



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana

**ESTUDIO DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DE UNA  
FRACCIÓN CONCENTRADA DE LECTINAS DE FRIJOL  
TEPARI (*Phaseolus acutifolius*) EN RATAS**

TESIS

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

**Presenta:**

Q.F.B. Rosa Guadalupe López Reyes

**Dirigida por:**

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

**SINODALES**

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Presidente

Dr. Alejandro Blanco Labra  
Secretario

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito  
Sinodal

Dr. Adriana Jheny Rodríguez Méndez  
Sinodal

Dra. Guadalupe Soto Rodríguez  
Sinodal

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

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

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Octubre 2016  
México

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO A CARGO DE LA DRA. TERESA GARCÍA GASCA.**

## RESUMEN

Dadas sus propiedades de reconocimiento, se ha observado que algunas lectinas de leguminosas presentan efecto mitogénico sobre linfocitos T, así como efecto como inmoduladores. Dicho efecto se debe a la interacción de las lectinas con receptores presentes en la superficie de células inmunes, induciendo a la expresión de citocinas que participan en la activación de células inmunitarias. Estudios previos han mostrado que lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) provocan aumento en granulocitos, particularmente eosinófilos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto inmunomodulador en ratas Sprague Dawley de una fracción concentrada de lectinas (FCL) de frijol Tépari. Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 5 semanas de edad, las cuales se mantuvieron en condiciones controladas. Después de una semana de aclimatación se les administró 50 mg/Kg de peso de la FCL vía intragástrica durante 6 semanas, cada tercer día, con un descanso de 14 días. Después del descanso, se administró una última dosis. El grupo control fue tratado con una solución salina únicamente. Se realizaron sacrificios los días 1, 9, 22, 43, 57 y 58 de tratamiento para obtener sangre total, suero y se disectaron el bazo y el timo. Se realizó biometría hemática (BH), se analizaron las poblaciones celulares en sangre, T CD4+, T CD8+, T CD25+ mediante citometría de flujo y se realizó inmunohistoquímica en bazo. Los resultados no mostraron pérdida en la ganancia de peso corporal y del consumo de alimento del grupo que recibió el tratamiento con FCL respecto al control. No se encontró afectación en el peso de órganos inmunológicos y la BH mostró cambio respecto al porcentaje de linfocitos y granulocitos, lo que sugiere una actividad inmune debido al tratamiento con la FCL. Los estudios histopatológicos de bazo no mostraron cambios significativos en cuanto al número de centros germinales, pero sí en el diámetro y área de éstos, con una mayor presencia del factor de transcripción FoxP3 alrededor de estos. Futuros estudios se enfocarán en el estudio de marcadores moleculares en los órganos blanco.

**Palabras clave:** Bazo, frijol Tépari, bazo, inmunomodulación, *Phaseolus acutifolius*, FoxP3.

## SUMMARY

Given their recognition properties, it has been observed that some lectins legumes have mitogenic effect on T cells, as well as effect immunomodulators. This effect is due to the interaction of lectins with receptors on the surface of immune cells, inducing the expression of cytokines involved in activation of immune cells. Previous studies have shown that lectins from Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) cause an increase in granulocytes, in particular eosinophils. The aim of this study was to investigate the immunomodulatory effect in Sprague Dawley rats of a concentrated fraction of lectins (FCL) from Tepary bean. Male Sprague Dawley rats of 5 weeks old were used, which were maintained under controlled conditions. After a week of acclimatization they were intragastrically administered 50 mg/kg body weight of the FCL for 6 weeks, every third day, with a break of 14 days with a last dose after the break. The control group was treated with saline only. Sacrifices were made on days 1, 9, 22, 43, 57 and 58 of treatment where total blood, serum and spleen and thymus dissections were taken. CBC was performed; the cell populations were analyzed in blood, TCD4+, TCD8+, TCD25+ were determined by flow cytometry and immunohistochemistry was performed in spleen. The results showed no loss in body weight gain and food consumption in the group receiving treatment compared to the control FCL. No changes were found in the weight of immune organs. CBC showed change in the percentage of lymphocytes and granulocytes, suggesting an immune activity due to treatment with the FCL. Histopathological studies of the spleen showed no significant changes in the number of germinal centers, but differences in the diameter and area were observed, with a greater presence of the transcription factor FoxP3. Future studies will focus on the study of molecular markers in the target organs.

**Keywords:** Tepary bean, spleen, immunomodulatory, *Phaseolus acutifolius*, FOXP3.

## AGRADECIMIENTOS

***“Dulces son los frutos de la adversidad que, semejante al feo y venenoso sapo, lleva en la cabeza una preciosa joya”*** W. Shakespeare

- A CONACYT por el apoyo recibido durante la realización de este trabajo.
- A FOPER por el apoyo financiero.
- A la Dra. Teresa García Gasca, por su apoyo, orientación, por siempre tener un momento para mí, por creer en mí y hacerme parte de su equipo de trabajo. Por todas las facilidades para la realización de esta tesis Gracias por todo el aprendizaje, porque cuando pensaba que no podía más, usted me demostró que si se podía. ¡Gracias!
- A la MC Julia, al Biólogo José López Martínez y los miembros del laboratorio de biología celular.
- A la Dra. Carmen Mejía por su amistad, ayuda y sus muy valiosos consejos durante la realización de este proyecto.
- A la MVZ Verónica Andrade, por su apoyo durante los sacrificios.
- A la M.C Mary Guerrero y la MC. Paola Aranda, por su apoyo en la realización de los cortes histológicos.
- A las Dra Marisela y Mahinda del laboratorio de botánica, así como a su equipo de trabajo.
- Al Dr. Elhadi y su equipo de trabajo del laboratorio de Fitoquímicos.
- Al Dr. José Guadalupe y los miembros del laboratorio de nutrición Animal.
- A la técnico Leticia Castillo Heredia, gracias por tu amistad y tu apoyo incondicional.
- A la M.C Mariela por su amistad y orientación.
- Al personal administrativo y de seguridad de la Facultad de Ciencias Naturales.
- A la M.C Susana Sosa por su amistad, apoyo y orientación.
- Al Dr. Christian Molina Aguilar del laboratorio B11 de la UNAM, por su apoyo en el análisis de las IHQ.
- Al Dr. Roberto Augusto, por su amistad, sus consejos y apoyo en la realización de este trabajo.
- A la Dra. Guadalupe Soto, “Lupita”, por confiar en mí, por orientarme, por su apoyo, por sus palabras de motivación desde la Lic. Hasta la maestría, por inspirarme a seguir adelante en el camino de la ciencia. Gracias por no dejarme tirar la toalla nunca... Gracias por hacer este sueño posible. ¡Gracias, un párrafo no resume todo el profundo agradecimiento que tengo!

- Al Dr. Juan Joel Mosqueda, por inspirarme con su ejemplo, por generar en mí ese amor a la inmunología, por sus palabras de motivación, por su amistad, por hacerme sentir como en casa, gracias Dr. Por creer en mí, por escucharme, gracias por motivarme a nunca rendirme, siempre será una persona que me inspire.
- A la Dra. Marisela Ahumada, por creer en mí, por orientarme, por escucharme, guiarme, por confiar en mí, por estar ahí en el momento preciso, por guiarme en este sendero de la investigación, gracias por esos sábados en el laboratorio, gracias por su amistad. ¡Gracias, no me bastarán las palabras!
- A la Dra. Adriana Jheny Rodríguez Méndez y su equipo de trabajo.
- Al Dr. Blanco y su equipo de trabajo.
- A la Dra. Gabriela López por recibirme en su laboratorio en la Cd. México. Gracias por toda la confianza depositada en mí y en el trabajo.
- A Wendoline, “Wemby”, por estos dos años de amistad, por todos esos momentos en el laboratorio y fuera de él, por tu comprensión durante mis muy acostumbrados lapsus de stress, Te quiero Wemby!
- A Emiliano, por ofrecerme tu amistad, por apoyarme, por creer en mí, por orientarme, por esos momentos a las 2 am en el laboratorio... ¡Te quiero amigo!
- A Marisela Quiróz, “Marcheeela” (léase con acento italiano), porque contigo descubrí que trabajo muy bien bajo presión. Me has hecho romper records en tiempo que nunca creí alcanzar.
- A Karina Estela “Cara”, por su amistad estos dos años
- A la Dra. Cristina Torres, por siempre tener un espacio para escucharme y orientarme, gracias por su amistad Dra.
- Al QFB Diego Josimar, por su amistad y orientación.
- A mis compañeras de maestría, en especial a Lucy y a Leonella, por su incondicional apoyo!

## DEDICATORIAS

***“Gracias a la vida, porque tuve la bendición de encontrar gente más inteligente y con más experiencia que yo, y ellos me han ayudado a ejecutar la visión que tengo.”*** Modificado de Russel Simmons

Gracias al ser supremo que me ha permitido estar 25 años en la tierra, mi nacimiento es un milagro, y mi existencia es una prueba de su misericordia. Él me ha dado fortaleza para continuar, gracias por enviarme con tan grandes seres humanos: Mis padres. Gracias por cubrirme con tu manto celestial.

Hace tiempo leí un proverbio africano que decía así: “Si quieres ir rápido ve solo, si quieres llegar lejos, ve acompañado”, yo he tenido la bendición de caminar de la mano de mis padres: Amanda Reyes Vázquez y Juan López Velázquez, gracias por pelear batallas por y conmigo, por creer en mis sueños (por más locos que suenen, por más que les lleguen a asustar), por estar a mi lado en los momentos de frustración, de dolor, por nunca dejar que desistiera, porque ustedes jamás me cortaron las alas, al contrario, me han impulsado a volar cada vez más alto, por ustedes soy quien soy, por ustedes seré, porque ustedes son mi mayor motivación. Gracias mamá, gracias papá, he aquí el fruto del trabajo en equipo, los amo.

*“Guenda nabani xhianga sicarú, ne gasti rú ni Ugaanda laa, Diuxhi biseenda laanu idxi layú, ne laa cuidxi laanu ra nuu”* (La vida es muy hermosa, y no hay nada que se le compare, Dios nos mandó a la tierra y Él mismo nos llamará a su lado). A mi tío Wilfrido López Velázquez(†), “tío Willy”, porque aunque hace 4 años las circunstancias de la vida te arrebataron de mi lado en este plano terrenal, sé que siempre estás conmigo, tus enseñanzas siguen presentes en mí, vivo para honrar tu memoria, siempre llevo tu corazón conmigo, nunca estoy sin él, donde quiera que voy, siempre estás conmigo. Sé que este momento hubiera sido tan especial para ti, como para mí lo es, este logro, también es tuyo, te quiero tío.

A la Dra. Guadalupe Soto, por ser clave en mi vida para seguir en el camino de la investigación, por no solo ser mi guía en la licenciatura y parte de mi comité sinodal en la maestría, sino por la amistad que me ha brindado estos años. ¡Gracias amiga!

A la Dra. Marisela Ahumada, por su comprensión, por su motivación, por confiar en mí, gracias por todo su apoyo.

