoyuki I., Yoshio S., Seisuke H., Makoto T. Aralin, a type II ribosome-inactivating protein from Aralia elata, exhibits selective anticancer activity through the processed form of a 110-kDa high-density lipoprotein-binding protein: A promising anticancer drug. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014; 453(1). DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.09.067.

Hohl H. y Balsiger S. Surface glycosyl receptors of Phytophthora megasperma f. sp. glycinea and its soybean host. Botanica Helvetica, 1988; 98(2): 272-277.

Hutt N., Kopferschmitt-kubler M.C. Cabalio J., Purohit A., Alt M. Pauli G. Anaphylactic reactions after therapeutic injection of mistletoe (Viscum álbum L.) Allergology and Immunopathology, 2001; 29(5):201-203.

INEGI “Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero)” datos nacionales. 2017. http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf

Jaffé WG. Hemagglutinis. Toxic Const plant Foodst. 1980:73-102.

Jordinson M. Goodlad R., Brynes A., BlissP., Ghatei M., Bloom S., Fitzgerald A., Grant G., Bardocz S., Pusztai A., Pignatelli M., Callam J. Gastrointestinal responses to

a panel of lectins in rats maintaines on total parenteral nutrition. Am J Physiol: Gast Liver Physiol., 1999; 276:1235-1242.

Jiang Q.L. Zhang S. Tian M., Zhang S.Y., Xie T., Chen D.Y., Chen Y.J., He J. Liu J. Ouyang L. and Juang X. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer grugs in apoptosis and autophagy. Cell Prolif., 2015;48: 17-28.

Kiss R, Camby I, Duckworth D, De-Decker R, Salmon I. In vitro influence of Phaseolus vulgaris, Griffonia simplicifolia, Concanavalin A, wheat germ and peanut agglutinins on HCT-15, LoVo and SW 837 human colorrectal cancer cell growth. Gut, 1997; 40: 253-61.

Lajolo F., Genovese M. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. J Agric Food Chem, 2002; 50: 6592-6598.

León Goñi A. C., Blanco D., Peña A., Ronda M., González B.O. Arteaga M.E., Bada A.M., Gonzalez Y., Mancebo A. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD. Rev electrónica de veterinaria, 2011. 12(11):1-10.

Liener, I.E. 1989. Antinutritional factors in legume seeds: state of the art. In: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. Proceedings of the Firts International Workshop on 'Antinutritional Factors (ANF) in Legume Seeds', Wageningen, The Netherlands

Linda, J. R, Michael, B. L, y William, H. G .“The Molecular Mechanics of P- and L-Selectin Lectin Domains Binding to PSGL-1”. Biophysical Journal. 2004; 86 (1): 544–554.

López-Sánchez C., López-Martínez F.J., Castañeda-Cuevas A., Yllescas-Gasca L., Ferriz Martínez R., Torres Arteaga I., Gallegos-Corona M.A., Rodríguez-Mendez A.J., Mendiola-Olaya E., Blanco-Labra A., García-Gasca T. Evaluación de la toxicidad in vitro de lectinas del frijol Tépari. Ciencia@UAQ, 2010; 3:3-13.

López-Soto J. L., J. A. Ruiz C., J. J. Sánchez G. y R. Lépiz I. Adaptación climática de especies de frijol silvestre (Phaseolus spp.) en la República Mexicana. Revista Fitotecnia Mexicana. 2005; 28:221-230.

Merlín Linares J.C., Arce Hernández A.A., Leyva Rodríguez A., González J.M. y Villaescusa Blanco R. Lectina de unión a manosa: actividad biológica y significado. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2006; 22(3).

Micucci H.A. y Camps E. Lectinas: Obtención, Estructura Química, Propiedades y Aplicaciones Diagnósticas y Farmacológicas. Acta Farm. Bonaerense, 1987; 6(1): 35-54.

Montoya Ureta A., Ten Morro J., Mendiola Olivares J., Guerrero Villena, J., Bernabeu Pérez R. Utilidad de las lectinas en el estudio de espermatozoides. Andrología, 2008; 25(4): 257-266.

