



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Doctorado en Ciencias de la Salud

Efecto de la administración de la fracción concentrada en lectinas de frijol Tépari
(*Phaseolus acutifolius*) sobre el sistema inmune.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias de la Salud

Presenta:

M. en C.E. Blanca Lilia Reyes Rocha.

Dirigido por:

Dra. en C. Adriana Jheny Rodríguez Méndez

SINODALES

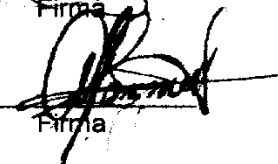
Dra. en C. Adriana Jheny Rodríguez Méndez
Presidente


Firma

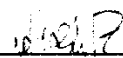
Dra. en C. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Secretario


Firma

Dr. en C. Alejandro Blanco Labra
Vocal

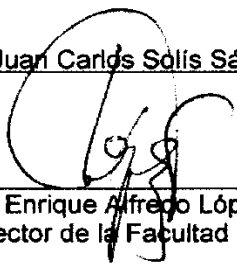

Firma

Dr. en C. Carlos Saldaña Gutiérrez
Suplente


Firma

Dr. en C. Juan Carlos Solís Sáinz
Suplente


Firma


Med. Esp. Enrique Alfredo López Arvizu
Director de la Facultad


Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro.
Octubre, 2011
México

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA FACULTAD DE MEDICINA EN EL
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR, Y EN LA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR, DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ADRIANA JHENY
RODRÍGUEZ MÉNDEZ

RESUMEN

A través de estudios *in vitro* e *in vivo* se ha establecido que algunas lectinas vegetales actúan como inmunomoduladores y como mitógenos sobre linfocitos T. En este estudio se determinó el efecto de la administración de la fracción concentrada de lectinas (FCL) de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre el sistema inmunitario de rata (leucocitos en sangre periférica y en el timo y el bazo). Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho (14 semanas de edad). Se formaron cuatro grupos de animales, 2 grupos con tratamiento subcrónico (6 semanas) de FCL, uno con la dosis de 25 mg/kg y otro con 50 mg/Kg y sus respectivos controles sin lectina (solución salina al 0.9%). Después del sacrificio por decapitación, se colectaron muestras de sangre para recuento de células inmunes y los tejidos linfoides (bazo y timo) para el análisis histopatológico, así como para la determinación de la proliferación mediante inmunohistoquímica. No se observaron efectos antinutricios significativos en los animales tratados ni efectos tóxicos en los tejidos analizados. El recuento de células inmunes no mostro diferencias significativas con la administración lectina (D25FCL y D50FCL). El análisis histopatológico en el bazo mostró un aumento significativo ($p<0.05$) del número de centros germinales y una disminución significativa ($p<0.05$) del diámetro de los mismos, después de 2 semanas de tratamiento con la FCL (50 mg/Kg). Se observaron células positivas a PCNA en los centros germinales de los animales tratados con ambas dosis (25 y 50 mg/Kg) de FCL. El peso del timo disminuyó significativamente ($p<0.05$) en la semana 4 de tratamiento con la dosis de 50 mg/Kg. A nivel histopatológico, la corteza y médula del timo no mostraron cambios significativos, ni células positivas a PCNA. Estos resultados sugieren que la fracción concentrada de lectinas (50 mg/Kg) tiene un efecto mitogénico diferencial, ya que se observó evidencia de la proliferación celular en el bazo, donde las células inmunitarias son competentes, a diferencia del timo que contiene células T precursoras y no se observó su proliferación.

(Palabras clave: lectinas vegetales, inmunomodulador, mitógeno, sistema inmune)

SUMMARY

In vitro and in vivo studies have been established that some plant lectins act as immunomodulators and as mitogens on T lymphocytes. In this study, was determined the effect of administration of the concentrated fraction tepary bean lectin (*Phaseolus acutifolius*) on the rat immune system (leukocytes in peripheral blood and in the thymus and spleen). It was used male Sprague Dawley rats (14 weeks of age). It was formed four groups of animals, 2 subchronic treatment groups (6 weeks) lectin, One with a dose of 25 mg / kg and the other one with 50 mg / kg, and their respective controls without lectin (we used 0.9% saline). After sacrifice by decapitation, blood samples were collected for counting of immune cells and lymphoid tissues (spleen and thymus) for histopathological analysis and for determination of proliferation by immunohistochemistry. No effects were observed in animals treated antinutritious or toxic effects in the tissues analyzed. Immune cell counts showed no significant differences with the administration of lectin. Pathologic findings in the spleen showed a significant increase ($p < 0.05$) the number of germinal centers and a significant ($p < 0.05$) the diameter of the same in week 2 of treatment with a dose of 50 mg / kg. There were PCNA positive cells in germinal centers of the animals treated with both doses (25 and 50 mg / kg). The thymus weight decreased significantly ($p < 0.05$) at week 4 of treatment with the dose of 50 mg / kg. At histopathology the cortex and medulla of the thymus showed no significant change or PCNA positive cells. These results suggest that lectins concentrated fraction (50 mg / kg) has a differential mitogenic effect, because in the spleen immune cells are fully differentiated with respect to the thymus, where there was no proliferation.

(Keywords: plant lectins, immunomodulator, mitogen immune system)

INDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	3
2.1 Lectinas.....	3
2.1.1 Origen del estudio de las lectinas.....	3
2.1.2 Clasificación y actividad biológica de las lectinas.....	4
2.1.3 Estructura y aplicación de las lectinas.....	6
2.1.4 Las lectinas vegetales mediadoras de la respuesta inmune contra el cáncer.....	9
2.1.5 Lectinas vegetales con potencial efecto antitumoral y anticarcinógeno... ..	11
2.2 Frijol Tépari (<i>Phaseolus acutifolius</i>).....	13
2.2.1 Descripción botánica y fitogeografía.....	13
2.2.2 Usos y valor nutricional del frijol Tépari.....	15
2.2.3 Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> con una fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari.....	15
2.3 Sistema Inmune.....	16
2.3.1 Timo.....	17
2.3.1.1 Índice corteza-médula.....	20
2.3.2 Bazo.....	20
2.5 La respuesta inmune.....	21
2.6 Sistema inmune y cáncer.....	22
III. JUSTIFICACIÓN.....	24
IV. HIPÓTESIS.....	25
V. OBJETIVOS.....	25
5.1 General.....	25
5.2 Específicos.....	25
VI. METODOLOGÍA.....	26
6.1 Materiales.....	26
6.2 Métodos.....	26
6.2.1 Preparación de las muestras.....	26
3.2.1.1 Animales, muestras de sangre y tejidos del sistema inmune.....	26
3.2.1.2 Evaluación del peso de los animales y tejidos.....	28
6.2.2. Recuentos de células inmunes.....	28
6.2.3. Histología del bazo y timo con hematoxilina y eosina (HyE).....	28
6.2.4 Determinación de la proliferación celular en bazo y timo.....	29
3.2.4.1 Inmunohistoquímica.....	29
6.2.5 Análisis estadístico.....	30
6.3 Consideraciones éticas.....	26
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
7.1 Evaluación del efecto de la FCL en el peso de las ratas tratadas.....	27
7.2 Análisis de las células inmunitarias circulantes de ratas tratadas con FCL.....	28
7.3 Análisis del efecto de la FCL en bazo y timo de ratas.....	29
7.4 Distribución del marcador PCNA en bazo y timo.....	46
VIII. CONCLUSIONES.....	51
IX. BIBLIOGRAFIA.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Clasificación de las lectinas vegetales según su especificidad hacia monosacáridos.....	6
2	Aplicación de las lectinas como herramientas en las ciencias básicas y médicas.....	9
3	Componentes de la inmunidad innata y adaptativa.....	22
4	Grupos de estudio.....	27
5	Esquema de sacrificios.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática de las estructuras tridimensionales en lectinas.....	7
2	Descripción botánica de <i>Phaseolus acutifolius</i>	14
3	Características de la semilla de <i>Phaseolus acutifolius</i>	14
4	Características anatómicas de timo.....	17
5	Características anatómicas del bazo.....	20
6	Evaluación del peso de las ratas tratadas.....	32
7	Células inmunitarias circulantes en sangre periférica.....	33
8	Peso de órganos linfoides.....	35
9	Análisis histológico de tejidos inmunes.....	37
10	Número de centros germinales y número de vainas linfoides en bazo.....	39
11	Centros germinales en bazo.....	41
12	Diámetro de centros germinales y diámetro de vainas linfoides en bazo.....	42
13	Cambios histológicos e corteza y médula de timo.....	45
14	Inmunohistoquímica de bazo (semana 2 de tratamiento).....	47
15	Inmunohistoquímica de bazo (semana 4 de tratamiento).....	46
16	Inmunohistoquímica de bazo (semana 6 de tratamiento).....	48
17	Inmunohistoquímica de bazo D25FCL y D50FCL.....	48
18	Inmunohistoquímica de timo.....	49

I. INTRODUCCIÓN.

Las lectinas constituyen un grupo de proteínas de origen no inmune presentes en mamíferos, vegetales y algunos microorganismos. 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 (Castillo y Abdullaev, 2005).

Se sabe que algunas lectinas de origen vegetal (concanavalina A, Fitohemaglutinina) actúan como inmunomoduladores y tienen capacidad mitogénica, por lo que estimulan la generación de linfocitos T. Así mismo, otras lectinas como la purificada de la planta de muérdago, presentan propiedades citotóxicas diferenciales y antitumorales sobre células cancerígenas (Hernández *et al.*, 1999).

Los trabajos *in vitro* realizados por nuestro grupo de investigación con la fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari sobre diferentes líneas celulares de cáncer demostró que posee un efecto citotóxico diferencial sobre las células normales y cancerígenas en función de las concentraciones utilizadas (Hernández *et al.*, 2007). Además inhibe el crecimiento de diferentes líneas celulares cancerígenas, presentándose mayor sensibilidad sobre las células de cáncer de colon (Castañeda *et al.*, 2007; López, 2007). Así mismo, se encontró que en rata, la dosis de 50 mg/peso corporal, estimulo el sistema inmune, incrementando el número de leucocitos (Rodríguez, 2008). Sin embargo, se desconoce si el efecto de esta lectina sobre sistema inmune implica cambios en la proliferación celular de células inmunes en sangre periférica y en tejidos linfoides.

Se sabe que la “vigilancia inmunológica” juega un papel muy importante en la presencia de mutaciones y/o aberraciones que provocan una proliferación celular anormal que puede degenerar en un tumor. En esta respuesta inmune al cáncer participan varias poblaciones de células linfoides como son los linfocitos T

citotóxicos, células NK y macrófagos, así como también citocinas (IL-1, TNF α ; entre otras). Dentro de este contexto cobra relevancia la activación de la proliferación de linfocitos a través de un mitógeno como las lectinas (Alberts *et al.*, 1996).

De ahí que el presente estudio estuvo orientado a determinar el efecto de la administración de la fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre la proliferación de células inmunes en sangre periférica y en órganos linfoides (timo y bazo) en rata. Los resultados del mismo aportan información que podría utilizarse en investigaciones posteriores sobre los efectos terapéuticos de esta lectina sobre el cáncer.

I. REVISIÓN DE LITERATURA.

En el presente capítulo se abordan los antecedentes históricos del estudio de las lectinas así como su clasificación en función de su origen (animal, vegetal, microorganismos) y especificidad hacia monosacáridos. De igual forma se presenta una revisión general sobre el sistema inmune, sus estructuras principales y función en el organismo.

2.1 Lectinas.

Las lectinas son un grupo de proteínas de origen no inmune presentes en la mayoría de los seres vivos, tanto en animales, plantas y microorganismos, como bacterias, protozoarios y virus (Freed, 1999). Tienen la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a los carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas (Sharon y Lis, 2004). Estas proteínas pueden presentar dos o más dominios de reconocimiento, lo que les permite aglutinar a las células a las que se unen, por ejemplo eritrocitos y leucocitos (Riaño, 2005).

En forma común, las lectinas son proteínas globulares altamente resistentes a la digestión por las enzimas proteolíticas de los mamíferos (Rhodes, 1999). También presentan una unión efectiva con los receptores de superficie de las células epiteliales del intestino, por lo que algunas lectinas pueden tener efectos antinutricios (Lajolo y Genovese, 2002). Además, en condiciones nativas resisten la degradación por bacterias (Pusztai y Bardocz, 1996), por lo que sobreviven al paso a través del tracto digestivo y permanecen en su forma biológica e inmunológica intactas (Lajolo y Genovese, 2002; Rhodes, 1999).

2.1.1 Origen del estudio de las lectinas.

El primer estudio sobre proteínas aglutinantes lo reportó Stillmark en 1888 (Sharon y Lis, 2004) al observar el fenómeno de hemaglutinación con extractos de semilla de *Ricinus communis*, cuya proteína llamada Ricina aglutina a eritrocitos.

Posteriormente, Hellín estudiando semillas de *Abrus precatorius* encontró otra proteína que también producía aglutinación de eritrocitos llamada Abrina (Castillo y Abdullaev, 2005).

Fue hasta el año de 1919 que se obtuvo la primera lectina en forma cristalina, descubierta por James B. Summer a partir del frijol de *Canavalia ensiformis* llamada concanavalina A. En la década de los años 40, dos investigadores, Rose M. Reguera y William C. Boyd, reportaron que ciertas semillas contenían aglutininas específicas para antígenos de los grupos sanguíneos humanos. En 1954, Boyd fue el primero en plantear el término lectina (del latín *legere=escoger/elegir*), al observar que algunas aglutininas obtenidas de semillas de plantas podían reconocer a un grupo sanguíneo específico y aglutinarlo (Hernández *et al.*, 2005). En la década de 1960, Peter C. Nowel encontró que la lectina del frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*), al igual que otras lectinas (concanavalina A), poseían la capacidad de estimular la proliferación de linfocitos (Sharon y Lis, 2004).

2.1.2 Clasificación y actividad biológica de las lectinas.

De acuerdo con su distribución en la naturaleza, las lectinas han sido clasificadas en (Sharon y Lis, 2004):

a) *Lectinas animales*. Se han encontrado en la hemolinfa y órganos sexuales de animales invertebrados como: caracoles, cangrejos, camarones, moluscos, peces y lombrices, y también en animales vertebrados como el cerdo.

Existen lectinas en animales conocidas con el nombre de galectinas, las cuales constituyen una familia de proteínas extremadamente conservadas a través de la evolución. Investigaciones recientes han demostrado que estas proteínas juegan un papel fundamental en procesos relacionados a la regulación de la respuesta inmune, tales como adhesión linfocitaria, crecimiento celular, producción de

citocinas y regulación de la muerte celular programada (Ravinovich y Rubinstein, 2001).

De igual forma, en diversas especies animales se han reportado evidencias de que las lectinas participan en fenómenos tales como el reconocimiento y eliminación de glicoproteínas; tanto del sistema circulatorio como de células envejecidas y microorganismos mediante un proceso de opsonización y la participación de células con actividad fagocítica (Pusztai y Bardocz, 1996).

b) Lectinas microbianas. Existe un tipo de lectinas que se localiza en la superficie de microorganismos tales como bacterias, virus, hongos y parásitos y se les denomina adhesinas. Juegan un papel importante al colonizar mucosas produciendo lesiones tisulares (Van *et al.*, 2000).

c) Lectinas vegetales. Se encuentran específicamente en los cotiledones y endospermos de las semillas de algunos vegetales como el trigo, frijol, soya, entre otros. Entre las lectinas vegetales mejor conocidas están (Riaño, 2005):

- La concanavalina A, que es una proteína que se obtiene de *Canavalia ensiformis* y actúa específicamente uniéndose a restos de α -D-glucosa y α -D-manosa.
- La aglutinina de germen de trigo cuyo sitio de unión es con los ácidos α -N-acetilneuramínico y α -N-acetilneuramínico.
- Fitohemaglutinina (PHA), se encuentra en el frijol rojo, *Phaseolus vulgaris*. Se sabe que tiene acción mitogénica (estimuladoras del ciclo celular) y tiene la capacidad de aglutinar específicamente células cancerígenas, lo cual ha desarrollado un gran interés en investigación para utilizarlas como tratamiento para el control en el crecimiento de tumores.