## INDICE

- I. Introducción
- II. Antecedentes
  - 2.1 Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*)
  - 2.2 Lectinas
  - 2.3 Lectinas y sistema inmune
  - 2.4 Lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*)
  - 2.5 Sistema Inmune
    - 2.5.1 Bazo
      - 2.5.1 Regiones del bazo
  - 2.6 Linfocitos
  - 2.7 Factor de transcripción (FoxP3)
    - 2.7.1 FoxP3, Sistema Inmune y cáncer
- III. Justificación
- IV. Hipótesis
- V. Objetivos
- VI. Materiales y métodos
  - 6.1 Diseño experimental
  - 6.2 Evaluación del peso de animales y tejidos
  - 6.3 Evaluación de células sanguíneas
    - 6.3.1 Biometría hemática
    - 6.3.2 Recuento diferencial
  - 6.4 Evaluación de marcadores de diferenciación (CD) de linfocitos T
    - 6.4.1 Citometría de flujo
  - 6.5 Evaluación de morfología de bazo
    - 6.5.1 Análisis histológico
  - 6.6 Evaluación del factor de transcripción FoxP3 en bazo
    - 6.6.1 Inmunohistoquímica en parafina
  - 6.7 Análisis estadístico
7. Resultados y discusión de resultados
8. Conclusiones
9. Referencias Bibliográficas

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Efecto de lectinas de plantas sobre la producción de citocinas.....	6
<b>Cuadro 2.</b> Marcadores CD usados para distinguir subpoblaciones de linfocitos funcionales (modificado de Kindt y col., 2007).....	16
<b>Cuadro 3.</b> Parámetros en Biometría hemática (BH).....	24
<b>Cuadro 4.</b> Análisis de células sanguíneas mediante recuento en frotis sanguíneo y hemotinción en ratas tratadas con la FCL de Frijol Tépari.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Semilla de frijol Tépari ( <i>Phaseolus acutifolius</i> ).....	3
<b>Figura 2.</b> Histología de bazo de rata ( <i>Rattus norvergicus</i> ).....	11
<b>Figura 3:</b> Estructura de pulpa blanca y centro germinal del bazo.....	13
<b>Figura 4.</b> Estructura de la pulpa roja.....	14
<b>Figura 5.</b> Esquema de FoxP3 .....	19
<b>Figura 6.</b> Diseño experimental y esquema de administraciones.....	23
<b>Figura 7.</b> Promedio de peso corporal de ratas Sprague Dawley de 5 semanas .....	28
<b>Figura 8.</b> Ingesta de alimento por ratas Sprague Dawley de 5 semanas.....	29
<b>Figura 9</b> Pesos de órganos inmunológicos.....	30
<b>Figura 10.</b> Número de Centros germinales, área y longitud.....	31
<b>Figura 11.</b> Histología de bazo de los diferentes días de tratamiento.....	33
<b>Figura 12.</b> Histología de bazo de los días 43 y 57 de tratamiento.....	33
<b>Figura 13.</b> Efecto de la administración de FCL sobre células sanguíneas.....	35
<b>Figura 14.</b> Efecto de la FCL sobre parámetros hematológicos.....	36
<b>Figura 15.</b> Proporción de linfocitos y granulocitos del total de glóbulos blancos en ratas tratadas con la FCL de frijol Tépari.....	37
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de linfocitos TCD4+ ( $T_H$ ) y linfocitos TCD8+ ( $T_C$ ) en ratas tratadas con la FCL de frijol Tépari.....	39
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de linfocitos TCD25+ ( $T_{H1}$ ) ( $T_{H2}$ ) en CD4+ y CD8+, en ratas tratadas con la FCL de frijol Tépari.....	41
<b>Figura 18.</b> Controles negativos para inmunohistoquímica.....	42
<b>Figura 19.</b> Inmunohistoquímica de bazo de ratas.....	43

**Figura 20.** Densidad óptica de la inmunohistoquímica de Foxp3.....44

## I. INTRODUCCIÓN

Mediante mecanismos evolutivos, las plantas han generado sistemas de defensa contra el ataque de insectos y patógenos, basados en barreras estructurales o químicas o mediante una respuesta metabólica activa. Entre estos sistemas se encuentran proteínas que actúan sobre los depredadores que atacan a las plantas (Blanco-Labra y Aguirre-Mancilla, 2002). El frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*), miembro de la familia de las leguminosas, se adapta con más facilidad a altas temperaturas y sequías en comparación con otras variedades domesticadas por el hombre, como *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus coccineus*, *Phaseolus lunatus* y *Phaseolus gray* (González De Mejía y col., 1989; Sathyanarayanaiah y Sánchez, 1991). Sus componentes antinutricios y citotóxicos se atribuyen, entre otros factores, a la presencia de inhibidores de proteasas, taninos y lectinas, los cuales son relativamente abundantes en el extracto crudo, pero desaparecen casi completamente después de la cocción, por lo que al ser consumidos no representan riesgos a la salud (González de Mejía y col., 1989; Castillo-Villanueva y col., 2007).

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado una fracción concentrada en lectinas (FCL) de frijol Tépari, la cual presenta efectos antiproliferativos sobre células de cáncer (García Gasca y col., 2012) mediante inducción de apoptosis (datos no publicados). A través de estudios *in vivo* se ha observado que la FCL presenta baja toxicidad y buena tolerabilidad, con efectos antinutricios al ser administrada vía intragástrica en dosis de 50 mg/kg de peso corporal durante 6 semanas (Ferríz-Martínez y col., 2015).

Respecto al sistema inmune, se han observado efectos sobre el número y diámetro de centros germinales en ratas (Reyes-Rocha, 2011 datos no publicados), sin efectos en médula ósea de vértebra ni en fémur en ratas (Cruz-Jiménez, 2013 datos no publicados). Respecto a células hematopoyéticas, Ferriz-Martínez y col. (2015) observaron un cambio en la proporción de linfocitos y granulocitos, con incremento en el porcentaje de los granulocitos respecto a los linfocitos, incremento en el número de eosinófilos y basófilos en

sangre periférica y tendencia a incrementar la pulpa blanca en el bazo, (Moreno-Celis, 2014 datos no publicados).

Debido a lo anterior, se propuso estudiar los efectos de la administración de la FCL en poblaciones celulares de linfocitos T y células hematopoyéticas bajo diferentes esquemas de administración, a fin de evaluar su efecto como posible inmunomodulador.

## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1 Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*)

En México el consumo de frijol es tradicional. La especie más consumida de frijol es *Phaseolus vulgaris*, conocida como frijol común, perteneciente a la familia *Fabacea* (Jones, 1999). El frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) (Figura 1) es una especie que se adapta con más facilidad a altas temperaturas y sequías en comparación con otras especies. Además, *P. acutifolius* presenta mayor resistencia microbiana y a la depredación (González de Mejía y col., 1989; Sathyanarayanaiah y col., 1991).



**Figura 1.** Semilla de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*).

El frijol Tépari tiene como áreas de distribución regiones semiáridas de América del Norte. En México la principal área de distribución y, probablemente de origen, es el desierto sonorense. Aunque su consumo está todavía limitado a dicha región, esta cosecha es particularmente atractiva debido a sus características agronómicas (González de Mejía y col., 1989; Reynoso y col., 2003). Sus propiedades antinutricias se atribuyen principalmente a la presencia de inhibidores de proteasas, taninos y lectinas. En comparación con el frijol común, el frijol Tépari presenta concentraciones menores de lectinas sin embargo, poseen actividad biológica mayor, medida como actividad hemaglutinante (González de Mejía y col., 1989; Castillo-Villanueva y col., 2007).

## 2.2 Lectinas

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas oligoméricas termolábiles, que constituyen un grupo de moléculas de origen no inmune (Van Damme y col., 1998). Tienen la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a azúcares libres o glicanos específicos que formen parte de estructuras complejas como glicoproteínas o glicolípidos, sin alterar la estructura de los carbohidratos (Goldstein y Hayes 1978; Van Damme y col., 1998; Da Silva y col., 2014). Se encuentran distribuidas ubicuamente, desde bacterias hasta animales y plantas (Mody y col., 1995; Lannoo y col., 2014).

Las lectinas, pueden producirse como proteínas solubles o como proteínas asociadas a la membrana celular. Están implicadas en diversos procesos biológicos, incluyendo el reconocimiento célula-célula, proliferación celular, la migración celular, la adhesión celular a la matriz extracelular, e interacciones parásito hospedero (Van Damme y col., 1998). Presentan la propiedad de ser proteínas globulares altamente resistentes a la digestión por enzimas proteolíticas de los mamíferos consumidores (Freed 1999; Rhodes, 1999; Kelsall y col., 2002). Una vez que ingresan al tracto digestivo, se unen de manera específica con los receptores de la superficie de las células epiteliales del intestino (Rhodes y col., 1999; Lajolo y Genovese, 2002; González de Mejía y Prisecaru., 2005).

Por otro lado, las lectinas de las plantas son capaces de reconocer células animales, propiciando la aglutinación de eritrocitos y de otras células como espermatozoides y plaquetas, además de bacterias. Inducen mitosis y efectos citotóxicos en linfocitos y aglutinación de virus. Algunas lectinas se han evidenciado como potentes agentes inmunomoduladores (Da-Silva y col., 2014) y han mostrado poseer actividad sobre cáncer, tanto *in vitro* como *in vivo* y en estudios de casos humanos (Sharon y Lis, 1995; González de Mejía y Prisecaru, 2005; Końska y col., 2008).

Debido a la capacidad de estas proteínas para interactuar con células del sistema inmune, algunas lectinas poseen efectos inmunosupresores, como la lectina de muérdago (Hajto y col., 1989); otras son tóxicas, inhiben el

crecimiento de células tumorales o participan en la adhesión celular (Sharon, 2007; Ferríz-Martínez y col., 2010). Entre las lectinas con efecto mitogénico sobre los linfocitos destacan las provenientes de *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Canavalia ensiformis* (Con A), *Pisum sativum* (PSA) y *Fitolaca americana* (PWM) (Gong y col., 2007).

### **2.3 Lectinas e interacción con el sistema inmune:**

La interacción de las lectinas con células del sistema inmune induce efectos adicionales a la estimulación mitogénica, tal como la inmunosupresión (Sharon y col., 1974; Castillo-Villanueva y col., 2007). Diversas lectinas de las plantas ejercen función inmunomoduladora, que se inicia con la interacción con glicanos presentes en la superficie de las células inmunes (Gabiús 2001). Dicha interacción puede desencadenar la transducción de señales para producir ciertas citocinas (Cuadro 1) e inducir respuestas inmunes eficientes contra infecciones microbianas o tumores. Por lo tanto, las lectinas desde un punto de vista inmunomodulador tienen potencial uso farmacéutico (Souza y col., 2013).

Las sustancias inmunomoduladoras tienen la capacidad de mejorar o disminuir las funciones del sistema inmunitario, pueden ser inmunoestimulantes o inmunodepresores (Gao y col., 2013). Los primeros se utilizan para favorecer la respuesta en enfermedades infecciosas, tumores, inmunodeficiencias primarias y secundarias, fallo en las transferencias de anticuerpos (calostro), entre otros. Los fármacos inmunosupresores están indicados para mitigar la respuesta inmunitaria en caso de rechazo de órganos trasplantados o enfermedades auto inmunitarias. La inmunoestimulación se requiere cuando a pesar de funcionar con normalidad, la actividad natural del sistema inmunitario no es suficiente para reducir la carga infectiva (infecciones recurrentes) o cuando puede considerarse una medida terapéutica coadyuvante (como en la terapia contra cáncer) para restituir el potencial del sistema inmunitario (Dantas y col., 2000).

La principal sugerencia del papel inmunomodulador que juegan las lectinas vegetales se encuentra en función del tipo de inmunidad ejercida (tipo T<sub>H1</sub>), que se manifiesta por altos niveles de IFN- $\gamma$  (interferón gama), a través de un

mecanismo dependiente de interleucina 12 (IL-12) (Rogerio y col., 2007; Cardoso y col., 2011; Pereira-Da Silva y col., 2012). En ensayos *in vitro* con 12 diferentes lectinas de plantas, se demostró que 6 de esas lectinas inducen la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$  en células de bazo murino. Estas lectinas fueron ConA de *Canavalia ensiformis*, PHA y PHA-L a partir de *Phaseolus vulgaris*, PSA de *Pisum sativum* y WGA proveniente de *Triticum vulgaris* (Muraille y col., 1999).