Moreno-Celis U., López-Martínez J., Blanco-Labra A., Cervantes-Jiménez R., Estrada-Martínez L.E., García-Pascalin A.E., Guerrero-Carrillo M.J., Rodríguez-Méndez A.J., Mejía C., Ferriz-Martínez R.A.* y García-Gasca T*. Phaseolus acutifolius Lectin Fractions Exhibit Apoptotic Effects on Colon Cancer: Preclinical Studies Using Dimethilhydrazine or Azoxi-Methane as Cancer Induction Agents. Molecules 2017; 22: 1-17.

Muñoz J.A., Llovo M. R., Fábregas Longo J. Temas de microbiologia lectinas: Panorámica General. Documentos didácticos 155, IUCE, Universidad, Santiago de Compostela, 1993; 4:93-115.

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

Navarro Y. y Pérez G. Rev Colombiana Química,1978; 8: 25-43.

Ologhobo, A.D., Apata, D.F. y Oyejide, A. Utilisation of raw jackbean (Canavalia ensiformis) and jackbean fractions in diets for broiler chicks. British Poultry Science. 1993; 34:323-337.

Osborn, T. C., D. C. Alexander, S. S. Sun, C. Cardona, and F. A. Bliss. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. Science, 1988; 240: 207—210.

Osman M., Reid P., Weber Ch. The effect of feeding Tepary Bean (Phaseolus acutifolius) proteinase inhibitors on the growth a pancreas of Young mice. Pakistan J Nutr, 2003; 2(3):111-115.

Palmer, R. M., A. Pusztai, P. Bain, and G. Grant, 1987: Changes in rates of tissue protein synthesis in rats induced in vivo by consumption of kidney bean lectins. Comp. Biochem. Physiol., 1987; 88C: 179—183.

Pinzón M.L., Díaz L.E., Ortiz B.L, Umaña A., de Rodríguez S.C., de Gómez M.S., Activation of the PI3K/AKT signalling pathway by insulin-like growth factor type ii stimulates metalloproteinase 9mRNA expression in choriocarcinoma cells. Rev. Colomb. Quim., 2009; 38(3): 341-362. ISSN electrónico 2357-3791. ISSN impreso 0120-2804.

Pita R., Anadón A y Martínez-Larrañaga M.R. Ricina: una fitotoxina de uso potencial como arma. Rev Toxicol., 2004; 21:51-63.

Pusztai, A. Biological effects of dietary lectins. In: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. Proceedings of the Firts International Workshop on 'Antinutritional Factors (ANF) in Legume Seeds', Wageningen, The Netherlands November 23-25, Huisman, J., T.F.B. van der Poel and I.E. Liener (Editors). Pudoc Wageningen, Netherlands. 1989, 17-29.

Pusztai A, Watt WB, and Stewart JC: Erithro- and lymphoaglglutinins of Phaseolus acutifolius. Phytochem, 1987; 26, 1009–1013.

Pusztai A. Nutritional toxicity of kidney vean (Phaseolus vulgaris) Rep. Rowett Inst, 1989; 36:110.

Pusztai, A., Plantf Lectins, Cambridge University Press, Cambridge, 1991: 1—263.

Pusztai, A., G. Grant, R. J. Spencer, T. J. Duguid, D. S. Brown, S. W. B. Ewen, W. J. Peumans, E. J. M. Van Damme, and S. Bardocz. Kidney bean lectin-induced Escherichia coli overgrowth in the small intestine is blocked by GNA, a mannose-specific lectin. J. Appl. Bacteriol., 1993; 75: 360—368.

Pusztai, A., G. Grant, T. Duguid, D. S. Brown, W. J. Peumans, E. J. M. Van Damme, and S. Bardocz. Inhibition of starch digestion by a-amylase inhibitor reduces the efficiency of utilization of dietary proteins and lipids and retards the growth of rats. J. Nutr., 1995; 125:1554—1562.

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

Quesada S. Nanne C. I., González L. Lectins of Erythrina poeppigianaand Erythrina steyermarkii (Leguminosae): characterization and mitogenic effect. Rev. Biol. Trop., 1998, 46(4): 1039-1046.