Las lectinas vegetales participan en las interacciones entre las bacterias fijadoras de nitrógeno con la raíz de plantas de leguminosas, además poseen actividad mitogénica y pueden tener efectos protectores en contra de la acción patogénica de algunos organismos simples como los nematodos herbívoros. Así mismo, se caracterizan por reconocer específicamente carbohidratos por interacciones de puentes de hidrógeno, iones, interacciones hidrofóbicas entre otras (Machuka *et al.*, 1999).

Las lectinas vegetales han sido objeto de otras clasificaciones en función de su especificidad hacia el monosacárido que inhibe su actividad hemaglutinante (Tabla 1) y hacia las estructuras de oligosacáridos que reconocen (Hernández *et al.*, 2005).

Tabla 1. Clasificación de las lectinas vegetales según su especificidad hacia monosacáridos.*

LECTINA	ABREVIATURA	MONOSACARIDO QUE UNEN
<i>Canavalia ensiformis</i> <i>Lens culinaris</i>	ConA LCA	α -D-manosa, α -D-glucosa
<i>Ricinus communis</i> <i>Glycine max</i> <i>Arachis hypogaea</i> <i>Amaranthus leucocarpus</i>	RCA SBA PNA ALL	β -galactosa N-acetil- α -D-galactosamina
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	N-acetil- β -D-glucosamina
<i>Lotus tetragonolobus</i> <i>Ulex europeus</i>	LTA UEA	α -D-fucosa
<i>Limulus polyphemus</i>	LPA	α -N-acetilneuramínico

*Tomado de Hernández *et al.*, 2005.

2.1.3 Estructura y aplicación de las lectinas.

A través de datos cristalográficos se ha logrado obtener la estructura molecular de algunas lectinas vegetales (Figura 1). Por medio de esta representación tridimensional se ha llegado a establecer que las lectinas vegetales presentan en común hojas β antiparalelas y α hélices en sus sitios de reconocimiento a

carbohidratos. Además, con base en su estructura, las lectinas han sido clasificadas en (Hernández *et al.*, 2005):

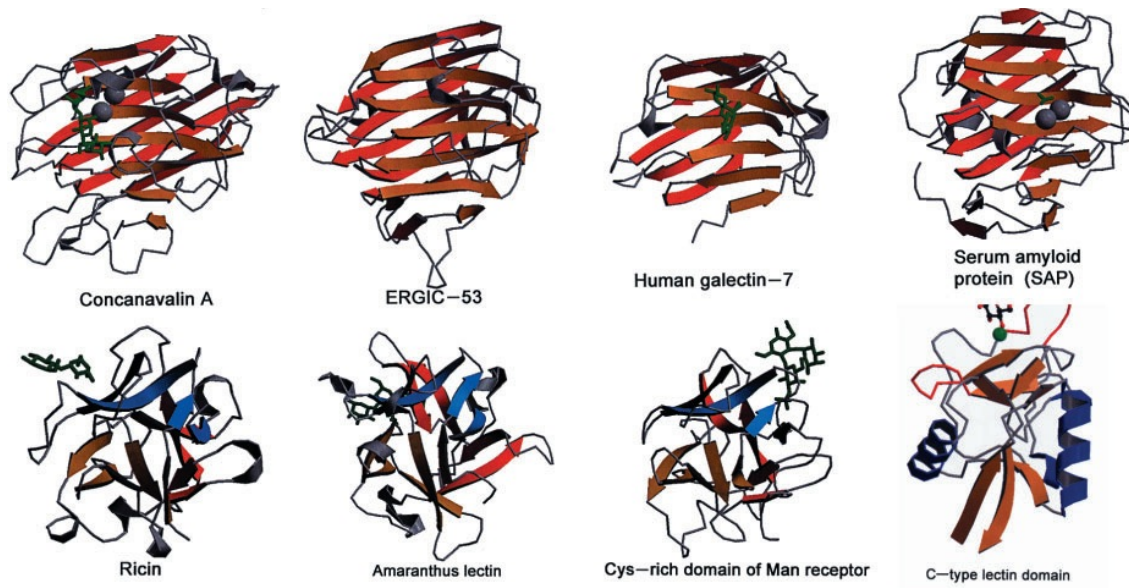


Figura1. Representación esquemática de las estructuras tridimensionales en lectinas. Tomado de Sharon y Lis, 2004

1.- Lectinas aisladas de leguminosas. Generalmente se encuentran constituidas por dos o cuatro subunidades idénticas de 25 a 30 kDa, cada una de las cuales contiene un sitio de unión para iones metálicos Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} . Una subunidad está constituida por doce hojas β antiparalelas conectadas entre sí mediante bucles, lo que genera una estructura aplanada en forma de domo, cuatro bucles localizados en la parte superior del monómero forman el sitio de reconocimiento a carbohidratos.

2.- Lectinas con dominios tipo heveína o específicas de quitina. A diferencia de las lectinas de leguminosas, este grupo de lectinas generalmente presentan dos subunidades idénticas ricas en cisteínas. Una subunidad está constituida por cuatro dominios tipo heveína, con cuatro puentes disulfuros, lo que origina que no existan estructuras secundarias regulares a excepción de una pequeña α hélice de

cinco residuos. Cada dominio de una subunidad presenta un sitio de reconocimiento a carbohidrato y no necesita la presencia de iones metálicos.

3.- *Lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa.* Estas lectinas son tetraméricas, cada monómero tiene un peso molecular de 12 kDa, el sitio de reconocimiento a carbohidrato está constituido por cuatro hojas β antiparalelas unidas entre sí por giros.

4.- *Lectinas en forma de prisma β o del tipo jacalina.* Son lectinas tetraméricas glicosiladas, donde cada subunidad contiene una cadena pesada (β) y una cadena ligera (β), y está constituida por tres hojas β antiparalelas arregladas a manera de un prisma triangular.

5.- *Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas.* Forman parte de los venenos más tóxicos y su estructura molecular es compleja. Están constituidas por dos cadenas, la A y B, las cuales son diferentes y se encuentran unidas por dos puentes disulfuro. La cadena A es la responsable de la toxicidad (actividad de N-glicosidasa sobre el ribosoma que inactiva la traducción), mientras que la cadena B posee la actividad de lectina. La cadena B está constituida por dos dominios que presentan cuatro subunidades, las cuales contienen α hélices y hojas β .

6.- *Lectinas tipo amaranto.* Cada proteína se encuentra formada por dos monómeros en los que existen dos dominios amino y carboxilo, unidos por una pequeña hélice 103, cada dominio muestra una conformación de trébol β semejante a la conformación observada en la cadena B de la lectina de *Ricinus communis*.

Por otra parte, con respecto a su aplicación se tiene que las lectinas son consideradas armas valiosas en el campo de la genética, la biología, la medicina y la inmunología (Tabla 2) (Gabious, 2001; Hernández *et al.*, 1999).

Tabla 2. Aplicaciones de las lectinas como herramientas en las ciencias básicas y médicas.*

<p><i>Bioquímica</i> Detección de epítopes de carbohidratos definidos de glicoconjugados. Purificación de glicoconjugados reactivos con lectina por su afinidad cromatográfica. Caracterización de carbohidratos.</p>
<p><i>Biología celular</i> Caracterización de los glicoconjugados presentes sobre la superficie celular. Fraccionamiento de poblaciones celulares. Modulación de la proliferación y activación celular.</p>
<p><i>Medicina</i> Detección de enfermedades relacionadas con alteraciones en la síntesis de carbohidratos. Tipificación del grupo sanguíneo. Marcadores celulares para el diagnóstico de infecciones (virus, bacterias, hongos, parásitos).</p>

* Modificado de Rüdiger y Gabius, 2001.

2.1.4 Lectinas vegetales mediadoras de la respuesta inmune contra el cáncer.

En la respuesta inmune contra el cáncer participan varias poblaciones de células linfoides como los linfocitos T citotóxicos, células natural killer (NK), macrófagos, etcétera, además de citocinas proinflamatorias como la Interleucina 1(IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), entre otras (Alberts, 1996). Se sabe que la activación de estas poblaciones celulares, así como la producción de estos factores solubles se puede dar a través de su estimulación con lectinas vegetales.

Algunas lectinas vegetales se han caracterizado por estimular la respuesta inmune contra el cáncer a partir de inducir la producción de citocinas como el TNF α , la interleucina 1 (IL-1), 6 y 12 y el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF, por sus siglas en inglés). De igual forma se ha encontrado que ante la presencia de lectinas existe un aumento en la actividad fagocítica de granulocitos y la actividad antitumoral de las células NK contra células tumorales (Gabious, 2001). Algunas de ellas pueden presentar actividad mitogénica y, por lo tanto, estimular la proliferación de linfocitos T y B (Boldth y McDermott, 1975).

Las siguientes son algunas de las lectinas vegetales que favorecen la activación de la respuesta inmune contra el cáncer.

- La concanavalina A (CoA) y la fitohemaglutinina (PHA) son dos lectinas vegetales que han sido ampliamente estudiadas. Ambas se obtienen de leguminosas y se caracterizan porque estimulan la activación del sistema inmune a través de la producción de citocinas como el $TNF\alpha$, IL-1, IL-6, IL-12, y el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF). De igual forma se conoce que presentan actividad mitogénica, es decir estimulan la proliferación de linfocitos T y B (Sharon y Liz, 2004).
- Otra lectina vegetal que ha sido objeto de diversos estudios es la que se obtiene del muérdago europeo (ML), de la cual se sabe que actúa como un potente inmunomodulador al incrementar los mecanismos de respuesta inmune del huésped. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que la lectina del muérdago, a través de diferentes mecanismos de señalización celular, activa a los macrófagos para que secreten $TNF\alpha$, lo que podría coadyuvar en la disminución del crecimiento de tumores y prevenir la metástasis (Park *et al.*, 2010).
- El ajo (*Allium savitum*) es una hortaliza de uso común en la dieta de la población mexicana, sus propiedades moduladoras de la respuesta inmune han sido bien establecidas en estudios *in vivo* utilizando ratas como modelo experimental. Se sabe que el ajo crudo contiene tres lectinas: QR-1, QR-2, QR-3, las cuales muestran efectos sobre el sistema inmune activando la proliferación de linfocitos T en sangre periférica así como la proliferación de células inmunes en órganos linfoides como el bazo (esplenocitos murinos) y el timo (timocitos) (Clement *et al.*, 2010).
- La lectina del muérdago de Corea (KML) es uno de los componentes activos del *Viscum l.*, variedad *Coloratum*, una planta depredadora que parasita en el tallo de árboles y arbustos. Se sabe que esta lectina

activa la proliferación de células NK, la proliferación de linfocitos T y B y aumenta la citotoxicidad mediada por macrófagos. Lo anterior le hace ser una lectina con un potencial de aplicación en el tratamiento del cáncer a través de la activación de la respuesta inmune del huésped sobre células cancerígenas (Lee *et al.*, 2009).

- Estudios realizados *in vitro* con la lectina de *Abrus precatorius*, demuestran que esta leguminosa presenta propiedades sobre la modulación de la respuesta inmune dado que activa la producción de citocinas como la interleucina 2, interferon gama (IFN γ) y TNF α e induce la respuesta inmune celular, activando linfocitos T efectores (Th1) e incrementando los valores de óxido nítrico que favorece la activación de macrófagos (Bhutia *et al.*, 2009).

2.1.5 Lectinas vegetales con potencial efecto antitumoral y anticarcinógeno.

A través de diversos estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que las lectinas actúan como mediadores en la metástasis del cáncer, y tienen participación en eventos apoptóticos. Ejemplo de lo anterior son los resultados obtenidos con las lectinas vegetales que a continuación se presentan:

- Lectina del muérdago europeo (ML). Además de ser un inmunomodulador (induce la producción de TNF α , IL-1 e IL-6), también puede activar a la caspasa-8 e inducir muerte celular programada en las células cancerígenas. La inducción de apoptosis se debe a que esta lectina inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas en células malignas; esta respuesta no se observa en células normales, lo cual sugiere un efecto diferencial en el reconocimiento de la lectina sobre células malignas (Castillo y Abdullaev, 2005).
- Lectina de la semilla de *Bauhinia variegata*. Inhibe la proliferación de células cancerígenas de mama (MCF-7) y de hepatoma (HeoG2), además de inhibir la actividad de la transcriptasa inversa del VIH-1 (Lin y Ng, 2008).

- Lectina del muérdago de Corea (KML) (*Viscum álbum coloratum*). El estudio *in vivo* de esta lectina muestra sus efectos antitumorales sobre líneas celulares de melanoma, carcinoma de colon y linfoma, así como el efecto profiláctico de metástasis pulmonar experimental inducida. Animales tratados con la lectina de KML mostraron una mayor actividad de macrófagos sobre células cancerígenas en la cavidad peritoneal y la activación de células NK. Estos resultados sugieren que la lectina de KML presenta efectos sobre el sistema inmune activando a las células NK y a los macrófagos, lo que mejora la respuesta del sistema de defensa del huésped contra células cancerígenas mostrando efectos profilácticos y terapéuticos contra la metástasis del tumor (Castañeda *et al.*, 2007).
- Lectina de *Abrus precatorius*. En estudios *in vitro* ha demostrado tener actividad antiproliferativa selectiva en varias líneas celulares sin presentar ningún efecto citotóxico sobre células normales; además los resultados *in vivo* muestran la presencia de actividad antitumoral potente de esta lectina sobre el linfoma de Dalton (DL) en ratones. Así mismo, induce la apoptosis de células cancerígenas a través de la regulación positiva de Bax y activación de la caspasa-3, que son proteínas que participan en mecanismos de señalización en la apoptosis (Yoon *et al.*, 2003).
- Lectina concanavalina A. Presenta un potencial efecto antiproliferativo sobre células cancerígenas (Bhutia *et al.*, 2009).
- Lectina de las semillas de *Phaseolus vulgaris*, conocida popularmente con el nombre de judía verde o ejote. Presenta efectos antiproliferativos sobre líneas celulares de cáncer de hígado (HepG2) y de mama (MCF-7) dependiente de la dosis usada (Lam y Ng, 2010).
- Lectina *Typhonium divaricatum* (L.) Decne obtenida de tubérculos frescos de una hierba medicinal de tradición china. Presenta actividad antiproliferativa de células cancerígenas (Lam *et al.*, 2009).
- Lectina extraída y purificada de las semillas de la alcaparra (*Capparis spinosa*). En estudios *in vitro* muestra un potente efecto inhibitor sobre el

VIH-1 e induce la apoptosis de líneas celulares cancerígenas de hígado y mama (Luo *et al.*, 2007).

- Lectina purificada a partir de los rizomas de *Aspidistra elatior Blume*. Presenta significativa actividad antiproliferativa *in vitro* en líneas celulares cancerígenas (Castillo y Abdullaev, 2005).
- Lectina de la *Galanthus nivalis* (GNA). Se ha reportado que presenta efecto antiproliferativo y apoptótico sobre células cancerosas a través tanto de la muerte de los receptores y la vía mitocondrial, así como la apoptosis inducida por TNF α (Liu *et al.*, 2009).
- Lectina aislada de las semillas de *Bauhinia variegata*. Estudios *in vitro* muestran que inhibe la proliferación de células de hepatoma (HepG2) y de cáncer de mama (MCF7) así como la actividad de la transcriptasa inversa del VIH-1 (Lin y Ng, 2009).

2.2 Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*)

Phaseolus vulgaris es el principal tipo de frijol usado para el consumo humano y en México su consumo ha sido parte de la dieta tradicional por miles de años. En el Norte de México existe una variedad particular de frijol conocida como Tépari (Tepary bean en inglés), el cual se cultiva en estas regiones y aunque su consumo está todavía limitado a esta zona del país, su cosecha es particularmente atractiva debido a sus características agronómicas, las cuales se señalan a continuación (Sathyanarayanaiah y Sánchez, 1991).