**Cuadro 1. Efecto de lectinas de plantas sobre la producción de citocinas** (modificado de Souza y col., 2013).

Lectina	Fuente	Citocina	Referencia
<b>ArtinM</b>	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Aumento de: IL-12 e IL-10 (Macrófagos murinos y células dendríticas). TNF- $\alpha$ (mastocitos murinos) IL-10/IFN- $\gamma$ (células murinas de bazo)	Panunto-Castelo y col., 2001; Barbosa y col., 2011
<b>ConA</b>	<i>Canavalia ensiformis</i>	Estimulación de : IFN- $\gamma$ (células murinas de bazo) IFN- $\gamma$ e IL-2 ( células murinas de bazo) IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ (células mononucleares de sangre periférica humana—PBMCs)	Tomiyama y col., 2011
<b>Conbr</b>	<i>Canavalia brasiliensis</i>	Aumento de : IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ IFN- $\gamma$ (células murinas de bazo)	Reis y col., 2008; Silva y col., 2016
<b>KML</b>	<i>Viscum album var. coloratum</i>	Aumento de: IL-12 (células dendríticas humanas)	Yoon y col., 2001; Lyu y col., 2010.
<b>ML-I</b>	<i>Viscum album</i>	IL-12 (PBMCs humanas) IL-15 (Neutrófilos humanos) IL-6, TNF- $\alpha$ , e IL-10 (PBMCs humanos)	Langer y col., 199; Souza y col., 2013
<b>PHA</b>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	IFN- $\gamma$ e IL-2 (células de bazo murino)	Haiqi y col., 2011

Una de las primeras lectinas que mostró efecto sobre sistema inmune fue la de Jacalina (*Artocarpus heterophyllus*), que puede estimular *in vitro* a linfocitos T y B humanos y la producción de inmunoglobulinas (Ig) (Aucouturier y col., 1989). La lectina de jacalina puede indirectamente estimular la secreción de citocinas tales como la interleucina 6 (IL-6), inducir la expresión de linfocitos tipo CD4, la

diferenciación de células  $T_H$  a  $T_H$  productoras de interleucina 4 (IL-4), y producir células  $T_{H2}$  productoras de IgE.

Panunto-Castelo y col. (2001) propusieron un mecanismo de inmunomodulación para la administración de la lectina ArtinM. Brevemente, este mecanismo consiste en que la lectina ArtinM genera un incremento en la expresión de IL-12 mediante la unión al receptor 2 de tipo *Toll* de las células presentadoras de antígeno, lo cual conlleva a la activación de células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) y linfocitos T, generando un nuevo incremento en la expresión de IL-12 e interferón gamma por células T y macrófagos, activados a su vez por células NK.

Otro ejemplo de lectinas como inmunomoduladores es el extracto patentado de lectina de muérdago *Viscum album*, el cual cuenta con la aprobación federal para uso clínico en Europa y exhibe capacidad inmunomoduladora. Sin embargo, el mecanismo de acción responsable de esta respuesta inmune aún no está elucidado. En un estudio realizado por Hajto y col. en 1989 inyectaron dosis no tóxicas de lectina de *Viscum álbum* a conejos, encontrando aumentos significativos en poblaciones de células NK, linfocitos granulares, y actividad fagocítica de granulocitos. Los estudios mostraron que la aplicación de 0.5-3 ng/Kg de peso de lectina de *Viscum álbum*, dos veces por semana es eficaz para mantener la elevación en el número y actividad de las células NK de sangre periférica sin embargo, si se les inyectaba lectina con más frecuencia (a diario), las células NK ya no eran estimuladas, lo que indica que la aplicación frecuente puede conducir a una inflamación crónica. Básicamente, algunas lectinas de las plantas inducen la quimiotaxis de neutrófilos por su interacción con los propios neutrófilos. No obstante, esta migración puede ser aumentada por la acción de las lectinas en células residentes, tales como los mastocitos y macrófagos (Pereira-Da Silva y col., 2012).

#### **2.4 Lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*)**

Estudios realizados *in vitro* con lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre diferentes líneas celulares de cáncer humano han mostrado que posee efecto citotóxico diferencial sobre células normales y cancerígenas (Valadez-

Vega y col., 2011; García-Gasca y col., 2012). Se han realizado estudios *in vivo* con el fin de evaluar el efecto de la fracción concentrada en lectinas (FCL) de frijol Tépari en dosis de 50 mg/kg de peso corporal vía intragástrica, cada tercer día. En el 2011 Reyes-Rocha (datos no publicados), con ratas de 14 semanas de edad, observó un aumento en el número y diámetro de centros germinales en bazo con respecto al control a partir de la segunda semana de tratamiento, pero ningún cambio significativo en el timo. Cruz-Jiménez en el 2013 (datos no publicados), bajo un esquema de tratamiento subcrónico con una dosis de 50 mg/kg de peso corporal con ratas de 14 semanas de edad, no encontró diferencias que sugieran una actividad proliferativa o inhibitoria sobre médula ósea de vertebra ni de fémur.

La lectina de *Phaseolus acutifolius* variedad escumite (EsL) presenta efecto sobre leucocitos humanos en una concentración de 15 µg/mL. La EsL indujo proliferación celular tanto en CD4+ como en CD8+ sin embargo, el efecto de proliferación fue tres veces mayor sobre CD8+ que en CD4+ (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005). Pese al posible efecto del mecanismo inmunomodulador que juegan las lectinas vegetales, aún no se conocen del todo los mecanismos moleculares que causan dicha acción.

Estudios más recientes mostraron efectos sobre sistema hematopoyético, con disminución de linfocitos y pulpa blanca en el bazo, así como aumento de granulocitos (Ferriz-Martínez y col., 2015). Así mismo, se ha observado que tras la administración subcrónica de la FCL se provoca un aumento en el tamaño de las placas de Peyer (datos no publicados). Bajo un esquema de tratamiento subcrónico con administración cada tercer día con la FCL no se encontró diferencia sobre interleucina seis (IL-6) o factor de necrosis tumoral (TNF-α) (Moreno-Celis, 2014 datos no publicados). Los datos hasta ahora encontrados presentan evidencia sobre el efecto de la FCL sobre sistema inmune sin embargo, resulta necesario profundizar en este sentido.

## 2.5 Sistema Inmune

El sistema inmune es un conjunto de órganos, células y moléculas que llevan a cabo mecanismos capaces de proteger al organismo, al reconocer agentes patógenos potenciales (bacterias, virus, hongos, protozoos, parásitos, etc) y sus productos tóxicos (toxinas bacterianas), así como de células transformadas, e iniciar medidas para combatirlos (Kindt y col., 2007). La protección conferida por el sistema inmunitario puede dividirse en dos actividades vinculadas: reconocimiento y reacción (o respuesta) (Abbas y col., 2012).

La respuesta inmune se divide en dos tipos: respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa. La primera, también llamada natural, se refiere a la defensa que presenta el hospedero para bloquear la entrada de patógenos y eliminarlos antes que penetren en los tejidos. La inmunidad adaptativa, también llamada específica o adquirida, es un mecanismo de defensa más evolucionado, que es estimulado luego de la exposición a agentes infecciosos, y cuya capacidad e intensidad defensiva aumenta después de cada exposición. Existen dos tipos de inmunidad adaptativa, según el tipo de células que utilice en su respuesta: inmunidad adaptativa celular, producida por linfocitos T e inmunidad adaptativa humoral, producida por linfocitos B. La respuesta inmune innata y adaptativa mantienen un nexo a través de las citocinas, que son proteínas sintetizadas y secretadas por las células del sistema inmune que median muchas de las funciones, cuya secreción es breve y autolimitada (Kindt y col., 2007).

El sistema inmune se compone de órganos linfoides (Abbas y col., 2012):

1. Órganos linfoides primarios: Los linfocitos empiezan a madurar aquí, adquieren sus receptores específicos para cada antígeno. Los órganos primarios son: médula ósea y timo.

2. Órganos linfoides secundarios: Estos órganos están en epitelios y en lugares en los cuales los antígenos pueden acceder a la linfa o a la sangre. Los órganos linfoides secundarios son: ganglios linfáticos, tejido linfoide asociado a mucosa y bazo.

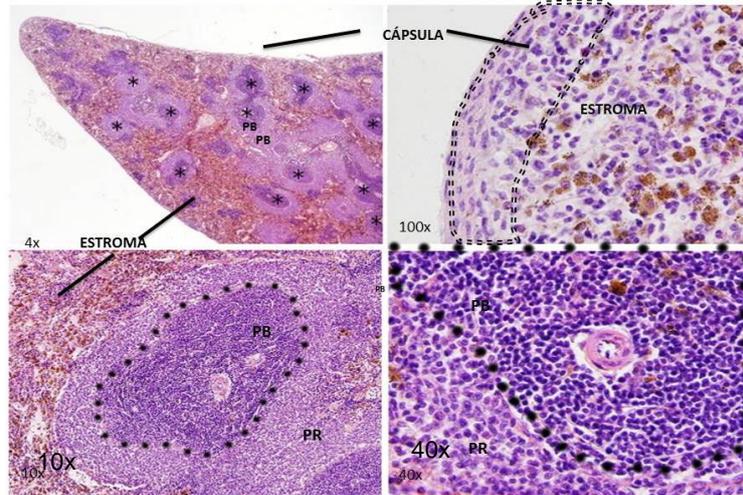
### 2.5.1 Bazo

El bazo es el mayor órgano linfoide, se encuentra envuelto en el peritoneo, tiene forma ovoide. Es el filtro principal para los agentes patógenos y antígenos presentes la sangre Es un órgano clave para el metabolismo del hierro y la homeostasis de los eritrocitos. Desempeña un papel importante en el montaje de respuestas inmunitarias contra antígenos en el torrente sanguíneo (Kindt y col., 2007). El bazo tiene importancia particular en la respuesta a infecciones sistémicas, diversas poblaciones esplénicas no sólo atrapan y eliminan antígenos transportados por la sangre, sino también inician la respuesta inmune de tipo innata y adaptativa contra los patógenos. A diferencia de los ganglios linfáticos el bazo carece de vasos linfáticos, en lugar de eso los antígenos transportados por la sangre y los linfocitos son conducidos hacia el bazo mediante la arteria esplénica y hacia afuera por la vena esplénica. Además de una gran cantidad de linfocitos, el bazo contiene espacios o conductos vasculares especializados, una malla de células reticulares y fibras reticulares, y está provisto de abundantes macrófagos y células dendríticas (Ross y Pawlina 2008). Estas células son las responsables de la función inmunológica del bazo.

#### 2.5.1.1 Regiones del bazo

Como el resto de los órganos linfoides, el bazo está formado por un estroma y un parénquima (Figura 2). El bazo está rodeado por una cápsula constituida por tejido conectivo denso y cantidades variables de fibras musculares lisas, recubierta por un mesotelio, que es parte del peritoneo general y engrosada en el hilio, donde entran las arterias y los nervios, a la vez que salen las venas y los vasos linfáticos; tiene forma ovoide (Bautista y col., 1194).

De la cápsula parten trabéculas constituidas por fibroblastos, fibras de colágeno, un mayor número de fibras elásticas que las existentes en la cápsula y cantidades variables de fibras musculares lisas (Burke y Simon 1970).



**Figura 2: Histología de bazo de rata (*Rattus norvegicus*)** cortes teñidos con Hematolixina y Eosina 4x, 10x, 40x y 100x. \*PB: Pulpa Blanca, PR: Pulpa Roja. Tomado de (Ross y Pawlina, 2015).

### 1. Estroma

El estroma está constituido por: 1) Cápsula de tejido conectivo denso irregular con fibras elásticas, miofibroblasto y alguna fibra muscular lisa (para poder adaptarse a los cambios de volumen del bazo cuando retiene cierta cantidad de sangre). 2) Trabéculas cilíndricas de tejido conectivo que se originan en la cápsula y que penetran en el interior del bazo donde forman una malla relativamente regular. 3) Tejido conectivo reticular formado por fibras de reticulina y células reticulares fibroblásticas que forman el soporte de las células parenquimatosas del bazo. Este tejido conectivo reticular es continuación del tejido conectivo de las trabéculas y de la cápsula. El parénquima se le conoce como pulpa esplénica.