Radberg K., Biernat M., Linderoth A., Zabielski R., Pierzynowski G.S., Westrom B.R. Enteral exposure to crude red kidney vean lectin induces maturation of the gut in suckling pigs. J Animal Science., 2001; 79:2669-2678.

Rey D.P., Ospina L.F., Aragón D.M. Inhibitory effects of an extract of fruits of Physalis peruviana on some intestinal. Carbohydrases . Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., 2015, 44(1): 72-89.

Reyes Rocha B.L. Efecto de la administración de la fracción concentrada en lectinas de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre el sistema inmune. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicna Universidad Autónoma de Querétaro. 2011.

Reynoso Camacho R., González de Mejía E., Loarca Piña G. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from Tépari vean (*Phaseolus acutifolius*). Food. Chem. Toxicol, 2003: 41(1):21-27.

Rhodes J.M. Beans means lectins Gut.1999; 44: 493.594.

Ros-Berruezo G., Periago-Castón M.J. y Pérez Condesa D. Tratado de Nutrición. Tomo II. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Cap. 6. Legumbres, verduras y productos hortícolas. Editorial Médica Panamericana S.A. 2da. Edición. España, 2010 pp. 141-165.

Ruiz Bedolla E. y Fuentes Peña A. M. Evaluación de la Biometría hemática en la rata de laboratorio. Rev Mex de Patolog Clin, 1996; 43(2): 80-85.

Sában-Ruíz J. Control Global del Riesgo cardiometabólico. La disfunción endotelial como diana preferencial. Volumen 1. Pimera edición. 2012.

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

Schumacher U, Stamouli A, Adam E, Peddie M, Pfuller U. Biochemical, histochemical and cell biological investigations on the actions of mistletoe I, II and III with human breast cancer cell lines. Glycoconj J, 1995; 12: 250-257.

Sasaki T1, Kuniyasu H, Luo Y, Kitayoshi M, Tanabe E, Kato D, Shinya S, Fujii K, Ohmori H, Yamashita Y. AKT activation and telomerase reverse transcriptase expression

are concurrently associated with prognosis of gastric cancer. Pathobiology. 2014;81(1):36-41. doi: 10.1159/000351721.

Singh H, Partha Sarathi S. Insight of lectins- a review. Inter J Scien Engin Research, 2012; 3(4): 2-8.

Sotelo Rhodes J.M. Beans means lectins Gut.1999; 44: 493.594.

Taconic Biosciences, Inc. Sprague Dawley Outbred Rat for Medical, Toxicology, Pharmacology. http:wwwsotelo
.taconic.com/sd.

The World Health Report, 2002: Quantifying Selected Major Risks to Health, Chapter 4, page 4. Available at: http://www.who.int/whr/2002/chapter4/en/index3.html.

Van Lis J.M., Kalsbeek G.L. The interaction between human spermatozoa and the lectin Concavalin A. Andrología, 1973; 5(1):45-57.

Vázquez-Luna A., Rivadeneyra-Domínguez E. y Díaz-Sobac R. Fruit and edible plants lectins: A new possibilities of interaction of food science and biomedicine. Ciencia UAT, 2012; 23(1):60-66.

Velasquez J. G., Barajas P., Marcos J., Jiménez-Movilla M., Gutiérrez-Gallego R., Ballesta J., Avilés M. y Coy P. Interacción espermatozoide-zona pelúcida en la especie bovina: papel del ácido siálico y del enzima neuraminidasa, 2005; 1-3.

Weis W. Drikamer K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. Annu Rev Biochem, 1996; 465: 473.

Welch, R. M., R. D. Graham. Breeding for micronutrient in staple food crops from a human nutrition perspective. J. Exp. Bot. 2004; 55: 353—364.

Welch, R. M., W. A. House. Factors affecting the bioavailability of mineral nutrients in plant foods. In: R. M. Welch, and W. H. Gabelman (eds), Crops as Sources of Nutrients for Humans, American Society of Agronomy, Madison, WI., 1984: 37—54.