2.2.1 Descripción botánica y fitogeografía

El nombre científico del frijol Tépari es *Phaseolus acutifolius*, pertenece a la familia de las *Fabaceas*. Esta especie es originaria de Mesoamérica, principalmente en zonas desérticas o áreas con un periodo largo de sequía. Crece de forma silvestre en algunas regiones áridas y semiáridas del suroeste de Estados Unidos desde la parte central del estado de Arizona (EUA) hasta el sur de Nicaragua (Figura 2). Su

potencial cultivo en áreas desérticas es extenso debido a su resistencia a la sequía, al calor y a su adaptabilidad a altas concentraciones salinas del suelo (Figura 3). Su origen se remonta al año 5000 a.C., en el valle de Tehuacán Puebla, lugar en donde se encontraron las semillas más antiguas. Es una de las cinco especies de *Phaseolus* domesticadas en América en tiempos precolombinos (Córdoba y Martínez, 1997; González *et al.*, 1989).



Figura 2. Descripción botánica de *Phaseolus acutifolius* A) es una planta anual, trepadora, de raíz fibrosa y de altura variable (generalmente de 20 cm hasta 1.5 m), de tallos delgados y pilosos, con hojas delgadas y lineales en los tipos silvestres, mientras que en las especies cultivadas son abovedadas. B) La vainas son pequeñas, las semillas semejan a los frijoles en miniatura y sus tamaños varían entre 8.6 a 9.1 mm. C) La vaina recta o falcada mide de 5-9 cm de largo por 1cm de ancho y contiene de 5-7 semillas. Tomado de González *et al.*, 1989.

El cultivo del frijol Tépari se ha encontrado de 50 a 1920 m sobre el nivel del mar, requiere de una precipitación anual de 250 a 300 mm, aunque crece en México en regiones con una precipitación de 150 mm (Sonora) a 750 mm (Campeche) anuales. Crece en suelos secos, arenosos, lodosos, y algunas veces en suelos orgánicos con un pH 6.7 a 7.1 (Córdoba y Martínez, 1997).



Figura 3. Características de la semilla de *Phaseolus acutifolius* A) El producto principal de *Phaseolus acutifolius* es una semilla seca la cual es comestible debido a su alto contenido de proteínas (17 a 27%) y de carbohidratos (Vargas *et al.*, 1987). B) Su semilla se presenta en dos formas: una medianamente redonda blanca o negra y la otra rómbica que puede ser blanca, verdosa, gris, amarilla oscura, negro o violeta. Tomado de González *et al.*, 1989.

2.2.2 Usos y valor nutricional del frijol Tépari.

El frijol Tépari se utiliza principalmente como alimento para humanos y animales debido a su gran contenido proteínico sin embargo, es poco consumido por lo que su alto contenido de proteínas y carbohidratos es subutilizado (Osman *et al.*, 2003). La concentración de cenizas, grasa y carbohidratos totales del Tépari son similares a otras variedades comunes del género *Phaseolus*. Sin embargo, presenta compuestos antinutricios como fitatos, lectinas e inhibidores de proteasas que, aunque relativamente abundantes en el extracto crudo, desaparecen casi completamente después de la cocción; por lo que al ser consumidos no constituyen un riesgo para la salud (González *et al.*, 1989; Idouraine y Yensen, 1991). Respecto al frijol común, el frijol Tépari tiene concentraciones menores de lectinas sin embargo, estas poseen una actividad biológica mayor, conocida como actividad hemaglutinante (González *et al.*, 1989).

2.2.3 Estudios *in vitro* e *in vivo* con una fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari.

En nuestro laboratorio se ha obtenido, mediante cromatografía de exclusión de peso molecular, una fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari con un peso molecular de 31 KDa y una actividad aglutinante de 5565 unidades por mg de proteína (López, 2007). Con esta fracción concentrada se han realizado diferentes estudios, *in vitro* e *in vivo*. Los resultados de estos estudios han mostrado que la fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari presenta un efecto citotóxico diferencial, principalmente sobre células de cáncer de colon y en menor medida sobre células de cáncer de mama y cervicouterino (Castañeda, *et al.*, 2007; Hernández, *et al.*, 2007; López, *et al.*, 2010). En otro estudio se encontró la presencia de lectina en heces de rata después de 24 horas de su administración vía oral lo cual sugiere que esta lectina resiste la acción de las enzimas digestivas (Velázquez *et al.*, 2008). En un estudio realizado por Rodríguez-Méndez (2008) se mostró que la administración aguda de la fracción concentrada de lectina a una dosis de 50 mg/kg de peso de la rata incrementó el número de leucocitos

circulantes. Así mismo, la administración por vía oral a una dosis de hasta 30 mg/kg de peso del animal no presenta efectos tóxicos como deterioro de la integridad del epitelio intestinal, afección de la absorción y la utilización de los alimentos (López, 2010).

2.3 Sistema Inmune

El sistema inmune de los vertebrados superiores está compuesto por una variedad de células que morfológica y funcionalmente tienen características específicas. Dichas células se diferencian a partir de células madre primordiales pluripotenciales las cuales siguen dos líneas fundamentales de diferenciación: a) linaje mieloide y b) linaje linfoide. Del progenitor mieloide o promielocito derivan los eritrocitos e inflamocitos, este último grupo se subdivide en: 1) Megacariocitos, que originan plaquetas; 2) Mastocitos; 3) Granulocitos (Eosinófilos, Basófilos y Neutrófilos); 4) Fagocitos (Eosinófilos, Neutrófilos, Macrófagos y Monocitos) y 5) Células dendríticas con distintos precursores (tanto mieloides como linfoides). Del progenitor linfoide derivan: 1) Algunas células dendríticas; 2) Linfocitos B; 3) Linfocitos T (tanto cooperadores Th, como citotóxicos Tc); 4) y Linfocitos NK (Smeltzer y Bare, 2004).

Todos estos tipos celulares ejercen funciones distintas, interaccionando constantemente entre sí y estas interacciones pueden estar mediadas por contacto físico o a través de factores solubles que ejercen su función en células con receptores específicos. Las células que forman el sistema inmune se organizan a su vez en tejidos y órganos que reciben el nombre genérico de sistema linfoide. Los tejidos y órganos linfoides se pueden dividir en primarios o centrales (médula ósea y timo) y en secundarios o periféricos (bazo, ganglios linfáticos, mucosas asociadas a tejido linfoide). Los órganos primarios son los lugares de la linfopoyesis, mientras que los periféricos son los lugares de interacción entre las distintas células y tienen como misión proveer un microambiente favorable para que se desencadene la respuesta inmunológica (Tristram *et al.*, 2002).

2.3.1 Timo

El timo (Figura 4) representa una parte fundamental del sistema inmune. Es necesario para el desarrollo de los linfocitos T, es la base de la inmunidad celular así mismo contribuye a la respuesta inmunológica humoral (Rojas, 2001).

Además de los linfocitos, la corteza del timo alberga macrófagos y células reticulares epiteliales derivadas del ectodermo. Son tres tipos de células reticulares epiteliales las que se encuentran en la corteza del timo (Gartner y Hiatt, 1997):

Las **células reticulares epiteliales tipo I** separan a la corteza de la cápsula del tejido conectivo y a las trabéculas y rodean a los elementos vasculares de la corteza.

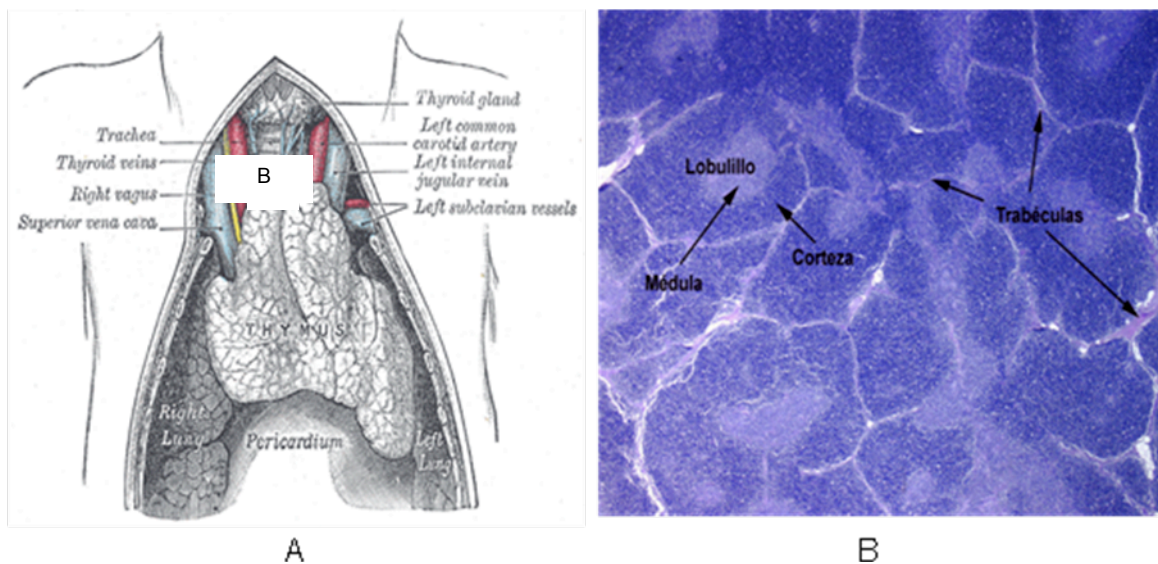


Figura 4. Características anatómicas de timo **A.** El timo de mamíferos se encuentra en la parte superior del mediastino pericárdico, se extiende sobre los grandes vasos del corazón y del cayado aórtico, es un pequeño órgano encapsulado y está formado por dos lóbulos. El timo aparece pronto en el embrión y sigue creciendo hasta la pubertad, etapa después de la cual comienza a entrar en involución (atrofia) (Gall, 2006). **B.** La cápsula del timo, compuesta por tejido conectivo colagenoso denso irregular, envía tabiques hacia los lóbulos y los subdivide en lobulillos incompletos. Cada lobulillo está compuesto por una corteza y una médula. La corteza del timo parece mucho más oscura en los cortes histológicos que la médula, a causa de la presencia de un gran número de linfocitos T (timocitos) (Elmore, 2005).

Estas células forman uniones ocluyentes entre sí, por lo que aíslan por completo la corteza tímica del resto del cuerpo.

Las **células reticulares epiteliales tipo II** están localizadas en la corteza media. Estas células poseen proyecciones largas, anchas y a manera de vainas que forman uniones desmosómicas entre sí. Estas proyecciones forman un citorretículo que subdivide a la corteza tímica en compartimentos aun más pequeños llenos de linfocitos.

Las **células reticulares epiteliales tipo III** se localizan en la parte más profunda de la corteza y a nivel de la unión corticomedular. Estas células poseen también proyecciones amplias y a manera de vainas que forman compartimentos llenos de linfocitos. Estas células participan en la formación de las uniones ocluyentes entre sí y con las células reticulares epiteliales de la médula, con lo que quedan aisladas la corteza y médula.

Los tres tipos de células reticulares epiteliales aíslan por completo a la corteza tímica y, de esta manera, impiden el desarrollo de células T a partir del contacto con antígenos extraños. Las células de los tipos II y III presentan también autoantígenos y moléculas MHC I (moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad I) y MHC II (moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad II) a las células en desarrollo (Finn, 2005).

El timo recibe las células madre de los linfocitos T del saco vitelino, el hígado y más tarde de la médula ósea, a través del torrente sanguíneo. Las células progenitoras invaden la corteza, donde en la porción subcapsular se diferencian en linfocitos T inmaduros o timocitos (la denominación timocitos se utiliza con frecuencia respecto a todos los linfocitos del timo, pero en sentido estricto, solo es correcto para los linfocitos T maduros). Los timocitos comienzan entonces una maduración independiente de antígeno (Ag), con lo que se entiende una

maduración independiente de las acciones del Ag extraño, como ocurre en la respuesta inmunológica (Goldsby *et al.*, 2004).

La médula del timo, es un continuo entre los lóbulos adyacentes y pueden formar pequeños brotes que inciden profundamente en la corteza que, en algunos lugares, pueden llegar a la cápsula. La médula del timo se tiñe de color mucho más claro que la corteza porque su población de linfocitos no es tan profusa. Alberga un gran número de células epiteliales derivadas del endotelio, contiene más células T maduras, corpúsculos de Hassall, macrófagos y células dendríticas (no fagocíticas, células derivadas de la médula ósea) (Regueiro, 2006).

Los tipos de células reticulares epiteliales en la médula son tres y se describen con detalle a continuación (Roitt, 2006):

Las células reticulares del tipo IV se encuentran en relación estrecha con las células del tipo III de la corteza, y ayudan a la formación de la unión corticomedular.

Las células reticulares epiteliales tipo V forman el citorretículo de la médula.

Las células reticulares epiteliales tipo VI constituyen el aspecto más característico de la médula del timo. Estas células entre sí forman los corpúsculos tímicos o corpúsculos de Hassall a manera de rizados, cuyos números se incrementan conforme envejece la persona. Las células de tipo VI pueden volverse muy cornificadas e incluso calcificadas. Se ha sugerido que, a diferencia de los tipos IV y V, las células epiteliales reticulares del tipo VI podrían ser de origen ectodérmico. No se ha dilucidado la función de los corpúsculos tímicos, aunque se ha sugerido que son el sitio en que mueren los linfocitos T en la médula tímica.

2.3.1.1 Índice corteza-médula

Un aumento o una disminución en la proporción corteza-médula es un parámetro que puede ser medido y registrado. De esta manera se puede conocer la proliferación celular. Sin embargo, dentro de cada lóbulo, esta relación varía de acuerdo al plano de sección cuando se mide en varios puntos. En general, la médula normalmente ocupa alrededor de un tercio del volumen lobulillar en roedores. Un índice normal corteza-médula esta cerca de 2:1. Sin embargo, debido a los cortes tangenciales que pueden ocurrir en cualquier lóbulo, en todos los lóbulos debe examinarse y determinarse una relación global (Savino *et al.*, 2004).

2.3.2 Bazo

El bazo es un órgano inmune secundario, cuyos principales componentes son la pulpa roja y blanca, en la que las células inmunitarias se concentran. Es sub-compartamentalizado de tal manera que los linfocitos T y B, junto con sus células inmunes accesorias, están localizados en zonas determinadas estratégicamente para el contacto con el antígeno (Tórtora y Derrickson, 2006).

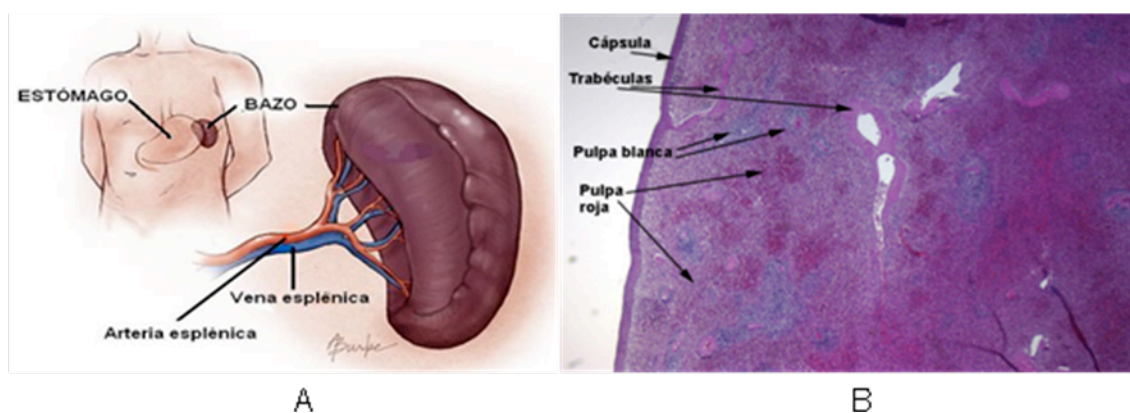


Figura 5. Características anatómicas del bazo **A.** El bazo se sitúa por debajo del diafragma en el lado izquierdo del abdomen. La sangre penetra a través de la arteria esplénica en el hilio y pasa a una red de ramificaciones de arteriolas que irradian a través de todo el órgano. **B.** La pulpa roja hematógena es la zona abierta a la circulación general. Se compone de vasos sanguíneos propios del bazo, los senos venosos, y de un complejo sistema interconectado de espacios en los que un gran número de macrófagos eliminan a los eritrocitos, microorganismos y algunas partículas de la circulación. La pulpa blanca linfoide, situada en torno a una arteriola central, está integrada por la vaina periarteriolar linfoide (PALS, de células T), folículos adyacentes (células B), y zona marginal (B-área celular) (Cesta, 2006).