### 2. Parénquima

Al cortar al bazo se distinguen zonas diferentes: unas zonas redondeadas o alargadas de color gris (la pulpa blanca) diseminadas en una masa de color rojo oscuro (la pulpa roja) (Bronte y Pittet, 2013).

En el parénquima del bazo se distinguen tres zonas o compartimientos morfológica y funcionalmente distintos: a) la pulpa esplénica blanca, b) la pulpa esplénica roja, que están separadas por una interfaz denominada c) zona marginal (ZM) (Bronte y Pittet., 2013).

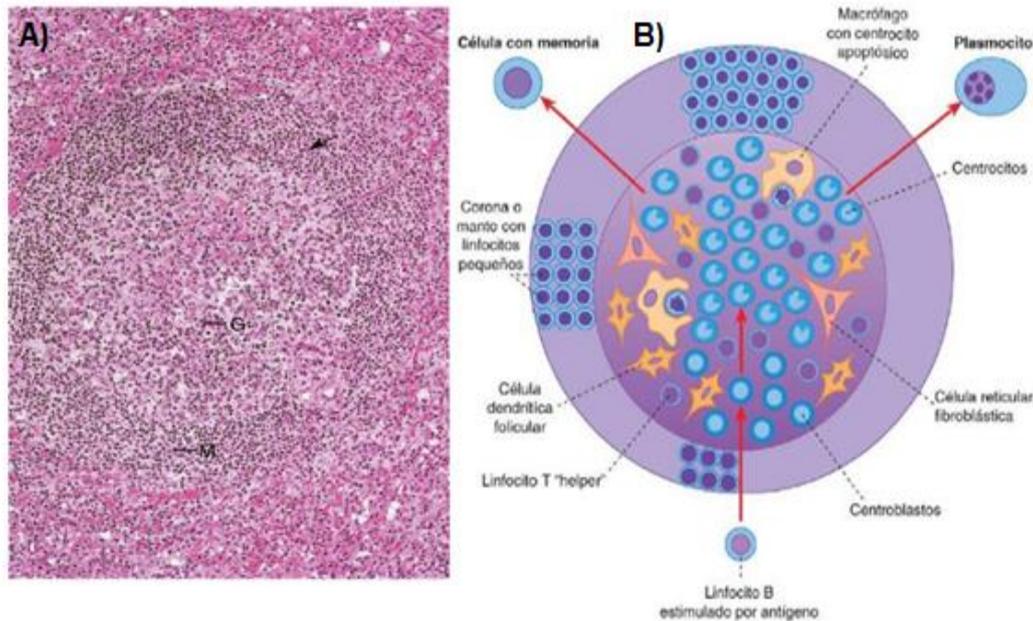
a) Pulpa esplénica blanca (PB)

Está constituida por las vainas linfoides periarteriales y los folículos linfoides (Figura 3A), los folículos linfoides pueden tener centros germinativos o no, dependiendo de su estado funcional. Los folículos linfoides están ocupados, fundamentalmente por linfocitos, algunas células plasmáticas, células reticulares, células presentadoras de antígeno (CPA) y macrófagos (Bloom y Fawcett, 1987) (Figura 3B).

La pulpa blanca es el tejido linfoide distribuido por todo el bazo, alrededor siempre de una arteria o arteriola, en forma de nódulos linfoides típicos (Folículos linfoides o de Malpighy). En los cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina (HE), la pulpa blanca aparece basófila a causa de la heterocromatina densa en los núcleos de los numerosos linfocitos, se observa como regiones blanco grisáceas circulares o alargadas que están rodeadas por la pulpa roja. La pulpa blanca consiste en una gruesa acumulación de linfocitos alrededor de una arteria (Ross y Pawlina 2015), formándose un centro germinal (Figura 3B).

Se distinguen dos zonas: una zona clara apical, que contiene mayor cantidad de células reticulares con citoplasma acidófilo, linfocitos pequeños, y células dendríticas consideradas como células presentadoras de antígeno (Gartner y Hiatt, 2015).

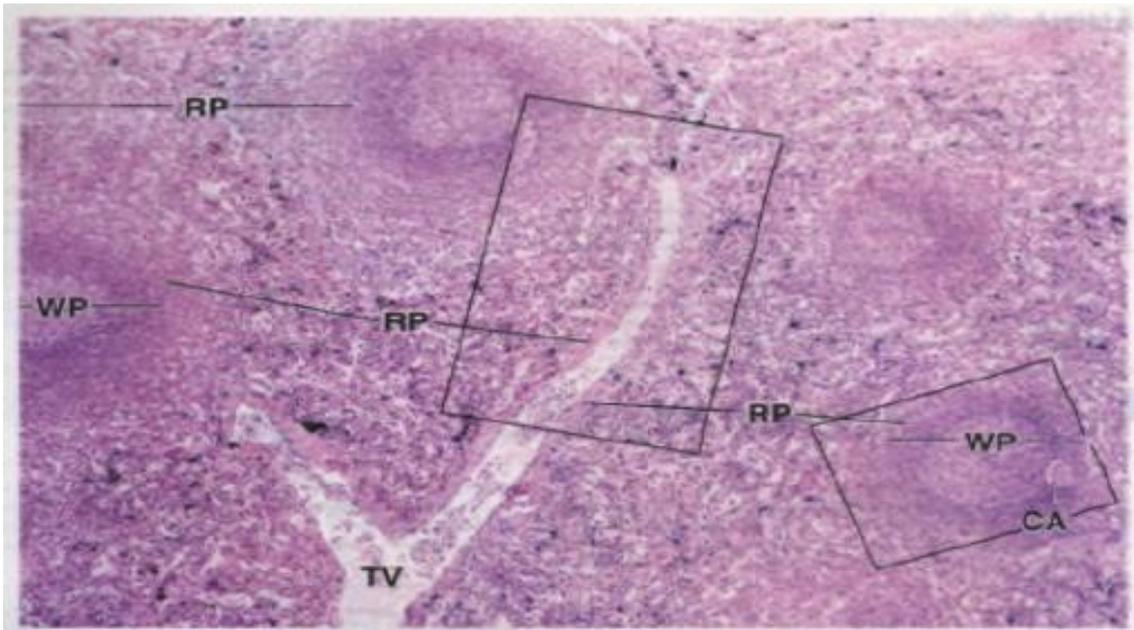
La pulpa blanca es estructuralmente similar a un ganglio linfático, contiene células T y células B; las células principales de los folículos linfoides son los linfocitos B, mientras que los linfocitos T ocupan el área que rodea a la arteria folicular. En las vainas linfoides periarteriales los linfocitos T son adyacentes a la túnica media de la arteria central y los linfocitos B forman la región periférica. Esta zona permite la generación de antígenos, respuestas inmunes específicas que protegen al cuerpo contra infecciones bacterianas, hongos y virus transmitidas por la sangre (Ross y Pawlina, 2015)



**Figura 3: Estructura de pulpa blanca y centro germinal del bazo.** A) Fotomicrografía de la pulpa blanca y la zona marginal del bazo. G: Centro Germinal; M: Zona Marginal, la arteria central está señalada por una flecha (Gartner y Hiatt, 2015) B) Representación esquemática de los diversos tipos de células integrantes de un centro germinal (Sobotta y Welsch, 2009).

#### b) Pulpa esplénica roja (PR)

La pulpa roja es de color rojo, tanto en el estado fresco como en los preparados histológicos, debido a que contiene una gran cantidad de eritrocitos, que llenan la luz de los sinusoides y que infiltran los cordones esplénicos que suponen alrededor del 75% del total de la pulpa esplénica (Milanéz-Almeida y col., 2015) (Figura 4). En esencia, la pulpa roja consiste en sinusoides esplénicos, separados por cordones esplénicos (cordones de Billroth), que ocupan los intersticios que quedan entre las sinusoides venosas. Los cordones esplénicos están esencialmente formados por una malla laxa de células reticulares y macrófagos, linfocitos, células dendríticas, plasmocitos y granulocitos (Sobotta y Welsch, 2009).



**Figura 4: Estructura de la pulpa roja.** CA: Arteria central, RP: Pulpa Roja, TV: Vena trabecular, WP: Pulpa Blanca (Ross y Pawlina, 2015).

#### c) Zona Marginal (ZM)

La zona marginal es un área de paso en la que las células migran a la pulpa esplénica roja o a la blanca (Blue y Weiss, 1981) y al estar interpuesta en el paso de los linfocitos circulantes, tiene especial importancia en el desarrollo de la respuesta inmune (Mitchell y Abbot, 1971). Contiene más linfocitos que la pulpa esplénica roja y estas células son de mayor tamaño que la pulpa esplénica blanca (Tablin y Weiss, 1983), tienen la cromatina menos condensada y son, presumiblemente linfocitos B no recirculantes, aunque también se pueden encontrar linfocitos T. Se considera que la zona marginal juega un papel muy importante en la eliminación de partículas de la circulación. Dado que el bazo filtra sangre, tiene funciones tanto en el sistema inmune como en el sistema hematopoyético. Las funciones del bazo en el sistema inmune comprenden (Ross y Pawlina, 2015).

- Presentación de antígenos por las APC (sobre todo células dendríticas y macrófagos) e iniciación de la respuesta inmunitaria.
- Activación y proliferación de linfocitos T y B.
- Producción de anticuerpos contra antígenos presentes en la sangre
- Eliminación de antígenos macromoleculares de la sangre.

El bazo también contiene una considerable población de células T asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), que detectan antígenos lipídicos y está involucrado en una amplia gama de respuestas inmunes mediante la secreción de citocinas e induce la activación río abajo de células inmunitarias adaptativas (Milanez-Almeida y col., 2015).

Las funciones hematopoyéticas del bazo comprenden (Ross y Pawlina 2015):

- Captación y destrucción de eritrocitos y trombocitos viejos, dañados y anormales.
- Recuperación del hierro de la hemoglobina de los eritrocitos.
- Formación de eritrocitos durante cierta etapa de la vida fetal.
- Almacenamiento de sangre, en especial de eritrocitos.

## 2.6 Linfocitos

Los linfocitos son las principales células que participan en la respuesta inmunitaria adaptativa, se dividen en tres poblaciones funcionales con base en diferencias funcionales y fenotípicas: células NK, linfocitos B (células B) y linfocitos T (células T) (Kindt y col., 2007). Los diferentes linajes de etapas de maduración de linfocitos pueden distinguirse por su expresión de moléculas de membrana reconocidas por anticuerpos monoclonales particulares (Josefowicz y col., 2012; Owen y col., 2014).

Todos los anticuerpos monoclonales que reaccionan con una molécula de membrana particular pertenecen a un grupo de diferenciación (CD, del inglés *cluster of differentiation*) (Cuadro 2). El reconocimiento de subpoblaciones reguladoras ha marcado una nueva etapa de desarrollo de investigación sobre la generación y control de la respuesta inmune (Geiger y col., 2012).

Los linfocitos T se denominan así debido a su sitio de maduración en el timo. Sólo reconocen fragmentos de antígenos procesados unidos a proteínas de membrana celular llamadas moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MCH, por sus siglas en inglés). Se dividen en dos tipos principales de células: T citotóxicas (T<sub>C</sub>) y T cooperadoras (T<sub>H</sub>), que pueden

distinguirse por la presencia de glucoproteínas de membrana CD8 y CD4 sobre su superficie, respectivamente (Owen y col., 2014).