La zona marginal del bazo contiene poblaciones específicas de macrófagos. Se encuentra intercalada entre la pulpa blanca y roja, permite la entrada de células B y T, tiene especial relevancia en la respuesta inmune por la captura y procesamiento de antígenos (Rojas, 2001).

Las células reticulares y su matriz construyen una malla de tejido conectivo que mantiene el marco estructural y la integridad del tejido linfático reticular en el bazo. Esta malla abarca a los linfocitos en la pulpa blanca y guía parcialmente su tráfico y residencia (Smeltzer, 2004).

2.5 La respuesta inmune

La respuesta inmune es una respuesta colectiva y coordinada frente a la introducción en el organismo de ciertas sustancias extrañas (antígeno). El sistema inmune debe atacar selectivamente los agentes patógenos y las células propias anormales, respetando la integridad de las células normales (“lo propio”) y evitando asimismo reaccionar contra agentes ajenos al organismo pero incapaces de causar enfermedad (Janeway *et al.*, 2003).

Frente al ingreso de un agente patógeno existen mecanismos de defensa presentes desde el nacimiento. Estos son conocidos en conjunto como inmunidad innata/natural/inespecífica, porque produce una respuesta defensiva estereotipada contra una gran variedad de patógenos (Rojas, 2009).

En contraste, hay otro conjunto de mecanismos que se activan frente a un patógeno determinado y generan respuestas específicas para éste, llamada inmunidad adaptativa la cual consiste en dos clases de respuestas muy relacionadas, ambas producto de la presencia de antígenos: A) inmunidad celular, en la que las células T CD8 proliferan a células T citotóxicas que atacan directamente al antígeno invasor y, B) Inmunidad humoral, la cual es mediada por anticuerpos a partir de la diferenciación de células B (Regueiro, 2006).

En el organismo, la inmunidad innata y la adaptativa son complementarias e implementan respuestas conjuntas integrales contra los patógenos. Además, existen múltiples interrelaciones entre ambas ramas del sistema inmune. Cada una de ellas consta de ciertas células, receptores de membrana y mediadores solubles característicos (Tristram *et al.*, 2002).

Tabla 3: Componentes de la inmunidad innata y adaptativa.*

Componentes	Inmunidad innata	Inmunidad adaptativa
Factores solubles	Lisozima, complemento, proteínas de fase aguda.	Anticuerpos
Células	Neutrófilos, basófilos, Fagocitos/macrófagos, NK	Linfocitos T y B
Barreras químicas	Piel y mucosas (glándulas sebáceas), cilios de la tráquea.	Sistema inmunitario cutáneo y mucosonal
Mediadores solubles	INF α y β , IL-1, IL-6, IL-8, TNF α	IFN γ , IL-2, IL-3, y otras
Memoria	No	Sí

*Adaptado de Goldsby *et al.*, 2004.

En la inmunidad innata o inespecífica básicamente intervienen fagocitos y complemento, provocando fenómenos que clínicamente se reconocen como inflamación local. El complemento es un sistema defensivo formado por factores plasmáticos que interviene en diversas actividades biológicas, no sólo inmunitaria. Su activación es fundamental para la lisis bacteriana pero también interviene en la destrucción de otras células, normales o patológicas. Hay varias formas de activación, la llamada "vía clásica", a través anticuerpos, (IgM, IgG1 e IgG3), unidos a sus antígenos y formando inmunocomplejos; y la "vía alternativa", la cual es activada por endotoxinas y productos bacterianos, sin necesidad de anticuerpos o inmunocomplejos (Rojas, 2001).

2.6 Sistema inmune y cáncer.

En 1957 Thomas y Burnet propusieron la teoría de la "vigilancia inmunológica" en la cual se postula que el sistema inmune identifica y destruye rápidamente las

células malignas que continuamente se están generando en el organismo (Barrera, *et al.*, 1995).

A pesar de la inmunovigilancia, las células tumorales comúnmente presentan mecanismos de evasión a la respuesta inmune, que permiten su crecimiento eficiente. Entre estos pueden mencionarse los siguientes (Sell, 1987):

- La falta de expresión de antígenos tumorales.
- Una disminución de la expresión de las moléculas de clase I del MHC.
- La disminución de la expresión de genes que codifican para las proteínas TAP1/TAP2 (proteínas transportadoras de antígeno).
- La secreción de bajos niveles de citocinas.
- La secreción de IL-10 (citocina supresora que inhibe la activación de los linfocitos T CD8+citotóxicos y NK) y/o la liberación de receptores solubles de TNF α .
- La falta de respuesta de los linfocitos T citotóxicos a IL-2.
- La inhibición de la expresión de IL-7.
- La falta de correlación entre la presencia de anticuerpos antitumorales y el desarrollo del tumor.

La vigilancia inmunológica ha sido comprobada en varios modelos experimentales, ejemplificados por crecimiento exitoso de xenotransplantes (incluyendo tumores humanos) en ratones desnudos (nu/nu) y por el incremento en la aparición de tumores en animales timentomizados y en humanos que presentan inmunosupresión (Grossman y Herberman, 1986).

III. Justificación

La interacción entre factores genéticos y ambientales puede provocar alteraciones al interior de la célula. Este tipo de alteraciones conllevan una serie de mutaciones y/o aberraciones las cuales provocan una proliferación celular anormal que puede degenerar en un tumor. Ante estos eventos, la “vigilancia inmunológica” juega un papel muy importante, pues a partir de ella, el sistema inmune reconoce y elimina las células transformadas. En la respuesta inmune al cáncer participan varias poblaciones de células linfoides como los linfocitos T citotóxicos, células NK y macrófagos, así como las citocinas (IL-1, TNF α ; entre otras). Dentro de este contexto cobra relevancia la activación de la proliferación de linfocitos a través de un mitógeno (lectinas).

La lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) ha sido objeto de diversos estudios *in vitro* e *in vivo*. Los resultados obtenidos en dichos estudios han mostrado su efecto citotóxico diferencial, principalmente sobre células de cáncer de colon y en menor medida sobre células de cáncer de mama y cervicouterino (López, 2007). De igual forma se han estudiado sus efectos toxicológicos en ratas, en donde se determinó que a la administración por vía oral de forma aguda (50 mg/kg de peso corporal) no presenta efectos tóxicos como deterioro de la integridad del epitelio intestinal, afección de la absorción y la utilización de los alimentos (López, *et al.*, 2010). Así mismo, se encontró que, a la dosis mencionada, estimula el sistema inmune generando un incremento en el número de leucocitos. Sin embargo, se desconoce el efecto de esta lectina sobre la proliferación celular en tejidos linfoides y sobre la producción de moléculas que participan en la respuesta inmune, como son la IL-1 y el TNF α . Por ello, es de interés evaluar el efecto que la fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari tiene sobre el sistema inmune de ratas. Los resultados de este estudio aportarán información para ser utilizada en investigaciones posteriores sobre alternativas de tratamiento contra cáncer.

IV. Hipótesis

La administración de la fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) tendrá un efecto proliferativo sobre células inmunes en sangre periférica y en órganos linfoides (timo y bazo).

V. Objetivos

5.1 General

- Determinar el efecto de la administración subcrónica de la fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre la proliferación de células inmunes en sangre periférica y tejidos linfoides: timo y bazo.

5.2 Específicos

1. Evaluar la proliferación de células inmunes en sangre periférica.
2. Determinar los cambios histológicos y en peso de timo y bazo.
3. Evaluar la proliferación celular en timo y bazo.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos de 14 semanas de edad, al menos 4 animales por cada grupo. Las ratas se mantuvieron con ciclos de luz-oscuridad de 12 h/12 h, con agua y alimento *ad libitum*, antes de sacrificarlos. La fracción concentrada en lectinas de frijol Tepari (*Phaseolus acutifolius*) (FCL) se purificó por nuestros colaboradores en el Laboratorio de Mecanismos de Defensa de Plantas de CINVESTAV Unidad Irapuato, mediante cromatografía de exclusión de peso molecular (Torres, 2010). Las sales y los solventes empleados fueron de J.T. Baker (Xalostoc, México), SIGMA Chemical Co. (St. Louis MO), Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ) y BIO-RAD (Hercules CA). El resto de los reactivos utilizados fueron todos de grado analítico.

6.2 Métodos

6.2.1 Preparación de las muestras

6.2.1.1 Animales, muestras de sangre y tejidos del sistema inmune.

Las ratas recién ingresadas se identificaron debidamente y examinaron cuidadosamente. Se colocaron en jaulas individuales con cubeta de macrolón y tapa de rejilla de acero inoxidable. Se mantuvieron durante un periodo de 6 semanas para su adaptación bajo condiciones controladas, como se mencionó previamente. Una vez finalizado el periodo de adaptación, los animales de 14 semanas de vida, se distribuyeron en grupos de manera aleatoria para iniciar el experimento.

El experimento se llevó a cabo con un lote de 20 ratas agrupadas en cuatro grupos de 5 animales cada uno. Las dosis administradas se determinaron con

base en los resultados del ensayo de toxicidad realizado por López (2010). La fracción concentrada de lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) (FCL) se resuspendió en solución salina isotónica estéril para su administración mediante una cánula intragástrica. Los controles se administraron con solución salina isotónica estéril (Tabla 6).

Tabla 4: Grupos de estudio.

Administración D25FCL		Administración D50FCL	
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Control. ➤ Administración del vehículo. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Experimental. ➤ Administración de 25 mg/kg de peso del animal. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Control. ➤ Administración del vehículo. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Experimental. ➤ Administración de 50 mg/kg de peso del animal.

Tabla 5: Esquema de sacrificios.

Grupo	Inicio	Primer sacrificio	Segundo sacrificio	Tercer sacrificio
<i>Control</i>	0			Semana 6
<i>D25FCL</i>	0			Semana 6
<i>Control</i>	0	Semana 2	Semana 4	Semana 6
<i>D50FCL</i>	0	Semana 2	Semana 4	Semana 6

Después de sacrificar a los animales por decapitación, se colectaron muestras de sangre y mediante disección los tejidos inmunes, bazo y timo. Las muestras de sangre se colectaron con EDTA como anticoagulante. Posteriormente se analizaron para determinar el número de células inmunitarias. Los tejidos se fijaron en formalina (paraformaldehído al 4% en PBS) durante 48-72 h a temperatura ambiente. Posteriormente se deshidrataron en un gradiente de alcoholes (50-100%) y se incluyeron en parafina, para obtener cortes de 5-7 µm.

6.2.1.2 Evaluación del peso de los animales y tejidos.

Se registraron los pesos corporales al inicio del experimento y con una periodicidad semanal hasta el último día del ensayo. De igual forma se determinó diariamente el consumo de alimento. Los datos recabados fueron registrados sistemáticamente de forma individual.

Previo sacrificio mediante decapitación, se procedió a realizar la necropsia para la disección de bazo y timo. Cada órgano fue pesado en una báscula electrónica inmediatamente después de su disección. El timo en particular, antes de ser pesado, se aisló de los órganos contiguos (tráquea, pulmones, tiroides) a través de una disección cuidadosa con ayuda de un microscopio estereoscópico. A la par del registro sistemático de los pesos de los órganos, se registraron las características morfológicas macroscópicas observadas en el órgano al momento de su disección.

6.2.2. Recuentos de células inmunes.

El recuento de células inmunes se realizó con un analizador hematológico automático (Coulter). Se utilizaron 50 µl de sangre completa contenida en un tubo de ensayo con EDTA como anticoagulante. El procedimiento para el análisis de la muestra sanguínea se realizó de acuerdo con las especificaciones contenidas en el manual de instrucciones de operación del analizador hematológico. Los resultados del análisis y los histogramas fueron impresos de manera individual en la impresora térmica integrada al equipo. Los datos recabados se registraron sistemáticamente para su posterior análisis estadístico.

6.2.3. Histología del bazo y timo con hematoxilina y eosina (HyE).

Secciones seriadas de los tejidos se desparafinaron en Xilol (Merck) 3 veces (3X, 5 min c/u), se rehidrataron en un gradiente de etanol (100-50%, 5 min en c/u) y se

lavarón en agua desionizada (5 min). Las preparaciones histológicas se incubaron 3 min en Hematoxilina de Harris (hematoxilina Merck, Darmstadt, Germany al 0.5% en etanol, con 10% de sulfato de aluminio y potasio Sigma, St. Louis, MO., 0.25% óxido rojo de mercurio II Aldrich, St. Louis, MO), se lavaron con agua por 1 min y después se sumergieron rápidamente (5X) en agua amoniaca (NH_4OH al 1% en agua desionizada) y se lavaron nuevamente con agua (1 min). Después las preparaciones se incubaron (15 seg) con Eosina Y (Sigma) 0.25% en alcohol al 60% acidificado, se lavaron con agua y se deshidrataron en un gradiente de etanol (50-100%, 1 min en c/u). Posteriormente se sumergieron en xilol (3X) antes de montarlas de forma permanente utilizando resina Entellan (Merck).

6.2.4 Determinación de la proliferación celular en bazo y timo

6.2.4.1 Inmunohistoquímica.

Para determinar la proliferación a nivel celular se evaluó el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA). Los tejidos se fijaron con formalina (paraformaldehído: PFA 4% en PBS), por 48 h. Posteriormente, se deshidrataron en soluciones de etanol de concentración creciente, desde 60% hasta alcohol absoluto, una mezcla xilol/etanol 1:1, xilol concentrado y finalmente los baños de parafina. Los tejidos se incluyeron en bloques de parafina y se obtuvieron de dos a tres cortes seriados de 5-7 μm , que se montaron sobre laminillas de alta fijación (Superfrost), utilizando un baño de agua tibia con gelatina (0.03%). Las preparaciones histológicas se desparafinaron en un gradiente de solventes: xilol 100%, xilol 100%, etanol 95%, etanol 70%, etanol 50%, agua destilada, 5 min en cada uno. Al finalizar la rehidratación las preparaciones histológicas se sometieron a un proceso de desenmascaramiento de epítopes con una solución de citratos 20 min a temperatura ambiente y 20 min en baño maría. Después, las preparaciones se lavaron por 5 min en TBS 1X y luego se incubaron durante 1 h con una solución salina amortiguada con Tris 50 mM pH 7.6 (TBS), 50% metanol y 3% H_2O_2 para eliminar la peroxidasa endógena. Al término de la hora se realizó un lavado con TBST (TBS con 0.1% de Triton X-100) y se incubó 1 h con leche descremada al

5% en TBST, como agente bloqueador. Se lavó con TBST y se eliminó el exceso de líquido para transferir las preparaciones a una cámara húmeda. A cada preparación histológica se le agregaron 500-750 µl de anticuerpo primario monoclonal contra PCNA de rata (anticuerpo contra PCNA de rata generado en ratón, 1:200 en TBST con 1% de leche descremada) y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Se conservaron una o dos preparaciones histológicas sin anticuerpo (se incubaron solo con el vehículo) como controles negativos. Al día siguiente, se lavaron con TBST (3X10 min). Posteriormente, se incubó durante 2 h con el anticuerpo secundario (anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano picante, 1:200 en TBST-leche 1%). Una de las preparaciones sin anticuerpo primario se utilizó como control negativo para verificar la presencia de peroxidasa endógena o tinción excesiva inespecífica de fondo, por lo que no se le adicionó el anticuerpo secundario. Las preparaciones se lavaron con TBS y se revelaron con una solución de diaminobencidina (0.025 g de DAB en 100 ml TBS 1x, 35 µl H₂O₂) recién preparada, dejando que la reacción procediera por 10-40 min hasta que el precipitado café fue evidente a simple vista. Los controles negativos se incubaron 15 min adicionales para garantizar la ausencia de señal. La reacción se detuvo lavando con TBS. Como control positivo se utilizó Bolsa de Fabricio de 2s, que tiene abundante proliferación de células inmunitarias.

La solución de DAB se desechó en un contenedor al que se adicionó hipoclorito de sodio (cloro). Las preparaciones se deshidrataron de nuevo, desde alcohol hasta xilol, y se montaron con resina (Entellan), para preservarlas.

6.2.5 Análisis estadístico

Los experimentos para determinar la presencia de PCNA (inmunoquímica), se efectuaron al menos cuatro veces, por duplicado y/o triplicado. El análisis estadístico del recuento de células inmunes en sangre y de los cambios histológicos en bazo y timo se realizó con ANOVA de una vía que permitió la

comparación entre las muestras (utilizando GraphPad Prism 4). Se determinó la diferencia significativa con la prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

6.3 Consideraciones éticas.

Las pruebas se realizaron siguiendo los lineamientos establecidos en la NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” (NOM-062-ZOO-1999)

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Evaluación del efecto de la FCL en el peso de las ratas tratadas.

Se ha observado que algunas lectinas administradas por vía oral a animales de experimentación causan síntomas gastrointestinales agudos, falta de crecimiento e incluso la muerte (Lajolo y Genovese, 2002). De ahí que se monitoreo el peso de los animales en forma semanal así como el consumo diario de alimento (Figura 6).

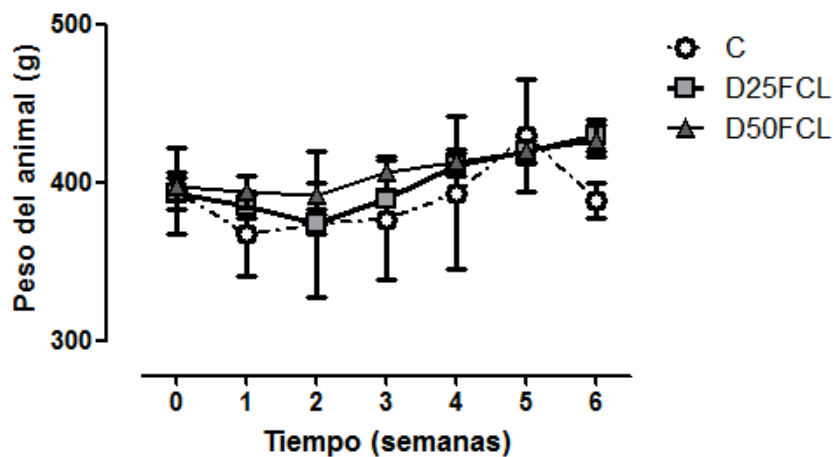


Figura 6. Evaluación del peso de las ratas tratadas. Peso del animal registrado semanalmente. Se calculó la media \pm error estándar y mediante ANOVA se hizo la comparación de muestras. La diferencia significativa ($p < 0.05$) se determinó por la prueba de Dunnett.

El peso de los animales se mantuvo sin cambios significativos durante el tiempo del experimento. Lo anterior demuestra que las dosis utilizadas (D25FCL y D50FCL) no presentaron efectos antinutricios en los animales tratados en comparación con el grupo control. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por López (2010) en donde se encontró que la administración única de la FCL de frijol Tépari a una dosis de 50 mg/kg de peso de animal provoca efectos leves de toxicidad a nivel intestinal (diarrea) sin llegar a ocasionar falta de crecimiento ni la muerte de los animales en estudio. Sin embargo, estudios recientes en nuestro grupo de investigación han mostrado que la administración de la D50FCL, provoca aproximadamente el 10% de pérdida de peso al final del tratamiento (datos no publicados).

7.2 Análisis de las células inmunitarias circulantes de ratas tratadas con FCL

El efecto de la FCL sobre las células inmunes circulantes se midió a través del recuento total de leucocitos así como la proporción de linfocitos en sangre periférica (Figura 7).

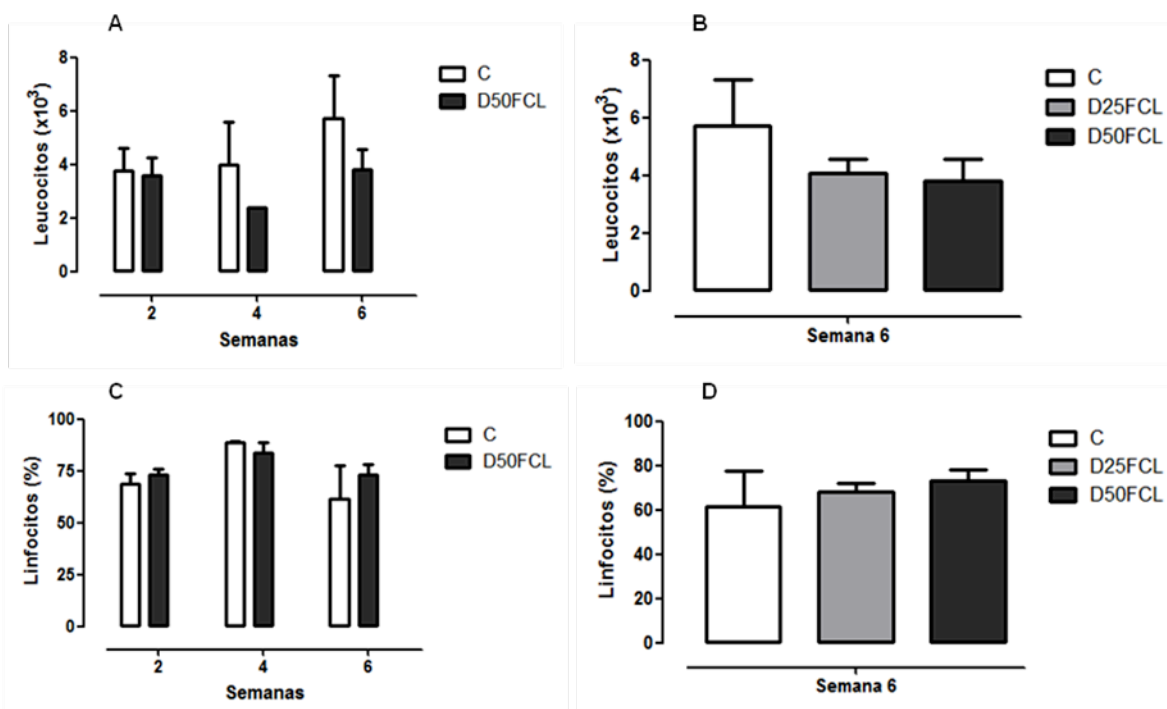


Figura 7. Células inmunitarias circulantes en sangre periférica. A. Recuento de leucocitos totales en sangre periférica a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con la D50FCL. **B.** Recuento de leucocitos totales en sangre periférica a la semana 6 del tratamiento, utilizando dos diferentes dosis (D25FCL y D50FCL). **C.** Proporción de linfocitos en sangre periférica por corte en el tiempo de tratamiento. **D.** Proporción de linfocitos en sangre periférica a la semana 6 del tratamiento utilizando dos diferentes dosis (D25FCL y D50FCL). Se calculó la media \pm ES y mediante ANOVA se hizo la comparación de muestras. La diferencia significativa ($p < 0.05$) se determinó por la prueba de Dunnett.

Los resultados del recuento total de leucocitos muestran una tendencia a la disminución del número total de estas células a la semana 4 del tiempo de exposición al tratamiento con la D50FCL con recuperación del mismo en la semana 6 del tratamiento. Estos resultados no mostraron diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo control (Figura 7-A).

Dentro de la semana 6 de tratamiento con la FCL D25FCL no hubo diferencias significativas en comparación con el grupo control (Figura 7-B).

En cuanto al porcentaje de linfocitos circulantes en sangre periférica en ratas tratadas con la D50FCL, se observó un discreto aumento de los mismos en la semana 2 del tratamiento, mientras que en la semana 4 disminuyó su porcentaje pero no hubo diferencias estadísticamente significativas. En la semana 6 del periodo de tratamiento se presentó un aumento en el porcentaje de linfocitos en comparación con el grupo control; dichos resultados no mostraron diferencias estadísticas significativas (Figura 7-C).

El porcentaje de linfocitos de las ratas tratadas con la D25FCL aumento en comparación con el grupo control en la semana 6 del periodo de tratamiento, sin embargo, esto no mostró diferencias significativas (Figura 7-D).

Los resultados anteriores concuerdan con los de Ruiz-Álvarez (2005) en donde se no se observaron diferencias significativas de linfocitos circulantes en animales tratados con Fitohemaglutinina (PHA) de *Phaseolus vulgaris*. En dicho estudio se estableció que el aumento en el recuento de linfocitos pudo estar relacionado con la proliferación de linfocitos T sin descartar la posibilidad de una activación igual en la proliferación de linfocitos B. De igual forma se estableció que la activación de la proliferación de linfocitos B pudo deberse a un efecto directo de la PHA sobre éstos o de manera indirecta a través de células T ya estimuladas.

Se sabe que existe gran similitud estructural entre las lectinas de una misma familia, y que las características de su sitio de reconocimiento se encuentran altamente conservadas (Hernández *et al.*, 2005). Por lo tanto se infiere que la FCL de frijol Tépari podría estar presentando (sobre células inmunes circulantes), un efecto similar al encontrado con PHA dado que ambas lectinas pertenecen a la familia de las *Fabáceas*.

7.3 Análisis del efecto de la FCL en bazo y timo de ratas

De igual forma, se observó el efecto de la administración de la FCL sobre los órganos linfoides objeto de estudio (bazo y timo). Como parte de lo anterior, se dio seguimiento del peso de cada uno de estos órganos a las 2, 4 y 6 semanas del periodo experimental tanto para la D25FCL como para la D50FCL (Figura 8).

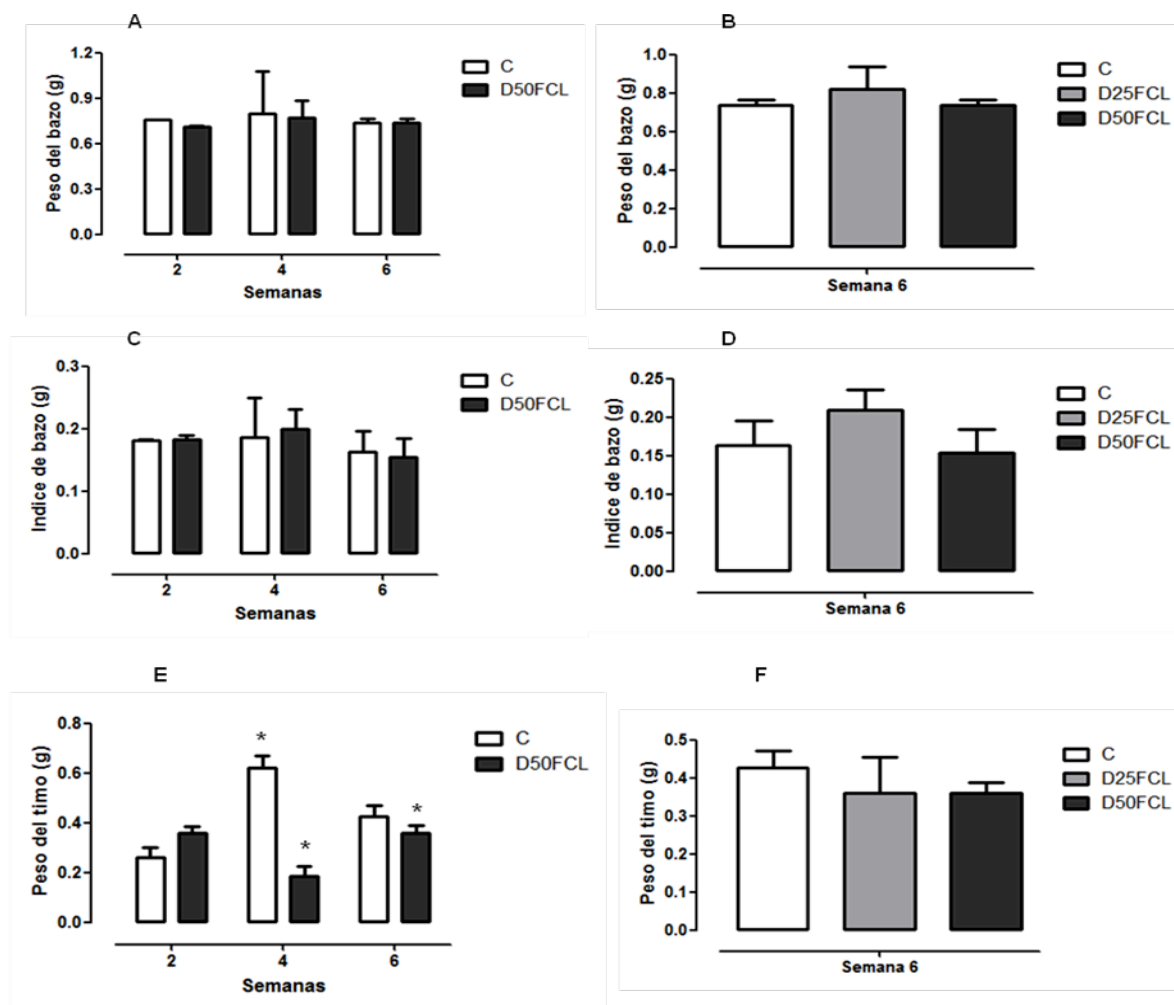


Figura 8. Peso de órganos linfoides. A. Peso del bazo a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con la D50FCL. B. Peso del bazo a la semana 6 de tratamiento con la D25FCL y D50FCL. C. Índice de bazo en proporción con el peso del animal a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con la D50FCL. D. Índice de bazo en proporción con el peso del animal a la semana 6 de tratamiento con la D25FCL y D50FCL. E. Peso del timo a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con la D50FCL. F. Peso del timo a la semana 6 de tratamiento con la D25FCL y D50FCL. Se calculó la media \pm error estándar (ES) y mediante t de student se hizo la comparación de medias y se determinó una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Los resultados muestran que no hubo diferencias significativas en el peso (Figura 8-A) e índice del bazo (Figura 8-C) con la D50FCL durante ninguno de los cortes en el tiempo de tratamiento en comparación con el grupo control. En la semana 6 del tratamiento con la D25FCL se observó un discreto incremento del peso (Figura 8-B) e índice del bazo (Figura 8-D) sin ser esto significativo en comparación con el grupo control.

En cuanto al peso del timo, se observó un incremento del mismo en la semana 2 del tratamiento con la D50FCL sin ser significativo en comparación con el grupo control. Dentro de la semana 4 se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) del peso de este órgano en comparación con el grupo control mientras que en la semana 6 de tratamiento se dio una recuperación significativa ($p < 0.05$) del peso del timo en comparación con el grupo tratado en la semana 4 (Figura 8-E). En la semana 6 del tratamiento con la D25FCL se observó una disminución del peso del timo sin ser significativa en comparación con el grupo control (Figura 8-F).

Los resultados anteriores sugieren que la D50FCL de frijol Tépari mostró tener efecto sobre el timo dado que se observó la disminución del peso de este órgano. Sin embargo se asume que este efecto no llegó a un nivel de toxicidad dado que el peso del órgano mostró una posterior recuperación y no mostró cambios histológicos, como se explica más adelante.

Tanto en bazo como en timo no se observaron cambios morfológicos macroscópicos en cuanto a presencia de necrosis o equimosis.

Siguiendo con la medición del efecto de la FCL de frijol Tépari sobre órganos linfoides se realizó un análisis histopatológico de tejido de bazo y de timo a partir de preparaciones histológicas teñidas con Hematoxilina y Eosina (H y E) (Figura 9).