**Cuadro 2. Marcadores CD usados para distinguir subpoblaciones de linfocitos funcionales** (modificado de Kindt y col., 2007)

Designación de CD	Función	Célula B	Célula T <sub>H</sub>	Célula T <sub>C</sub>	Célula NK
CD2	Molécula de adhesión; transducción de señal	-	+	+	+
CD3	Elemento de transducción de señal de receptor de célula T	-	+	+	-
CD4	Molécula de adhesión que se une a moléculas del MCH II.	-	+	-	-
CD8	Molécula de adhesión que se une a moléculas del MCH I.	-	-	+ (variable)	
CD16	Receptor de baja afinidad para la región Fc de IgG	-	-	-	+
CD19	Transducción de señal; correceptor de CD21.	+	-	-	-
CD28	Receptor para la molécula B7 co-estimuladora sobre CPA	-	+	+	-

Los linfocitos T CD8 se caracterizan por expresar una glicoproteína de membrana en las superficies del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MCH I), perteneciente a linfocitos TC, es decir T citotóxicos. CD8 ha sido objeto de muchas estrategias terapéuticas diseñadas para modular las respuestas de células T durante las reacciones alérgicas y rechazo de trasplante de órganos (Kindt y col., 2007). Los linfocitos CD8 median funciones cruciales de la respuesta inmune innata, principalmente en contra de virus. Destruyen células diana que no expresan o expresan deficientemente moléculas MCH I (Chavez-Galan y col., 2009).

La respuesta funcional de los linfocitos T CD8 es un componente esencial de la respuesta inmune adaptativa para varios tipos de cáncer, como el de mama y colorrectal. Juegan un papel esencial en la defensa del hospedero, usando al menos dos diferentes mecanismos para mediar la muerte directa de células diana. Actúan mediante la liberación de perforinas y granzima B, la cual es una

proteasa sérica que induce la apoptosis y expresa el ligando Fas, para unirse a Fas en células diana, que resulta en apoptosis (Morishima y col., 2010; Hadrup y col., 2013). Básicamente las células CD8 identifican y matan a las células infectadas por virus o células de cáncer (Kindt y col., 2007).

El cúmulo de diferenciación 4 (CD4) corresponde a una glicoproteína de membrana de tipo I integral expresada principalmente en las superficies del MHC II restringido a linfocitos T, timocitos y linaje de los monocitos (Kindt y col., 2007). Los linfocitos T CD4+, desempeñan un papel fundamental en el sistema inmune debido a que colaboran con linfocitos B en el desarrollo de respuestas humorales mediadas por anticuerpos, estimulan y mantienen una respuesta celular de tipo T citotóxica mediada por linfocitos T CD8+, modulan las funciones de macrófagos, regulan la respuesta inmune contra patógenos y controlan la respuesta a antígenos propios, previniendo el desarrollo de autoinmunidad. Los linfocitos TCD4+ regulan y amplifican diferentes componentes del sistema inmune mediante la comunicación con otras células. Determinan la síntesis de anticuerpos por los linfocitos B. Activan linfocitos T citotóxicos y macrófagos. Los linfocitos T CD4+ suprimen activamente las respuestas inmunes patológicas y fisiológicas y, por lo tanto, contribuyen al mantenimiento de la autotolerancia inmunológica y a la homeostasis inmune. Las células T CD4 colaboradoras vírgenes ( $T_{H0}$ ), se diferencian en distintos linajes, incluyendo  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ ,  $T_{H17}$ , T reguladoras (Treg), entre otros, caracterizadas por el patrón de citocinas secretadas (Mossman y col., 1986)

Las células T reguladoras (Tregs) son un tipo de célula T CD4, que regulan o suprimen a otras células del sistema inmunitario. Las Tregs controlan las respuestas inmunitarias contra partículas extrañas o propias (antígenos) y ayudan a prevenir enfermedades autoinmunes (Ohkura y Sakaguchi, 2010). Se caracterizan por la expresión de CD4 y CD25 sobre su superficie, así como la expresión del factor de transcripción interno FoxP3. Desempeñan un papel central en la regulación, la tolerancia y la inmunidad mediante la prevención de la activación y expansión de las células T autorreactivas que conducen a la autoinmunidad, tienen un papel en la limitación de la respuesta inmune en enfermedades alérgicas, infecciones, trasplantes, y el cáncer (Maloy y Powrie,

2001; Sakaguchi, 2005; Wei y col., 2008). Es decir, el fenotipo de Tregs es Foxp3+CD25+CD4+ (Nishikawa y Sakaguchi., 2014).

La regulación de las células Tregs es crítica para el mantenimiento de respuestas inmunes tales como la inflamación y las infecciones. Los mecanismos mediante los cuales los linfocitos T reguladores (Tregs) ejercen función supresora de la respuesta inmune incluyen, tanto mecanismos dependientes de la secreción de citocinas inhibitorias, como mecanismos independientes de citocinas como citotoxicidad, disrupción metabólica, modulación y maduración de células presentadoras de antígeno. En la actualidad, el marcador más confiable para definir y aislar linfocitos Tregs es el factor de transcripción Foxp3 (Hori y col., 2003; Khattri y col., 2003; Fontenot, y col., 2003; Wei y col., 2008).

CD25 es una proteína de membrana de 55 kDa, es la cadena alfa del receptor de interleucina 2 (IL-2), está expresada en las superficies de las células T activadas, células B y monocitos. Aunque CD25 ha sido utilizada como un marcador para identificar células T reguladoras CD4+FOXP3 en ratones, se ha encontrado que una gran proporción de células T vírgenes expresan CD25 constitutivamente en seres humanos (Janeway y col., 2001)

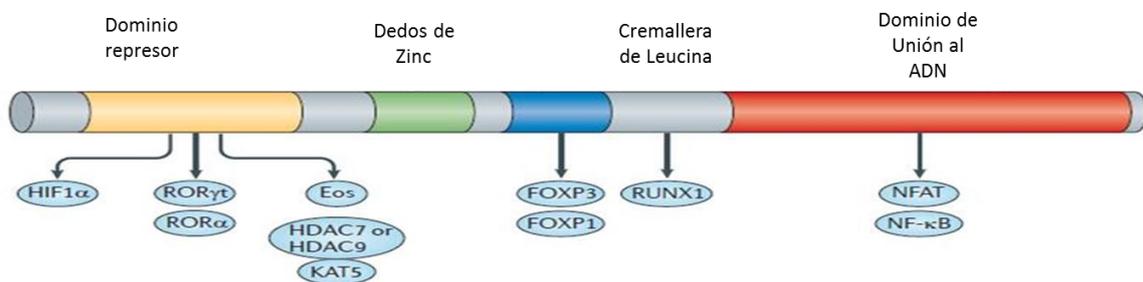
## **2.7 Factor de transcripción FoxP3**

El factor de transcripción FoxP3 (*Forkhead Box P3*) es el regulador maestro de las células Treg en cuanto a su función y diferenciación celular sin embargo, el mecanismo por el cual logra tales actividades no está aún dilucidado (Yomogida y col., 2013). FoxP3 es un factor de transcripción nuclear de 431 aminoácidos y su peso molecular es de 47.25 kDa. Se encuentra localizado en el núcleo de células T, contiene 4 dominios potenciales incluyendo el represor ZF, LZ y forkhead (FKH).

El dominio represor se encuentra localizado en la región N-terminal de FoxP3 y es requerido para reprimir la actividad transcripcional mediada por NFAT (Betelli y col., 2005). El gen FoxP3 es expresado predominante en tejidos linfoides como timo, bazo y ganglios linfáticos, en células CD4+CD25+ y en

menor proporción en células CD4+CD8+ (Sakaguchi, 2005). La función de las células Tregs es controlada por FoxP3 (Fontenot y col., 2003; Khattri y col., 2003 y Hori y col., 2012) y su expresión es de vital importancia para la expresión del fenotipo supresor de las células Tregs (Gavin y col., 2007).

El dominio FKH es fundamental tanto para la unión de ADN y la localización nuclear (Ziegler, 2006). Al estar el dominio FKH de FoxP3 localizado muy cerca del extremo carboxiterminal de la proteína, sugiere que carece de dominio transactivador y lleva a postular que podría actuar como represor transcripcional (Coffer y Burgering., 2004) (Figura 5)



**Figura 5. Esquema de Foxp3** (Modificado de Ramsdell y Ziegler, 2014).

La función de FoxP3 está asociada a diversos factores de transcripción incluyendo el factor nuclear de células T activadas (NFAT). La interacción de FoxP3 con NFAT conduce a la inhibición de la expresión de la interleucina dos (IL-2) y otras citocinas proinflamatorias, reduce las funciones de los linfocitos T cooperadores (TH) (Szyllberg y col., 2014).

Los efectos de inhibición transcripcional fueron reportados por Betteli y col. (2005) quienes describieron que FoxP3 suprime la producción de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  por mecanismos que incluyen asociación a los factores de transcripción de la familia Rel, NF- $\kappa$ B y NFAT y bloqueo de su unión a las citocinas antes mencionadas.

Por otro lado, se han identificado sitios potenciales de unión de Foxp3 en los promotores de los genes que codifican para IL-4, TNF- $\alpha$  y GM-CSF (Gonzalez Parias y col., 2010). Wei y col. (2008), en un modelo murino utilizando administración intraperitoneal de lectina de Concanavalina A, observaron

mayor cantidad de FoxP3 en hígado pero no en bazo. En el 2013, Nakano y col., evaluaron la actividad que tiene la lectina de la Concanavalina A sobre el hígado, encontrando inducción de CD4+CD25+ y FOXP3, que a su vez producen IL-10, posiblemente como mecanismo de protección después de un daño hepático por la inyección de ConA.

A través de las proteínas Janus cinasas, el sistema inmune juega un papel en el desarrollo y progresión del cáncer, ejerciendo efectos promotores y supresores tumorales, esta dualidad es la base del proceso conocido como inmunoedición (Schreiber y col., 2011). FoxP3 es necesario y suficiente para la inducción de funciones inmunosupresoras en linfocitos T reguladores. Es también expresado en algunas células linfoides, en las cuales puede reprimir varios oncogenes, que son restaurados de acuerdo a mutaciones o deleciones de FoxP3 (Martin y col., 2010).

Está establecido que la expresión de FoxP3 en células T reguladoras (Sakaguchi y col., 1995; Martin y col., 2010) es más abundante en sangre periférica de pacientes con cáncer en comparación que en pacientes sanos. Muchos tumores humanos están infiltrados por células Treg, presentando pequeñas células con morfología linfocítica y con alta expresión de FoxP3 en el núcleo. La densidad de células FoxP3+ es significativamente más alta en tejido malignizado que en uno normal (Bates y col., 2006; Hiraoka y col., 2006; Mizukami y col., 2008). Actualmente se estudia la relación de FoxP3 con CD4, CD8 CD25 y Tregs en modelos murinos (Baihao y col., 2016)

### **III. JUSTIFICACIÓN**

La administración de la FCL de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) en ratas ha mostrado baja toxicidad bajo un esquema de tratamiento farmacológico por 6 semanas. Entre los hallazgos, se han observado efectos sobre sistema inmune secundario y sobre bazo. Debido a lo anterior, la presente investigación se enfocó en determinar el posible efecto inmunomodulador de la FCL utilizando un esquema de tratamiento tipo farmacológico.

### **IV. HIPÓTESIS**

La administración de la fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) ejerce efecto inmunomodulador a través de la activación de poblaciones celulares y la expresión de marcadores inmunológicos en bazo de rata.

### **V. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el efecto inmunomodulador de la administración de la FCL sobre bazo de ratas.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Determinar si la administración con FCL presenta efecto sobre la población de células sanguíneas de ratas Sprague Dawley tratadas con FCL
- 2) Determinar si la administración con FCL genera un efecto sobre la población de linfocitos T
- 3) Determinar la expresión y cuantificar la expresión de Foxp3 en bazo de rata por el efecto del tratamiento de la FCL.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Diseño experimental

Tipo de estudio: Experimental, longitudinal.

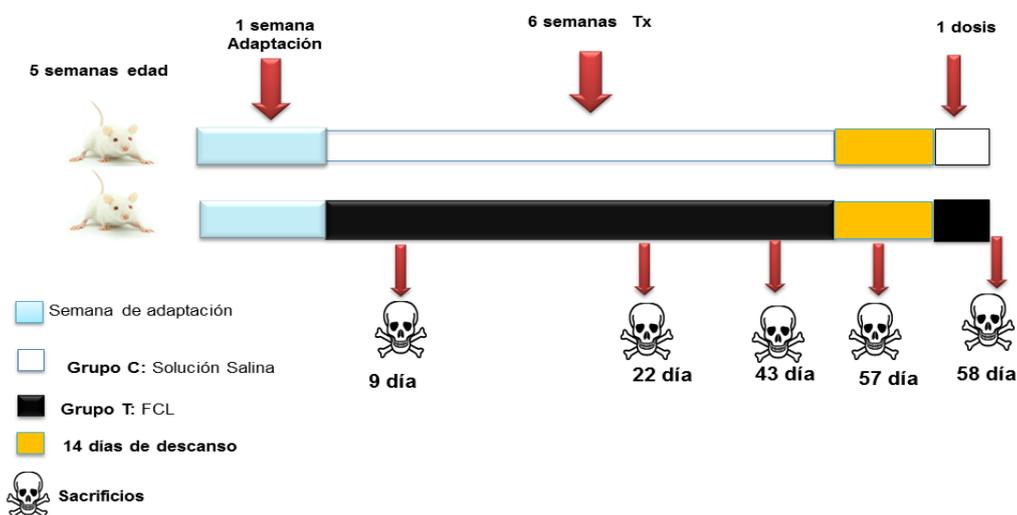
### 6.2 Obtención de la FCL

La fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) (FCL) fue purificada en el Laboratorio de Mecanismos de Defensa de Plantas del CINVESTAV Unidad Irapuato, con la participación de la M en C Julia María Alatorre Cruz y del MRB Ricardo Cervantes Jiménez, estudiantes de Doctorado en Ciencias Biológicas de la UAQ. Brevemente, la FCL se obtuvo de semillas de frijol Tépari molidas en un molino Willey, se pesaron 100 g de harina obtenida y se obtuvo el extracto crudo de proteína en 500 mL de agua desionizada agitando durante 12 h a 4°C, después se centrifugó a 14000 rpm durante 30 min. Se llevó a cabo una precipitación con 40% de saturación de sulfato de amonio con agitación magnética lenta. Esta suspensión se dejó equilibrar por 30 min a 4°C después de centrifugarse a 18000 rpm durante 1 h, se descartó el precipitado obtenido. El sobrenadante fue llevado a 65% de saturación con sulfato de amonio, en este caso después de centrifugar nuevamente a 18000 rpm durante 1 h, se recuperó el precipitado y se descargó el sobrenadante. La fracción fue disuelta en un volumen mínimo de agua desionizada y dializada en membrana de 3500 Da, hasta la eliminación de sales presentes, liofilizada y almacenada a -20° C hasta uso. La fracción concentrada de lectinas (FCL) se obtuvo mediante cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-75, dializada hasta la eliminación total de sales presentes liofilizada y almacenada hasta su uso (García-Gasca y col., 2012). Para 100 g de harina de frijol Tépari se obtuvieron 0.38 g de FCL.

### 6.3 Estudio *in vivo*

Se utilizaron 118 ratas macho Sprague Dawley, de 5 semanas de edad las cuales fueron aclimatadas por una semana en condiciones controladas a 26° C con un ciclo circadiano de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, con alimentación y agua *ad libitum* en el bioterio de la FCN-UAQ.

Posteriormente se formaron 2 grupos aleatorizados y ajustados al peso corporal. El grupo control fue conformado por 57 animales, al cual solo se le administró vía cánula intragástrica el vehículo durante todo el tratamiento. El grupo tratado fue conformado por 61 animales, el cual recibió el tratamiento de lectina (FCL) vía cánula intragástrica en una dosis de 50 mg/kg de peso cada tercer día durante 6 semanas (López-Sánchez y col., 2010), con un descanso de 14 días y, finalmente, una última administración dependiendo del tratamiento asignado (Figura 6). En esta fase se contó con el apoyo de la M en C Julia María Alatorre Cruz, la MVZ Verónica Andrade y el Biólogo Josué López Martínez.



**Figura 6.** Diseño experimental y esquema de administraciones

Se registraron los pesos corporales al inicio del experimento y con una periodicidad semanal hasta el último día del experimento. Se determinó el consumo de alimento 3 veces a la semana. Los datos obtenidos fueron registrados sistemáticamente de manera individual. Se realizaron sacrificios en los tiempos indicados mediante decapitación, con ayuda de una guillotina de 4 cuchillas para obtener la mayor cantidad de sangre y no causar toxicidad sanguínea o hepática por uso de anestésicos o sedantes. Se colectaron muestras de aproximadamente 50  $\mu$ L de sangre periférica en tubos Vacutainer con o sin EDTA para la separación de suero o plasma, según el caso, y posterior separación de alícuotas en tubos 200  $\mu$ L para realizar la biometría

hemática (BH). Durante cada sacrificio se disectaron los órganos inmunes timo y bazo. Cada órgano fue pesado en una balanza electrónica inmediatamente después de su disección. Las placas de Peyer fueron contabilizadas y registradas.

## 6. 4 Evaluación de células sanguíneas

### 6.4.1 Biometría Hemática

La evaluación de células sanguíneas se realizó mediante biometría hemática, a partir de sangre colectada en tubos con EDTA, con ayuda de un hematocitómetro de marca CellDyn® serie1600. Durante el sacrificio se recolectó sangre en un tubo de ensayo con EDTA como anticoagulante. Los resultados fueron registrados de manera individual y los parámetros obtenidos se muestran en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Parámetros en Biometría hemática (BH)**

<b>Parámetros en Biometría Hemática (BH)</b>			
<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
<b>WBC</b>	Glóbulos Blancos	<b>MCHC</b>	Concentración Media de Hemoglobina
<b>RBC</b>	Glóbulos Rojos	<b>PLT</b>	Plaquetas
<b>HGB</b>	Hemoglobina	<b>LYM%</b>	Porcentaje de Linfocitos
<b>HCT:</b>	Hematocrito	<b>LYM#</b>	Número de Linfocitos
<b>MCV</b>	Volumen Corpuscular Medio	<b>RDW-SD</b>	Ancho de Distribución Plaquetaria
<b>MCH</b>	Hemoglobina Corpuscular Media	<b>MPV</b>	Volumen Plaquetario Medio

### 6.4.2 Recuento diferencial

Se tomó una muestra de sangre recolectada en tubos heparinizados y se realizó un frotis sanguíneo, colocando una gota de muestra sanguínea en un portaobjetos, de tal manera que las células se distribuyeron formando una sola capa homogénea, posterior a lo cual se sumergió el frotis sanguíneo por 1 min

en alcohol etílico al 90%, para proceder a teñir con un Hemocolorante rápido marca Hycell® y contar al microscopio

#### 6.4.3 Citometría de Flujo

La citometría de flujo se realizó con la colaboración de la Dra. Gabriela López Hernández del Laboratorio de Inmunodeficiencias en el Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México.

Se recolectó sangre periférica de la rata mediante decapitación en tubos heparinizados para fijar y teñir las muestras con anticuerpos marca Biolegend® e identificar cúmulos de diferenciación CD4+, CD8+, CD25+. Cada anticuerpo estaba marcado: El anticuerpo CD4+ se encontraba marcado con (isocianato de fluoresceína) FITC, marca Biolegend, número de catálogo 201505), CD8+ marcado con clorofila de piridina (PerCP, marca Biolegend, número de catálogo 201712), CD25+ marcado con ficoeritrina (PE, marca Biolegend, número de catálogo 202105).

Una vez recolectada la muestra, se mezcló con 1000 µL de PBS 1X y se transfirió a un tubo tipo falcon con Lymphoprep®, en una proporción 1:2, se centrifugó durante 20 min a 524 g con aceleración mínima. Después de esto, se extrajeron las células que se encontraban en la parte superior, y se transfirieron a un tubo tipo falcon, donde se agregaron 10 mL de PBS 1X, se mezcló y se procedió a centrifugar por 5 min a 524 g, se tomaron 30 µL que fueron transferidos a un tubo para su lectura. Cada muestra se incubó con una mezcla de anticuerpos durante 15 minutos en frío y oscuridad. Después de esto se adicionó 1 mL de PBS a cada muestra, se centrifugó durante 15 min a 524 g y se desechó el sobrenadante. Se procedió a agregar 200µL de solución fijadora. La lectura se realizó por citometría de flujo, en un citómetro FACS Arias®, con la colaboración de la

#### 6.5 Evaluación de morfología de Bazo

Los análisis histológicos se realizaron gracias a la colaboración de la M en C María de Jesús Guerrero Carrillo y la MSPAS Paola Aranda, del Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ.

Brevemente, los órganos obtenidos del sacrificio se fijaron en formaldehído al 10% en PBS para su posterior análisis, después se realizaron los cortes semifinos de bazo y timo. Posteriormente los tejidos se deshidrataron y fueron incluidos en parafina con ayuda del equipo Histoquinete Leica TP1020. Se realizaron los cortes finos a un grosor de 10  $\mu\text{m}$  con ayuda un micrótomo RM21 de la marca Leica, y fueron montados en porta objetos adherido con una fina capa de gelatina en agua caliente. Después de haber sido montados, se procedió a la desparafinación, rehidratación y tinción con Hematoxilina y Eosina. Los tejidos se deshidrataron nuevamente y se sellaron con Entellan y cubreobjetos. Finalmente se realizó el análisis al microscopio marca Leica del laboratorio de Botánica de la UAQ.

### **6.6 Evaluación del factor de transcripción FoxP3**

Con apoyo de la Dra. Marisela Ahumada Solórzano y del MNH Ulisses Moreno Celis se llevó a cabo el estudio de inmunohistoquímica. Los tejidos se fijaron con formalina (PFA 4%), por 48 h. Posteriormente, se deshidrataron en soluciones de etanol de concentración creciente, desde 60% hasta alcohol absoluto, una mezcla de xilol/etanol 1:1, xilol concentrado y finalmente baños de parafina. Los tejidos se incluyeron en bloques de parafina y se obtuvieron de dos a tres cortes seriados de 10  $\mu\text{m}$ , que se montaron sobre laminillas tratadas, utilizando un baño de agua tibia con gelatina (0.03%). Las preparaciones histológicas se desparafinaron con un solvente aclarante Citrisolv®, posteriormente se pasaron por un gradiente de solventes: xilol 100%, xilol 100%, etanol 100%, etanol 100%, etanol 96%, etanol 96% etanol 70%, etanol 50%, agua mili Q, 5 min cada uno.

Al finalizar la rehidratación, las preparaciones histológicas se sometieron a un proceso de desenmascaramiento de epítopes, utilizando una solución de citratos 3M durante 3 pulsaciones de 15 s en el horno de microondas. Después, las preparaciones se lavaron por 5 min en PBS 1X y luego se incubaron durante 45 min con una solución salina amortiguadora con tampón fosfato salino 1X (PBS 1X), 50% metanol y 3% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con la finalidad de eliminar la peroxidasa endógena.

Al término de los 45 min, se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 min cada uno, y se incubó durante 1 hora con leche descremada al 3% en PBS1X como agente bloqueador. Pasado el tiempo de incubación se hicieron 3 lavados con TPBS, y se eliminó el exceso de líquido para transferir las preparaciones a una cámara húmeda. A cada preparación histológica se le agregaron 250  $\mu$ L de anticuerpo primario policlonal contra FoxP3 de rata (anticuerpo contra FoxP3 de rata generado en conejo, marca Novusbio, número de catálogo NBP1-74061, 1:150 en TPBS con 1% de leche descremada) y se incubó durante 24 horas a 4°C.

Se conservaron dos preparaciones histológicas como control negativo y doble negativo. El control negativo no tenía el primer anticuerpo, para verificar la presencia de peroxidasa endógena o tinción excesiva inespecífica de fondo únicamente tenía la presencia del segundo anticuerpo. El control doble negativo carecía de ambos anticuerpos.