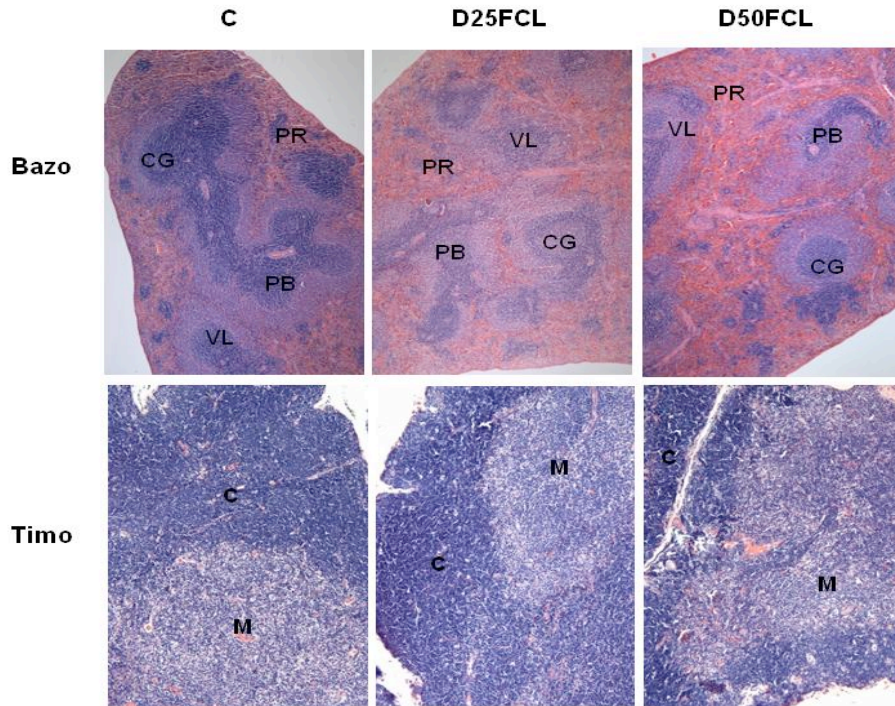


Figura 9. Análisis histológico de tejidos inmunes. Corte Histológico de bazo y timo (4x) del grupo control (C) grupo tratado con la D25FCL y grupo tratado con la D50FCL usando tinción de Hematoxilina y Eosina. CG: centro germinal; PR: pulpa roja; PB: pulpa blanca; VL: vaina linfática; C: corteza; M: médula.

Los tejidos fueron observados con el objetivo 4x. En los cortes histológicos de bazo teñidos con H y E se identificaron la pulpa blanca y pulpa roja en forma clara y bien delimitada. De igual forma fueron observados las vainas linfoides y los centros germinales. No se identificaron zonas de necrosis o daño tisular evidente. En los cortes histológicos de timo teñidos con H y E se pudo observar la corteza y la médula tímica con bordes definidos y bien delimitados sin mostrar datos de lesión tisular (Figura 9).

Los hallazgos anteriores sugieren que la administración de la FCL por vía oral a las D25FCL y D50FCL no mostró efecto inflamatorio evidente sobre los tejidos estudiados. Estos resultados coinciden con los mostrados por López-Sánchez, *et al.* (2010) en donde no se encontraron cambios significativos en el peso de bazo y timo entre el grupo tratado (DFCL50mg/kg) y el grupo control. De igual forma no encontraron cambios en los cortes histológicos de tejidos de estos órganos linfoides.

Los cortes histológicos de bazo teñidos con H y E fueron observados en un microscopio óptico con el objetivo 4x. Se llevó cabo el conteo, por campo, de centros germinales y de vainas linfoides siendo explorados 5 campos por corte histológico de cada rata. Lo anterior se aplicó tanto para el grupo control como para el grupo experimental con la D25FCL y la D50FCL (Figura 10).

Los resultados muestran un incremento del número de centros germinales a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con la D50FCL encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) en la semana 4 del periodo de tratamiento entre el grupo tratado y el grupo control (Figura 10-A). Por otra parte se encontró un aumento en el número de vainas linfoides (VL) en el grupo tratado con la D50FCL en la semana 4 del ensayo, esto en comparación con el grupo control sin llegar a ser significativo (Figura 10-C). A la semana 6 de tratamiento con la D25FCL se observó un incremento no significativo del número de VL en comparación con el grupo control (Figura 10-D).

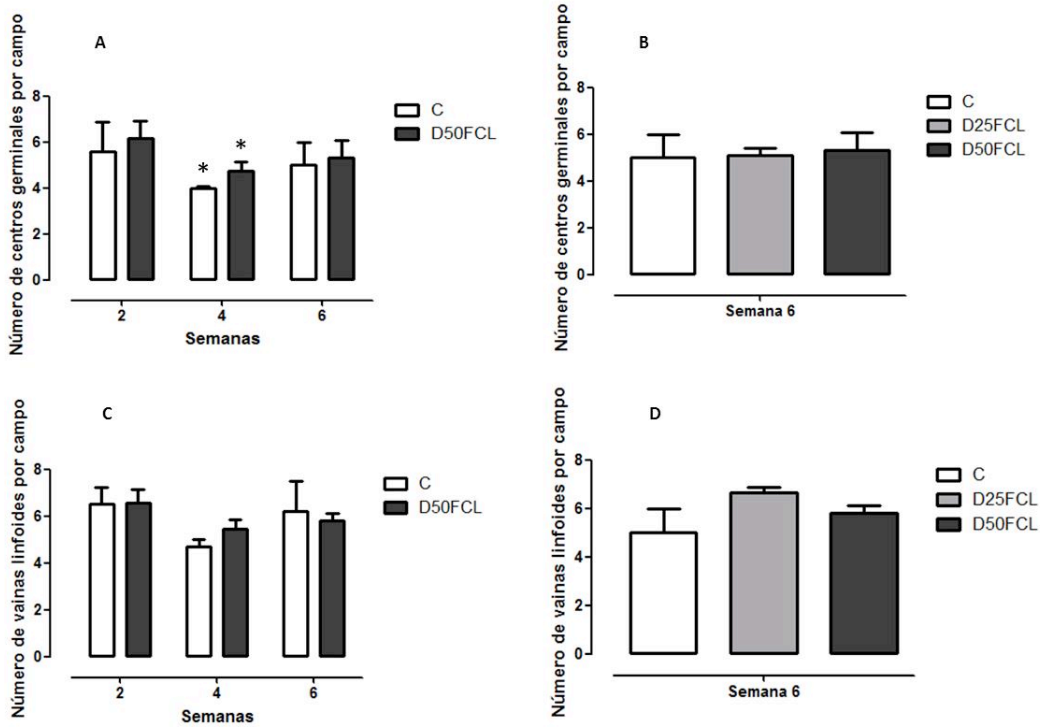


Figura 10. Número de centros germinales y número de vainas linfoides en bazo. **A.** Número de centros germinales por campo en bazo a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con la D50FCL. **B.** Número de centros germinales a la semana 6 de tratamiento con la D25FCL y D50FCL. **C.** Número de vainas linfoides por campo en bazo a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con la D50FCL. **D.** Número de vainas linfoides a la semana 6 de tratamiento con la D25FCL y D50FCL. Se calculó la media \pm ES y mediante t de student se hizo la comparación de medias y se determinó la diferencia significativa ($p < 0.05$).

La activación inicial de células B y T tiene lugar en las VL, en donde principalmente se encuentran células T. En este sitio, las células dendríticas interdigitantes capturan al antígeno y lo presentan combinado con moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) a los linfocitos T colaboradores (T_H). Una vez activadas estas células T_H pueden estimular a los linfocitos B (Goldsby, *et al*, 2004).

Los linfocitos B y T_H estimulados migran al centro, ahí se dividen rápidamente. Estas múltiples divisiones celulares confieren la apariencia pálida que se observa en los cortes histológicos del centro germinal (Tizard, 2009).

Lo anterior concuerda con los hallazgos encontrados en la semana 2, 4 y 6 del tratamiento con D50FCL y la semana 6 de tratamiento con la D25FCL (Figura 11-D) en donde se pudo observar un cambio de apariencia en los centros germinales dependiente del periodo de tratamiento. Aunado a esto se tiene el aumento significativo del número de centros germinales y el aumento del número de VL, que sin ser significativo este último, sumado a los resultados anteriores permite inferir que la FCL mostro efectos sobre la activación celular de T_H y linfocitos B.

Estudios posteriores con el uso de marcadores celulares permitirán establecer el tipo celular en el cual se está dando la activación así como los mecanismos moleculares a través de los cuales se lleva a cabo este estímulo mitógeno de la FCL de frijol Tépari sobre células linfoides en bazo.

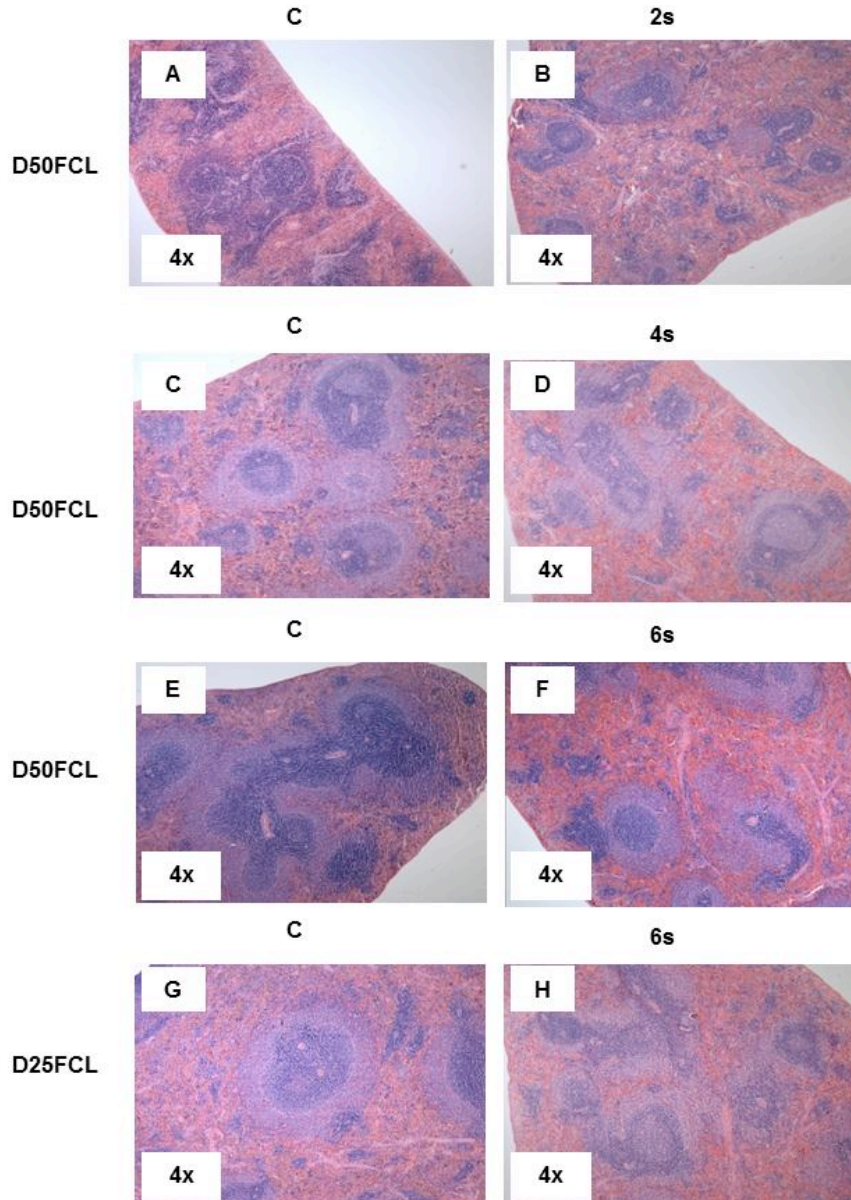


Figura 11. Centros germinales en bazo. A. Centros germinales en bazo del grupo control a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento (A, C, E, G). **B.** Centros germinales en bazo a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con la D50FCL (B, D, F). **C.** Centros germinales a la semana 6 de tratamiento con la D25FCL (E).

Con ayuda del software IMAGE-Pro con el objetivo 4x y una escala de medición en μm , se realizó la medición por campo del diámetro de los centros germinales y de vainas linfoides de los animales tratados con la D50FCL. De forma igual se llevó a cabo para la medición por campo del diámetro de centros germinales y de vainas linfoides a la semana 6 del tratamiento con la D25FCL. Fueron explorados

5 campos por corte histológico de cada rata. Lo anterior se aplicó tanto para el grupo control como para el grupo experimental.

Los resultados muestran que el diámetro de los centros germinales disminuyó a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con la D50FCL. Siendo esta disminución del diámetro significativa estadísticamente ($p < 0.05$) en la semana 4 del periodo de tratamiento entre el grupo tratado y el grupo control (Figura 12-A). Con la D25FCL no se encontraron cambios significativos entre el grupo tratado y el grupo control (Figura 12-B). En cuanto al diámetro de las VL los resultados muestran una tendencia al incremento de este a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con la D50FCL sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 12-C). De igual forma, con la D25FCL se observó un incremento no significativo del diámetro de la VL entre el grupo tratado y el grupo control (Figura 12-D).

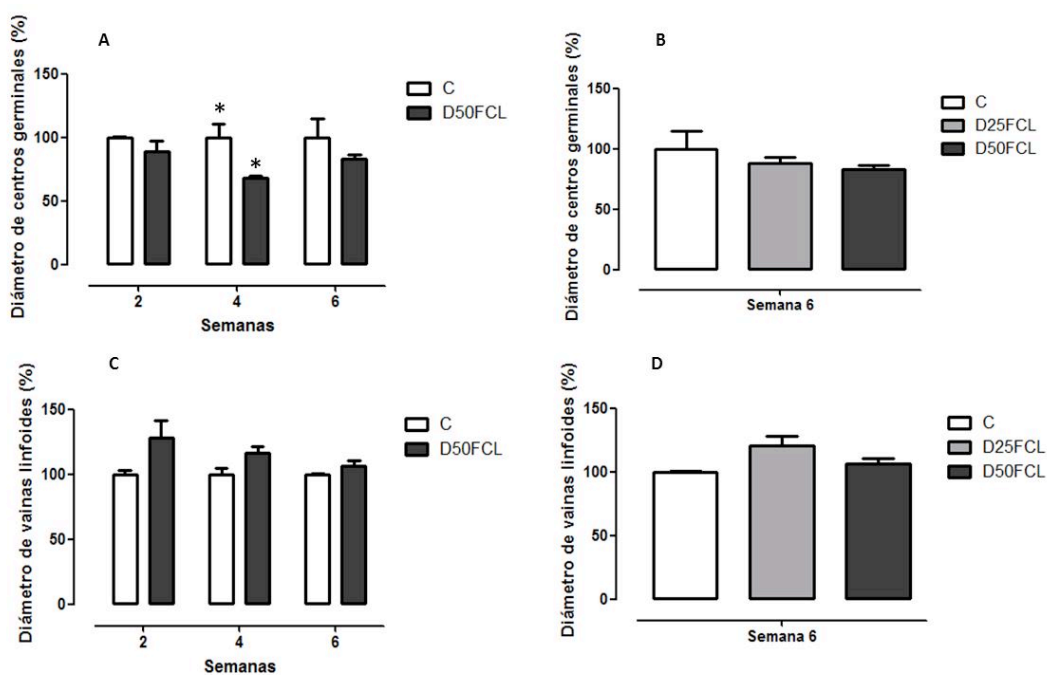


Figura 12. Diámetro de centros germinales y diámetro de vainas linfoides en bazo. A. Diámetro de centros germinales en bazo a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con la D50FCL: **B.** Diámetro de centros germinales a la semana 6 de tratamiento con la D25FCL y D50FCL. **C.** Diámetro de vainas linfoides en bazo a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con la D50FCL: **D.** Diámetro de vainas linfoides a la semana 6 de tratamiento con la D25FCL y D50FCL. Se calculó la media \pm ES y mediante t de student se hizo la comparación de medias y se determinó la diferencia significativa ($p < 0.05$).

Se sabe que los linfocitos T son capaces de producir factores solubles tras su estimulación con antígenos o mitógenos; y que algunos de estos factores solubles están involucrados con la proliferación y diferenciación de células B (Goldsby, 2004). De ahí que se considera que los resultados observados en el número y diámetro de VL y de centros germinales sugieren que la D50FCL favorece la proliferación y activación de linfocitos T_H y estos a su vez activan a los linfocitos B.

A este respecto, la literatura señala que los linfocitos B, al igual que los linfocitos T, precisan de al menos dos señales para su activación. La primera señal es dada por el complejo BCR de los linfocitos B tras su unión al antígeno con lo que se pone en marcha la cascada de segundos mensajeros en estos linfocitos. Sin embargo esta señal por sí sola no es suficiente para una activación completa de los linfocitos B. Siendo necesaria una segunda señal proveniente de los linfocitos T y que es mediada por ciertas citocinas que propiciarían la proliferación y diferenciación de las células B. Para ello también se requiere la adecuada interacción entre ambos tipos de linfocitos, T y B, mediante moléculas conocidas como accesorias. Así las células B expresan las moléculas de activación CD80 y CD86 que interactúan con la molécula CD28 de linfocitos T para una buena activación de los primeros. También es de gran importancia que las moléculas CD40L se unan a CD40 presentes en linfocitos T y B respectivamente para que estos últimos puedan activarse y diferenciarse de manera adecuada (Tizard, 2009).

Estudios posteriores utilizando marcadores (CD80, CD86, CD40L, CD40) permitirán establecer los mecanismos por los cuales la FCL está activando la proliferación de linfocitos B.

Con ayuda del software IMAGE-Pro se realizó la medición por campo del diámetro de médula (Figura 13-A) y la corteza en timo (Figura 13-C) en diferentes cortes en el tiempo del tratamiento con la D50FCL. Se utilizó el objetivo 4x y una escala de medición en μm . Fueron explorados 5 campos por corte histológico de cada rata.

De forma igual se llevó a cabo para la medición por campo del diámetro de médula (Figura 13-B) y la corteza en timo (Figura 13-D) a la semana 6 del tratamiento con la D25FCL. Lo anterior se aplicó tanto para el grupo control como para el grupo experimental.

El diámetro de la corteza del timo mostro un incremento en la semana 2 y 6 del tratamiento con la D50FCL sin ser significativo estadísticamente (Figura 13-C). En la semana 6 de tratamiento con la D25FCL no se observaron cambios en el diámetro de la corteza timica entre el grupo tratado y el grupo control (Figura 13-D).

El diámetro de la médula del timo mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) en la semana 2 del periodo de tratamiento en el grupo tratado con la D50FCL en comparación con el grupo control (Figura 13-A). Los cambios observados en el diámetro de la médula del timo en la semana 4 y 6 del periodo de tratamiento no mostraron diferencias significativas. En la semana 6 de tratamiento con la D25FCL no se observaron cambios entre el grupo tratado y el grupo control (Figura 13-B).

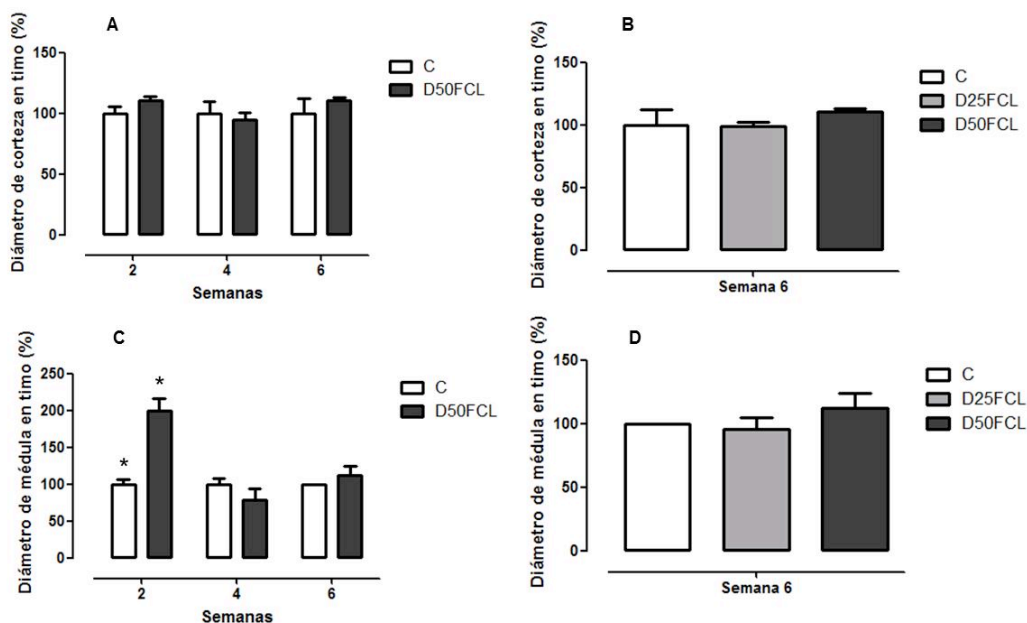


Figura 13. Cambios histológicos en corteza y médula de timo. **A.** Diámetro de la médula de timo por campo a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con la D50FCL. **B.** Diámetro de la médula del timo por campo a la semana 6 de tratamiento con la D25FCL y D50FCL. **C.** Diámetro de la corteza de timo por campo a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con la D50FCL. **D.** Diámetro de la corteza del timo por campo a la semana 6 de tratamiento con la D25FCL y D50FCL.

La corteza del timo aloja macrófagos, células epiteliales reticulares y un gran número de linfocitos T (timocitos) que se encuentran en proceso de maduración y diferenciación. Esto último es lo que le da a la corteza una apariencia histológica mucho más oscura que la médula (Tristram, 2002)

A medida que los linfocitos van madurando y diferenciándose van emigrando hacia la medula. La medula del timo alberga linfocitos T en menor proporción que la corteza además de células epiteliales que favorecen la maduración de los timocitos (Goldsby, *et al*, 2004).

Desde esta perspectiva se plantea que los resultados obtenidos en la medición del diámetro de la corteza y medula tímica sugieren que la FCL de frijol Tépari, en ambas dosis utilizadas, no presenta un efecto mitógeno evidente sobre timocitos. Si bien se encontraron diferencias significativas en el diámetro de la medula del grupo tratado y el grupo control, este resultado no demuestra un efecto

contundente de proliferación celular de la FCL sobre el timo. Lo anterior se pudo corroborar a través de inmunohistoquímica con un marcador de proliferación celular (resultados mostrados más adelante).

7.4 Distribución del marcador PCNA en bazo y timo.

Con la finalidad de localizar la distribución del marcador del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en los tejidos inmunes, se llevó a cabo la técnica de inmunohistoquímica en la que se utilizó un anticuerpo monoclonal contra PCNA (1:200) y un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (1:200) y posteriormente se reveló con diaminobencidina (DAB).

Los cortes histológicos de la IHQ de bazo, tanto para la D25FCL como para la D50FCL fueron observados con el objetivo 4x, 10x y 40x.

Los resultados de IHQ en tejido de bazo con la D50FCL no mostraron células positivas a PCNA a las 2 semanas de tratamiento en comparación con el grupo control (Figura 14). En contraste, en la semana 4 se observó una zona mayor de células en proliferación en centros germinales (Figura 15-H) en comparación con el grupo control. Mientras que en la semana 6 de tratamiento no se encontró células positivas a PCNA (Figura 16).

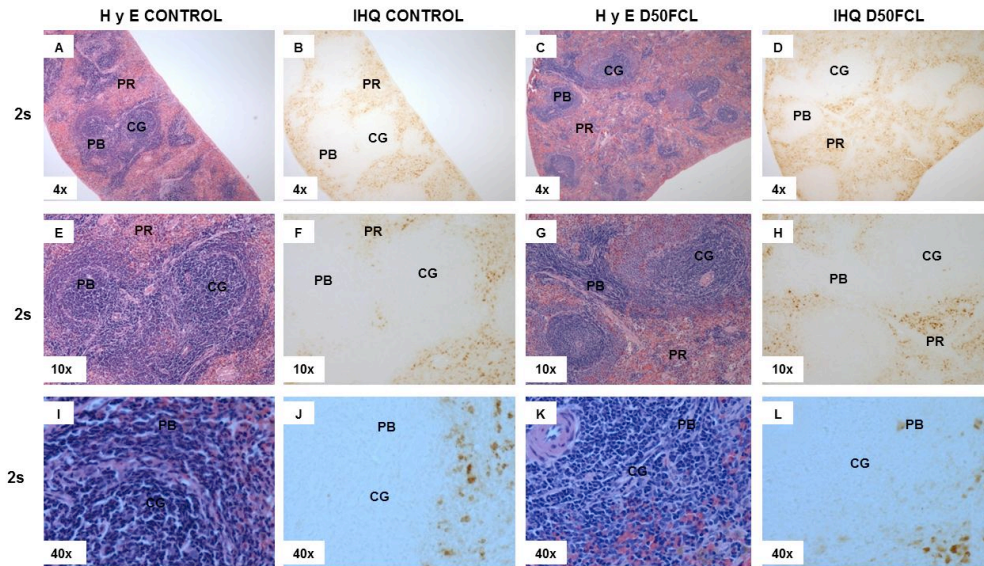


Figura 14. Inmunohistoquímica de bazo (semana 2 de tratamiento). Corte histológico de bazo con tinción de H y E (A, E, I), e inmunohistoquímica (IHQ) con un anticuerpo monoclonal contra PCNA (B, F, J) del grupo control a las 2 semanas de tratamiento. Corte histológico de bazo con tinción de H y E (C, G, K) e IHQ con un anticuerpo monoclonal contra PCNA (D, H, L) del grupo tratado con la D50FCL a las 2 semanas de tratamiento. CG: centro germinal; PR: pulpa roja; PB: pulpa blanca.

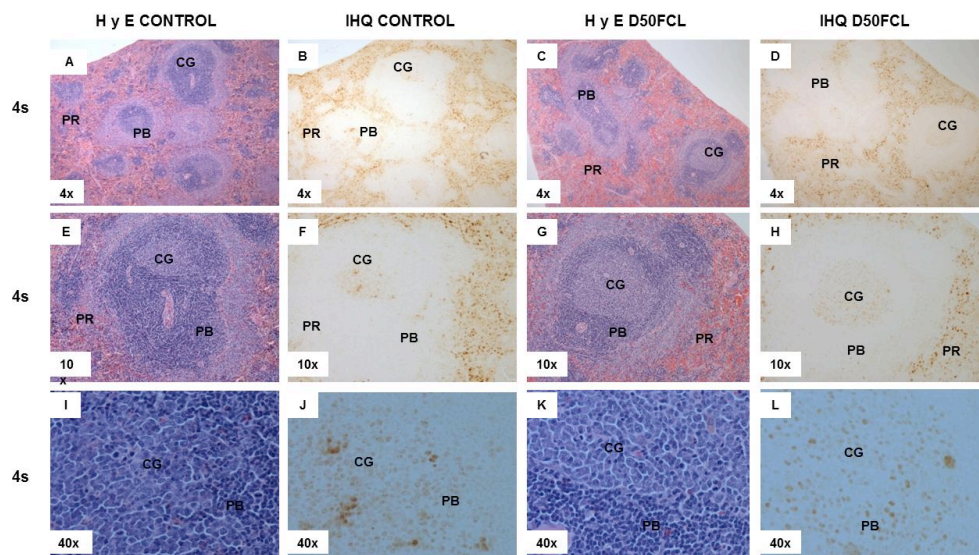


Figura 15. Inmunohistoquímica de bazo (semana 4 de tratamiento). Corte histológico de bazo con tinción de H y E (A, E, I), e inmunohistoquímica (IHQ) con un anticuerpo monoclonal contra PCNA (B, F, J) del grupo control a las 4 semanas de tratamiento. Corte histológico de bazo con tinción de H y E (C, G, K) e IHQ con un anticuerpo monoclonal contra PCNA (D, H, L) del grupo tratado con la D50FCL a las 4 semanas de tratamiento. CG: centro germinal; PR: pulpa roja; PB: pulpa blanca.

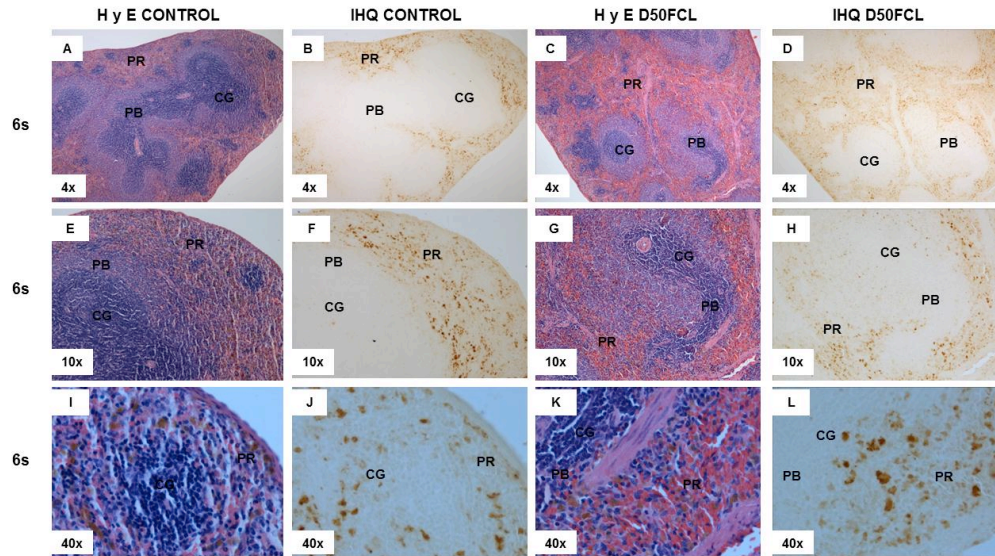


Figura 16. Inmunohistoquímica de bazo. Corte histológico de bazo con tinción de H y E (A, E, I), e inmunohistoquímica (IHQ) con un anticuerpo monoclonal contra PCNA (B, F, J) del grupo control a las 4 semanas de tratamiento. Corte histológico de bazo con tinción de H y E (C, G, K) e IHQ con un anticuerpo monoclonal contra PCNA (D, H, L) del grupo tratado con la D50FCL a las 4 semanas de tratamiento. CG: centro germinal; PR: pulpa roja; PB: pulpa blanca.

En el grupo tratado con la D25FCL se encontró células positivas a PCNA en la zona de los centros germinales en la semana 6 del tratamiento (Figura 17) en comparación con el grupo tratado con la D50FCL y el grupo control.

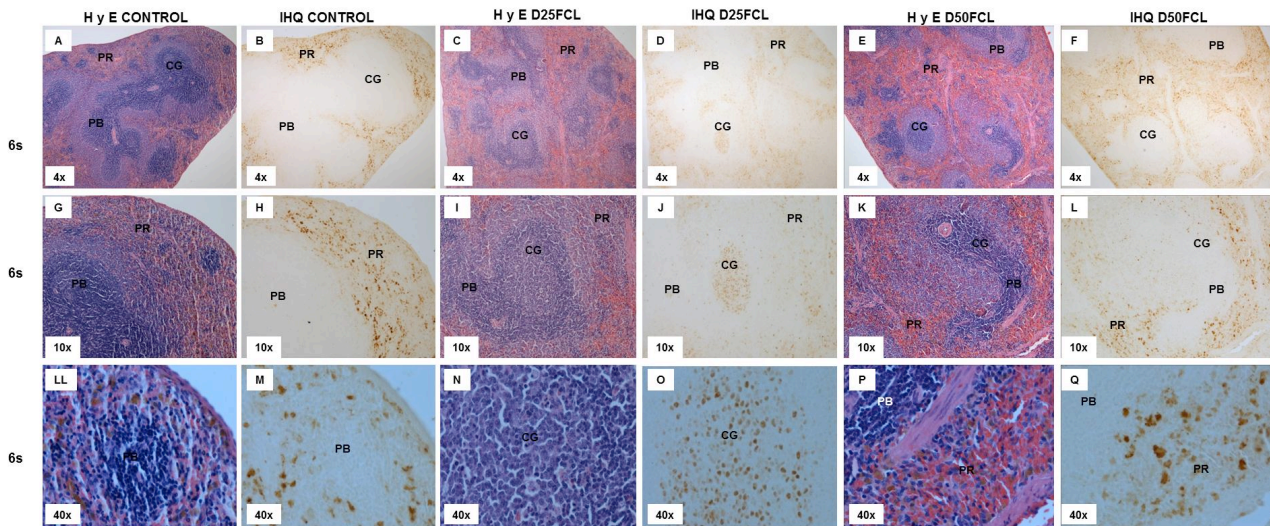


Figura 17. Inmunohistoquímica de bazo. Corte histológico de bazo con tinción de H y E (A, G, LL), e inmunohistoquímica (IHQ) con un anticuerpo monoclonal contra PCNA (B, H, M) del grupo control a las 6 semanas de tratamiento. Corte histológico de bazo con tinción de H y E (C, I, N), e IHQ con un anticuerpo monoclonal contra PCNA (D, J, O) del grupo tratado con la D25FCL a las 6 semanas de tratamiento. Corte histológico de bazo con tinción de H y E (E, K, P) e IHQ con un anticuerpo monoclonal contra PCNA (F, L, Q) del grupo tratado con la D50FCL a las 6 semanas de tratamiento. CG: centro germinal; PR: pulpa roja; PB: pulpa blanca.