Al día siguiente, se lavaron con TPBS (4 x 10 min). Posteriormente se incubó durante 2 horas con el anticuerpo secundario (Anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano picante, marca Novusbio, número de Catálogo NBP1-75297 1:200 en TPBS-Blotting 1%). Las preparaciones se lavaron con TPBS (4 x 10 min), y PBS 1X (2 x 5 minutos). Se procedió a revelar con una solución de diaminobencidina (0.1 g de DAB en 50 mL de PBS 1X, 1000  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) recién preparada, dejando que la reacción procediera, hasta que el precipitado café fuera evidente a simple vista. La reacción se detuvo lavando con agua mili-Q. Las preparaciones se montaron con resina (Entellan 107960, Merck Millipore) para ser preservadas. La solución de DAB se desechó en un contenedor al cual se le adicionó hipoclorito de sodio.

### **6.1 Análisis Estadístico.**

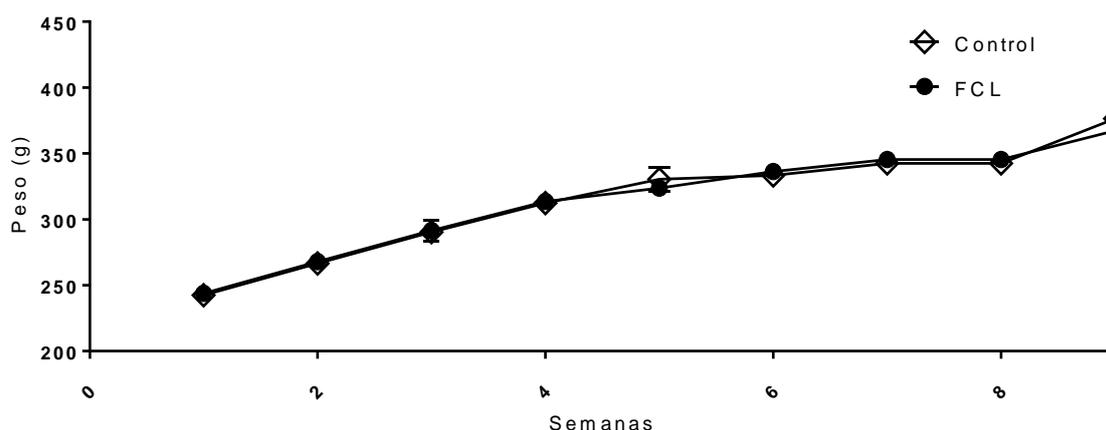
Los resultados se analizaron con ayuda del programa estadístico Statical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 18, IBM company. Se realizaron pruebas t de student para muestras independientes con un nivel de significancia de 0.05 para la comparación del grupo control y de tratamiento.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

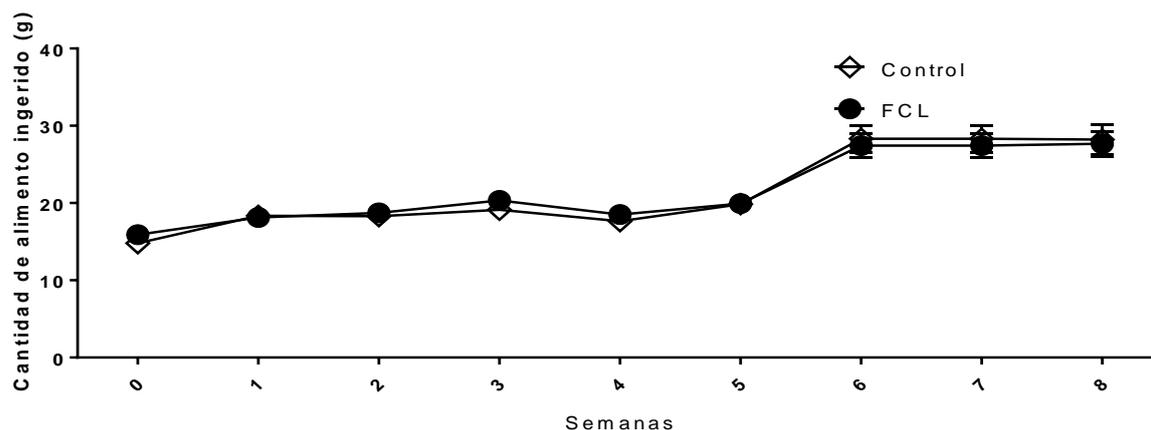
### 7.1 Efecto de la FCL sobre el peso corporal e ingesta de alimentos

Durante el periodo de administración se determinó el peso corporal semanal de las ratas (Figura 7). En este estudio no se observó pérdida de ganancia de peso corporal ( $t$  student  $p \leq 0.05$ ), tampoco se observó diferencia en el consumo de alimento con respecto al control (Figura 8), a diferencia de lo reportado por Ferriz-Martinez y col. en el 2015. En cuanto a efectos adversos observados en las ratas administradas con FCL respecto al control, se detectó piloerección y pelo amarillento (hirsuto), congruentes con lo observado por Moreno-Celis en el 2014 y Ferriz-Martínez en el 2015.

La principal diferencia entre el presente estudio y los estudios previos realizados por el grupo de trabajo fue la edad de los animales (Reyes-Rocha 2011; Ferriz-Martínez y col., 2015). Mientras que previamente se habían utilizado animales de 15 semanas de edad (ratas al final de su crecimiento), en el presente estudio se utilizaron animales de 6 semanas (ratas en etapa de crecimiento acelerado). Es probable que este aspecto influya sobre los efectos observados y, por lo tanto, la FCL afecta de forma diferencial a ratas de diferentes edades (López-Sánchez y col., 2010; Moro-García y col., 2010).



**Figura 7. Promedio de peso corporal de ratas Sprague Dawley de 5 semanas tratadas con la FCL.**  $n= 118$ . Se calculó la desviación estándar (DE) representada por barras de error. Se determinó la diferencia significativa mediante  $t$  de student ( $p \leq 0.05$ ).



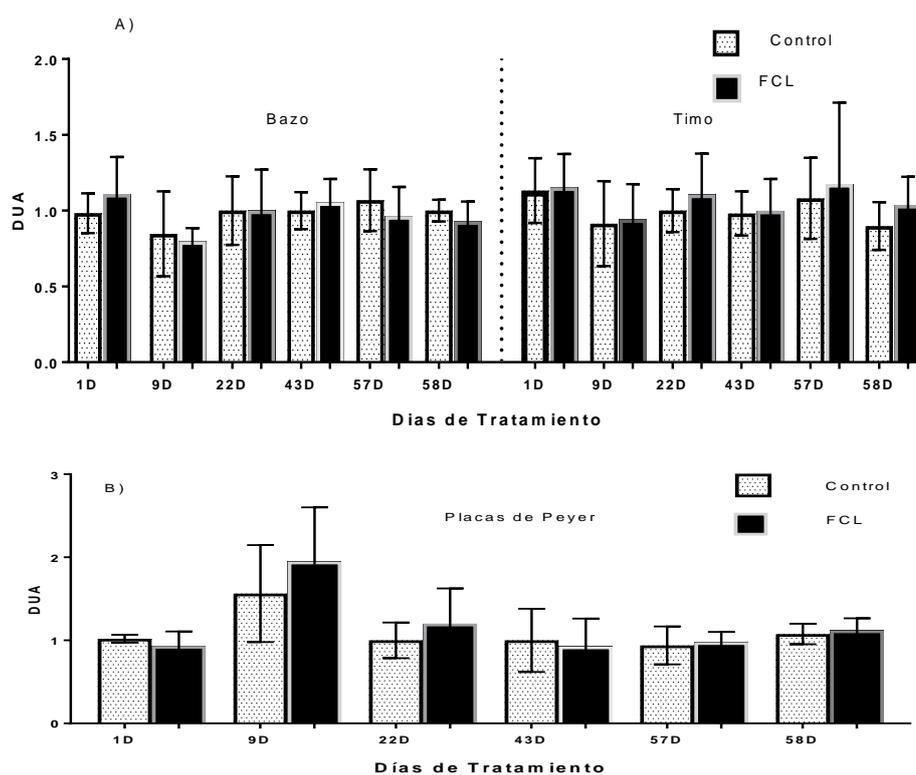
**Figura 8. Ingesta de alimento por ratas Sprague Dawley de 5 semanas tratadas con la FCL.** Se calculó la desviación estándar (DE) representada por barras de error. Se determinó la diferencia significativa mediante t de student ( $p \leq 0.05$ ).

## 7.2 Efecto de la FCL sobre órganos inmunes

Para evaluar si existe un potencial efecto tóxico de la administración de la FCL sobre algunos tejidos linfoides, se registraron los pesos de bazo, timo y número de placas de Peyer en el intestino, bajo el esquema de administración de 1, 9, 22, 43, 57 y 58 días (Figura 9). Los resultados no mostraron cambios estadísticamente significativos debido al efecto del tratamiento con la FCL sobre el peso de órganos inmunes respecto al control (t student,  $p > 0.05$ ), estos hallazgos sugieren que la administración con FCL no causa megalias en los órganos linfoides estudiados. Dado que el timo es un órgano linfoide primario relacionado con la producción de células blancas, se sugiere que la FCL no afecta de forma general la producción de células blancas, ni tampoco afecta la función y regulación leucocitaria, este posible efecto puede estar relacionado con la edad de las ratas, como lo sugieren Desai y col. en el 2010.

En relación al número de placas de Peyer, se han realizado pocos estudios que evalúen la activación del sistema inmune, debido a la administración oral de alguna sustancia derivada de lectinas o plantas. En 1998 por Hong y col, evaluaron los efectos farmacológicos del extracto de Juzen-Taiho-To (JTT), vía oral en modelos murinos y la relación que guardan con la activación de placas de Peyer, la proliferación celular en médula ósea, la activación de la interleucina 6 e interleucina 1 (IL-6 e IL-1) y la actividad del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF). En dicho estudio se

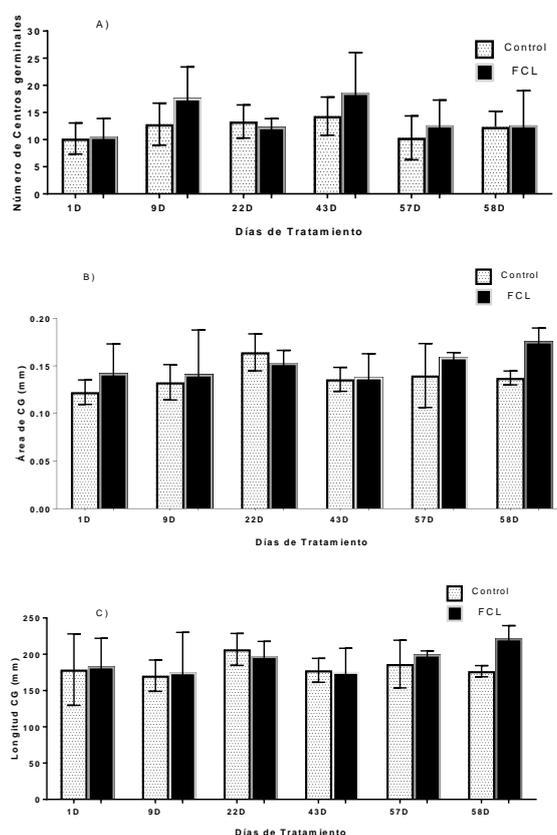
encontró que la concentración de interleucina-6 (IL-6) en placas de Peyer, fue mayor respecto al control. Estudios anteriores en nuestro grupo de trabajo realizados por Pita-López (tesis de maestría 2015, datos no publicados) bajo un esquema de administración subcrónica utilizando una dosis de 50 mg/kg de peso de FCL en ratas de 5 semanas de edad sugieren atrofia intestinal, sin afectación en el número y área de placas de Peyer. En contraste con esto, en éste estudio se mostró que hay una tendencia por parte de las placas de Peyer a aumentar en número en el día 9 de tratamiento, sin que se presenten cambios estadísticamente significativos en el número de éstas durante el esquema de administración sin embargo, no se sabe si este aumento en el número está relacionado con la reactividad y activación de linfocitos B; por tanto, es imperativa la realización de estudios que evalúen los efectos de la administración de lectinas vegetales y su relación con interleucinas



**Figura 9. Pesos de órganos inmunológicos en ratas tratadas con la FCL.** A) Peso de órganos inmunes (bazo, timo), B) Número de placas de Peyer, bajo el tratamiento de la Fracción concentrada de Lectinas (FCL). Se calculó la desviación estándar (DE) representada por barras de error. DUA: Unidades arbitrarias ajustadas con respecto al control. (\*) Diferencia estadísticamente significativa,  $p \leq 0,05$  t de student. Día 1 n=9, día 9 n=14, día 22 n=9, día 43 n=16, día 57 n=6 y día 58 n= 4

El estudio histopatológico se realizó con ayuda del software IMAGEJ, con el objetivo 4x y una escala de medición de 0.1 mm, para el recuento de centros germinales (CG), se realizó medición de cada uno de ellos por área y longitud (Figura 10) de los animales tratados con la FCL.