Tizard (2009) señala que las múltiples divisiones de linfocitos B y T_H llevada a cabo en el centro germinal confieren la apariencia pálida que se observa en los cortes histológicos del centro germinal. Dicha condición fue observada en la semana 4 de tratamiento con la D50FCL (Figura 15-G) y en la semana 6 de tratamiento con la D25FCL (17-I). Lo anterior concuerda con el análisis inmunohistoquímico con PCNA en donde se puede observar células inmunes en proliferación en la zona de centros germinales en la semana 4 de tratamiento con la D50FCL (15-H) y la semana 6 de tratamiento con la D25FCL (17-J).

Estos resultados sugieren que la FCL de frijol Tépari favorece la activación y proliferación de linfocitos B y T_H en centros germinales en bazo en función de la dosis utilizada y el tipo de administración.

En timo, tanto con la D25FCL (16-F, H) como con la D50FCL (16-J, L) no se encontró señal de células positivas a PCNA, en comparación con el grupo control (Figura 16-B, D).

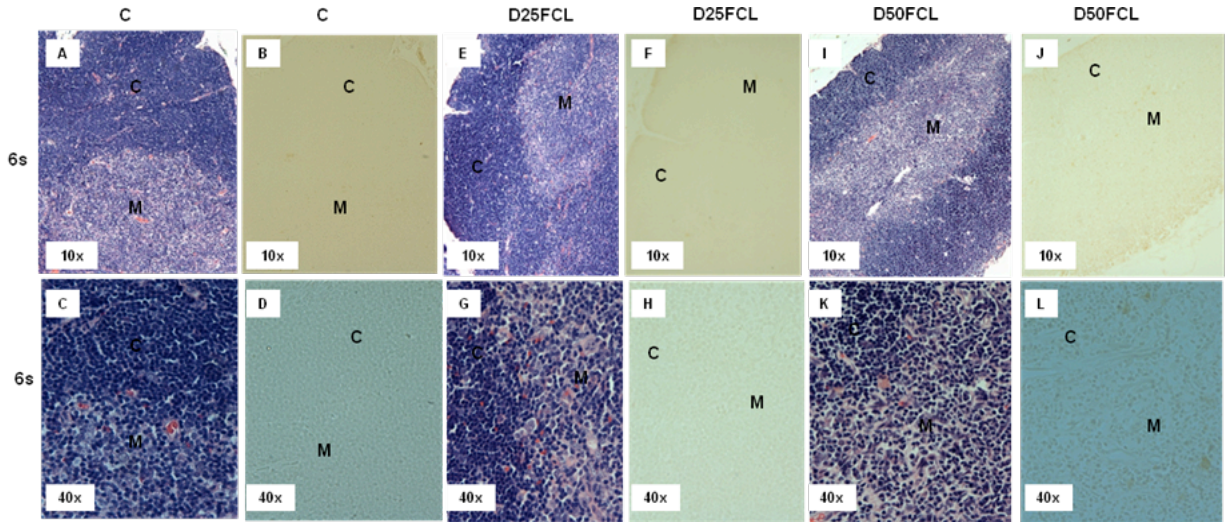


Figura 18. Inmunohistoquímica de timo. Corte histológico de timo con tinción de H y E (A, C), e inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal contra PCNA (B, D) del grupo control. Corte histológico de timo con tinción de H y E (E, G) e inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal contra PCNA (F, H) del grupo tratado con la D25FCL. Corte histológico de timo con tinción de H y E (I, K) e inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal contra PCNA (J, L) del grupo tratado con la D50FCL. Grupos correspondientes a la semana 6 de tratamiento. C: corteza; M: médula.

Por tanto, se infiere que la FCL del frijol Tépari muestra un efecto diferencial sobre órganos linfoides siendo mayor este efecto sobre el órgano secundario (bazo).

VIII. CONCLUSIONES

- El peso de las ratas tratadas se mantuvo sin cambios lo cual sugiere que la FCL a las dosis utilizadas (D25FCL y D50FCL) no presentó efectos antinutricios en los animales tratados.
- En células inmunes circulantes no se observó un efecto mitógeno. Sin embargo, sería conveniente ampliar el estudio utilizando marcadores celulares (CD4, CD8, CD19, entre otros) que permitan determinar en forma específica el linaje celular del sistema inmune sobre el cual tiene efecto la FCL.
- La D50FCL presentó efectos sobre el peso del timo con una recuperación del mismo. Lo anterior evidencia la baja toxicidad que presenta la FCL sobre órganos linfoides.
- La administración de la FCL por vía oral a la D25 y D50 no mostró efecto inflamatorio evidente sobre los tejidos estudiados.
- Con la D50FCL se observó un incremento en el número de centros germinales en bazo lo cual sugiere que la FCL presenta efectos sobre la activación y proliferación de células inmunes propias de esta zona.
- Los centros germinales en bazo mostraron células positivas a PCNA con la D25FCL lo cual sugiere un proceso de proliferación celular. Al ser los centros germinales una zona que alberga linfocitos B, macrófagos y células dendríticas, se considera pertinente realizar estudios posteriores utilizando marcadores específicos para determinar cuál de estos tipos celulares se activa con la FCL.
- En el timo no se observó proliferación celular, ya que las células fueron negativas a PCNA.
- La FCL, a las dosis utilizadas, muestra un efecto diferencial sobre órganos linfoides siendo mayor este efecto sobre el órgano linfóide secundario (bazo) donde existen indicios de proliferación celular.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, R. y J. Watzon. 1996. Biología Molecular de la Célula. 3ra ed. Omega, Barcelona, España.
- Barrera, R., O. Peralta, y V. Madrid, 1995. Bases moleculares de la inmunología del cáncer. Salud Pub. México 37:20-26
- Boldth, D. y E. MacDermott. 1975. Interaction of plant lectins with purified human lymphocyte population: binding characteristics and kinetics of proliferation. Inmunol. 114:1532-1536.
- Bhutia SK., S. Mallick, S. Maiti, D. Mishra, T. Maiti. 2009 Abrus abrin derived peptides induce apoptosis by targeting mitochondria in HeLa cells. Cell Biol Int. 33(7):720-7.
- Castañeda-Cuevas, A., L. Yllescas-Gasca, J. López-Martínez, E. Mendiola-Olaya, A. Blanco-Labra, y T. García-Gasca. 2007. Efecto Antiproliferativo *In Vitro* de una Lectina de Frijol Tépari sobre diferentes tipos de Cáncer Humano. Memorias del 2° Congreso Nacional de Química Médica. RESPYN 7 (Edición especial).
- Castillo, A., y F. Abdullaev. 2005. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. Rev. Invest. Clin. 57:55-64.
- Cesta, M. 2006. Normal structure, function and histology of the spleen. Toxicology Pathology, 34:445-465
- Clement F., S. Pramod, Y. Venkatesh. 2010. Identity of the immunomodulatory proteins from garlic (*Allium sativum*) with the major garlic lectins or agglutinins. Int Immunopharmacol. 10(3):316-24.
- Cordoba, F., y M. Martínez. 1997. Estudio Bioquímico de la evolución de la lectina de coleoptilo de maíz. <http://www.laboratorio.com.mx/ito00007.html> Consultado Enero, 2010
- Elmore, S. 2006. Enhanced histopathology of the thymus. Toxicol. Pathol. 34:656–665.
- Finn, G. 2005. Histología. 3ra. Ed. Panamericana, Madrid, España. pp. 400-450
- Freed, D. 1999. ¿Do dietary lectins cause disease? Br. Med. J. 318:1023-1024.

- Gabious, H. 2001. Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: Case studies for the mistletoe lectin and galectin-1. *Biochim.* 83:659-666.
- Gall, P. 2006. Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicol. Pathol.* 34:504-514.
- Gartner, L. y J. Hiatt. 1997. *Histología, Texto y Atlas*. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. pp. 260-265
- Goldsby, R., T. Kindt, B. Osborne, y J. Kubly. 2004. *Inmunología*. McGraw-Hill. México, D.F. pp. 61-262
- González, E., C. Hankins, O. Paredes y M. Shannon. 1989. The lectins and lectin-like proteins of tepary beans (*Phaseolus acutifolius*) and tepary-common bean (*Phaseolus vulgaris*) hybrids. *J. Food Biochem.* 14:117-126.
- Grossman, Z. y R. Herberman. 1986. Immune surveillance without immunogenicity. *Immunol. Today.* 7:128-131.
- Hernández-Rivera, E., E. Mendiola-Olaya, A. Blanco-Labra y T. Gracia-Gasca. 2007. Efecto citotóxico diferencial de una fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus Acutifolius*) sobre Células Cancerígenas. Memorias del 2° Congreso Nacional de Química Médica. RESPYN 7 (Edición especial):1-4
- Hernández, P., M. González, Y. Rodríguez y G. Báez. 1999. Aplicaciones de las lectinas. *Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 15(2): 91-95
- Hernández, P., E. Pérez, L. Martínez, B. Ortiz y G. Martínez. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Rev. Educ. Bioquim.* 24:21-27.
- Idouraine, A. y S. Yensen. 1991. Tepary bean flour, albumin and globulin fractions functional properties compares with soy protein isolate. *J. Food Sci.* 56:1316-1318.
- Janeway, C., P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik. 2003. *Inmunobiología: El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. 2ª ed. Masson, Barcelona, España. pp. 50-96
- Lajolo, F. y M. Genovese. 2002. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *J. Agric. Food Chem.* 50:6592-6598.

- Lam SK y T. Ng. 2010. Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield. *Phytomedicine*. 17(6):457-62.
- Lam SK, Q. Han, T. Ng. 2009. Isolation and characterization of a lectin with potentially exploitable activities from caper seeds. *Biosci Rep*. 29(5):293-9.
- Lee CH, J. Kim, H. Kim, S. Park, S. Lee. 2009. Immunomodulating effects of Korean mistletoe lectin *in vitro* and *in vivo*. *Int Immunopharmacol*. 9(13-14):1555-61.
- Lin P y T. Ng. 2008. Preparation and biological properties of a melibiose binding lectin from *Bauhinia variegata* seeds. *J Agric Food Chem*. 56(22):10481-6.
- Liu B, Zhang B, Min MW, Bian HJ, Chen LF, Liu Q, Bao JK. 2009. Induction of apoptosis by *Polygonatum odoratum* lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1790(8):840-4.
- López Martínez, F. J. 2007. Efecto *in vitro* de una lectina de frijol tépari sobre células de cáncer de colon humano. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.
- López, C. F. López, A. Castañeda, L. Yllescas, R. Ferriz, I. Torres, M. Gallegos, A. Rodríguez, E. Mendiola, A. Blanco, T. García. 2010. Evaluación de la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de lectinas de frijol Tépari. *Rev Ciencia@UAQ*; 3: 3-14.
- Luo Y, Xu X, Liu J, Li J, Sun Y, Liu Z, Liu J, Van Damme E, Balzarini J, Bao J. 2007. A novel mannose-binding tuber lectin from *Typhonium divaricatum* (L.) Decne (family Araceae) with antiviral activity against HSV-II and anti-proliferative effect on human cancer cell lines. *J Biochem Mol Biol*. 40(3):358-67.
- Machuka, S., G. Okeola, J. Van Damme, J. Chrispeels, V. Leuven y J. Peumans. 1999. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochemistry*. 51:721-728

- NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. <http://148.243.71.63/default.asp?doc=743> Consultado en diciembre del 2009.
- Osman, M., P. Reid y C. Weber. 2003. The effect of feeding tepary bean (*Phaseoleus acutifolius*) proteinase inhibitors on the growth and pancreas of young mice. *Pak. J. Nutr.* 2:111-115.
- Park, HJ. J. Hong, H. Kwon, Y. Kim, K. Lee, J. Kim, S. Song. 2010. TLR4-mediated activation of mouse macrophages by Korean mistletoe lectin-C (KML-C). *Biochem Biophys Res Commun.* 4;396(3):721-5.
- Pusztai, A. y S. Bardocz. 1996. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. *Trends Glycosilation Glicotechnol.* 8:149-165
- Rabinovich, G. y N. Rubinstein. 2001. Galectinas: una nueva familia de proteínas involucradas en la regulación de la respuesta inmune. *Medicina.* 61:85-92.
- Regueiro, J. 2006. Inmunología. Biología y patología. 3ª ed. Panamericana, México, D.F. pp. 19-59
- Riaño, M. 2005. Importancia y aplicaciones de las lectinas. Monografías. <http://www.monografias.com/trabajos1/lecti/lecti.shtml> Consultado en Junio del 2009
- Rhodes, J.M. 1999. Beans means lectins. *Gut.* 44(5):593-594
- Rodríguez-Méndez, A. 2008. Efecto de la lectina de frijol Tepari en leucocitos de rata. Memorias 1er. Foro de investigación biomédica. Facultad de Medicina. U.A.Q.
- Roitt, B. 2006. Inmunología. 5ª ed. Harcourt, México, D.F. pp. 188-200
- Rojas, O. 2001. Inmunología. Panamericana, México, D.F. pp. 9-40
- Rüdiger, H. y H. Gabius. 2001. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj. J.* 18:589–613.

- Ruiz, V., C. Boffill. O. González. M. Masjuan. F. Blanco. 2005. Efecto inmunomodulador de la Fitohemaglutinina de *Phaseolus acutifolius*. Rev Cubana Invest Biomed. 24(1):5-13
- Sathyanarayanaiah, K. y I. Sánchez. 1991. Evaluación de características de raíz y vástago de frijol Tèpari (*Phaseolus acutifolius*). Revista Científica Agraria. 7:26-35
- Savino, W., D. Mendez, S. Smaniotto, E. Silva y M. Serra. 2004. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. J. Leukoc Biol. 75: 951-61
- Sharon, N. y H. Lis. 2004 History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology. 14: 53-62
- Sell, S. 1987. Immunol, immunopathol and immunity. 6a. ed. <http://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=s62zl56GZOAC&oi=fnd&pg=PA3&dq=Immunology,+immunopathology+and+immunity&ots=0rkZfxCbdA&sig=9XBcKgeUOjcFRS2nq99OrA-niZs#v=onepage&q&f=false>
Consultado en septiembre del 2009.
- Smeltzer, S. y B. Bare. 2004. Enfermería Médico-quirúrgica. McGraw-Hill Interamericana, México, D.F. pp. 125-140
- Tizard, I. 2009. Inmunología Veterinaria. 8ª. ed. Interamericana-McGraw-Hill, México, D.F. pp. 113-125
- Tórtora, G. y B. Derrickson. 2006. Principios de Anatomía y Fisiología. Panamericana, México, D.F. pp 809-851
- Torres, I. 2010. Purificación y caracterización parcial de una lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) con actividad citotóxica sobre células cancerígenas. Tesis de Maestría en Nutrición Humana. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Tristram, G., D. Parslow, I. Stites, J. Terr. 2002. Inmunología básica y clínica. 10ª ed. Manual Moderno, México, D.F. pp. 750-792
- Van, E. F. De Cupere, E. Cruz, J. Machado, S. Beeckmans. 2000. Lectinas de origen vegetal: definiciones, métodos de purificación y aplicaciones. Acta Farm. Bonaerense 19:147-54.

- Vargas, F., G. de la Fuente, C Agundis y F. Córdoba. 1987. Purification and characterization of a lectin from *Phaseolus acutifolius* var. *latifolius*. *Biochem.* 17(4):379-96
- Velásquez, L., R. Ferriz., T. Gasca. 2008. Determinación de la presencia de lectina de frijol Tèpari en heces como indicador de resistencia a la digestión. <http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2008/10VeranoRegionCentro/31UACVelasquezMartinez.pdf> Consultado en marzo del 2010.
- Yoon TJ., Y. Yoo, T. Kang, S. Song, K. Lee, E. Her, K. Song, J. Kim. 2003. Antitumor activity of the Korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells. *Arch Pharm Res.* 26(10):861-7.
- Wong, H. 2002. Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferativ and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. *Biochem Biophys Res Commun* 301:545-550.