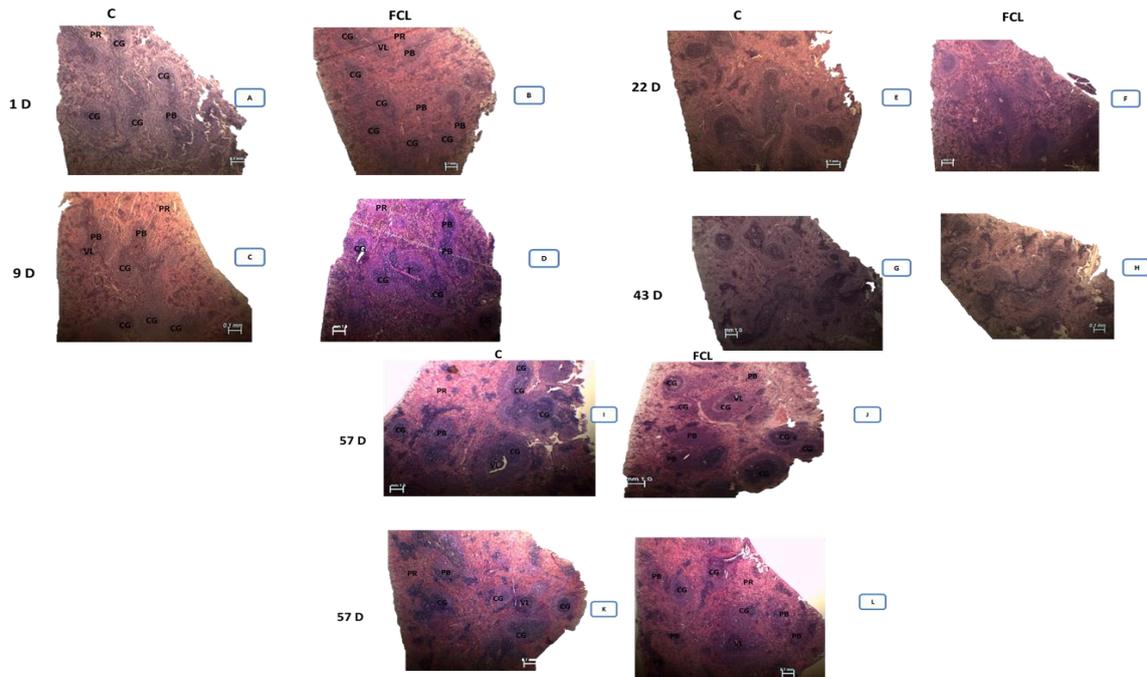
Se analizó de forma histológica el bazo, los resultados sugieren que la administración de la FCL de frijol Tépari sobre éste órgano linfoide secundario no provoca cambios morfológicos, lo que contrasta con lo reportado por Goldstein y col. en 1978 sobre los efectos adversos de las lectinas, lo cual sugiere que la FCL no provoca procesos inflamatorios que modifiquen la citoarquitectura y por tanto función de dicho órgano.



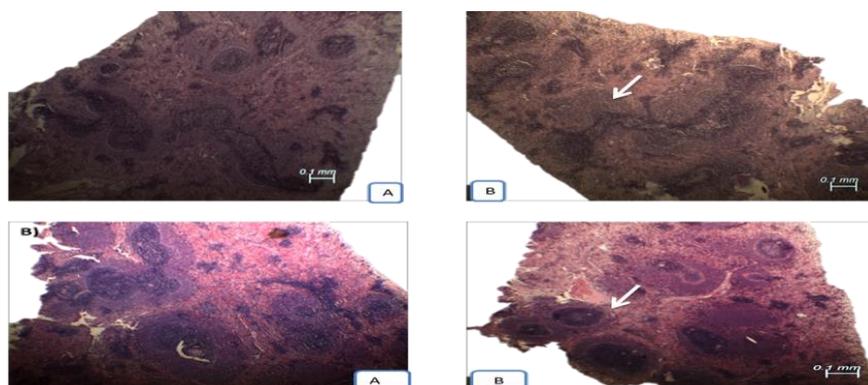
**Figura 10. Número de Centros germinales, área y longitud en ratas tratadas con la FCL.** A) Número de centros Germinales, B) Área, C) Longitud del bazo bajo el tratamiento de la Fracción concentrada de Lectinas (FCL). CG: Centro Germinal. Se calculó la desviación estándar (DE) representadas por barras de error. (\*) Diferencia estadísticamente significativa,  $p \leq 0,05$  t de student. Día 1 n=9, día 9 n=14, día 22 n=9, día 43 n=16, día 57 n=6 y día 58 n= 4

Con la ayuda del software IMAGEJ se pudo realizar un análisis más detallado sobre estructuras propias del bazo. Bajo este esquema de tratamiento, contrario a los resultados de Reyes- Rocha en el 2011, las ratas de 6 semanas de edad no mostraron cambios estadísticamente significativos respecto al número de centros germinales. Reyes-Rocha en el 2011 reportó un incremento en el número de centros germinales a las 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con la FCL en animales de 15 semanas de edad en dosis de 50 mg/kg de peso, encontrándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la semana 4 del periodo de tratamiento entre el grupo tratado y el grupo control. Sin embargo los resultados en este estudio no muestran un aumento en el número de centros germinales, ni cambios estadísticamente significativos ( $p \leq 0.05$ ) en cuanto al área y longitud de los mismos durante el tratamiento con FCL respecto al control. De acuerdo a estudios realizados, los centros germinales no presentan respuestas hasta después de una semana y media o dos de inmunización en ratas (MacLennan 1994), el objetivo de este estudio no fue inmunizar a las ratas contra ningún patógeno o alguna sustancia, sin embargo el esquema de administración fue suficiente para generar una respuesta inmune y probar una respuesta de memoria después del descanso de 14 días. Si bien es cierto que en este estudio no se midió la actividad de los centros germinales, lo cual debe tomarse en cuenta en estudios a futuro. Los resultados aquí mostrados sugieren que no hay presencia de una respuesta inmune humoral con activación de proliferación de linfocitos B en bazo de ratas de 5 semanas de edad, aunque a partir del día 22 se observó un ligero incremento por parte de la pulpa blanca, lo cual sugiere un aumento en la generación de antígenos y la respuesta inmune (Pack y col., 2008) y éste fue más evidente en el día 43 y 57 (Figura 11 y 12), así como un incremento en la población de linfocitos T y actividad inmune. Cabe mencionar que dado que las lectinas presentan unión a carbohidratos, se han utilizado en estudios relacionados con el sistema inmune, como el realizado por Düllman y col. en el 2000, quienes utilizaron 5 ratas macho y 5 ratas hembra de cepa Wistar para probar 16 tipos diferentes de lectinas y su afinidad hacia la pulpa blanca.

La lectina *Chelidonium majus* (CMA) tuvo mayor afinidad hacia la pulpa blanca en comparación con la pulpa roja, sin modificar la cantidad de pulpa blanca total. Si bien en este estudio no se determinó la afinidad de la FCL sobre pulpa blanca o roja, el hecho que la pulpa blanca se aumente a partir del día 22, sugiere que hay una activación al sistema inmune.



**Figura 11. Histología de bazo en ratas tratadas con la FCL.** Corte histológico de bazo con tinción de H y E durante los diferentes días de administración: 1D, 9D, 22D, 43D, 57D Y 58D, del grupo control (A, C, E, G, I, K) y del grupo tratamiento (B, D, F, H, J, L). Aumento 4x. Día 1 n=9, día 9 n=14, día 22 n=9, día 43 n=16, día 57 n=6 y día 58 n= 4. CG: Centros Germinales, PR: Pulpa roja, PB: Pulpa blanca, T: Trabécula VL: Vaina Linfoide



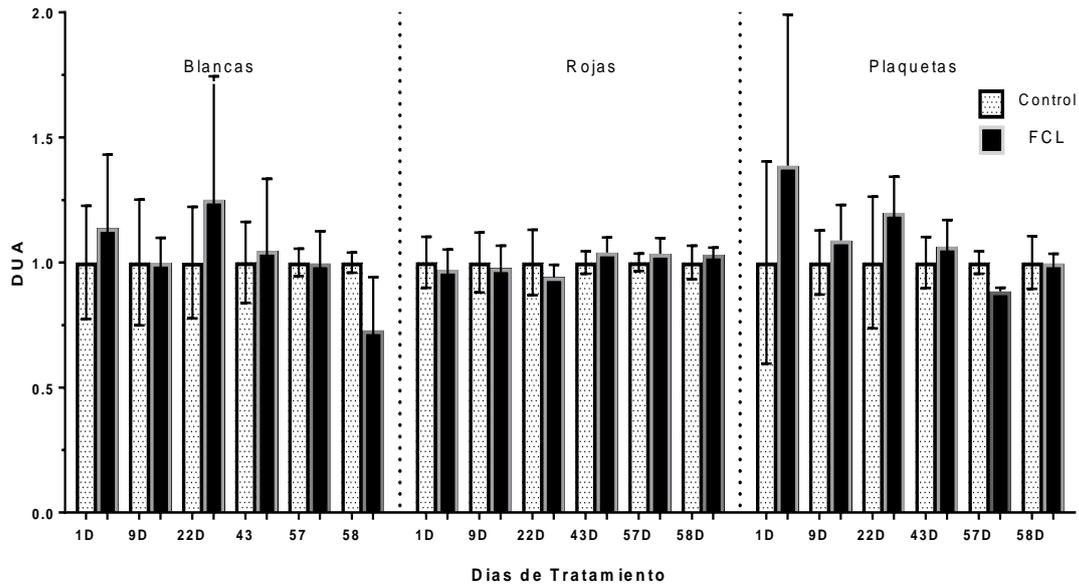
**Figura 12. Histología de bazo día 43 y 57 de administración en ratas tratadas con la FCL.** Corte histológico de bazo con tinción de H y E, del grupo control (A) y del grupo tratamiento (B). Aumento 4x y 10x. A) Día 43 de tratamiento, B) Día 57 de tratamiento. La flecha indica el aumento de la pulpa blanca. Día 1 n=9, día 9 n=14, día 22 n=9, día 43 n=16, día 57 n=6 y día 58 n= 4

### **7.3 Evaluación de poblaciones sanguíneas: Biometría Hemática y Recuento Diferencial**

Debido a que se ha reportado que algunas lectinas tienen capacidad de interactuar con leucocitos, células rojas y plaquetas (Boldt y col., 1975), se dio seguimiento mediante biometría hemática a cada una de estas poblaciones celulares durante el tratamiento con FCL (Figura 13). Ninguna población celular periférica mostró diferencias estadísticamente significativas (t de student,  $p \leq 0.05$ ), lo cual puede estar relacionado con la respuesta inmunitaria, dado que esta cambia respecto a la edad (Klein y col., 2016), lo cual sugiere que independientemente del tratamiento con FCL, las ratas continúan con el proceso natural de respuesta inmunitaria respecto a la edad, descartando efectos tóxicos ejercidos por la FCL sobre sistema inmune.

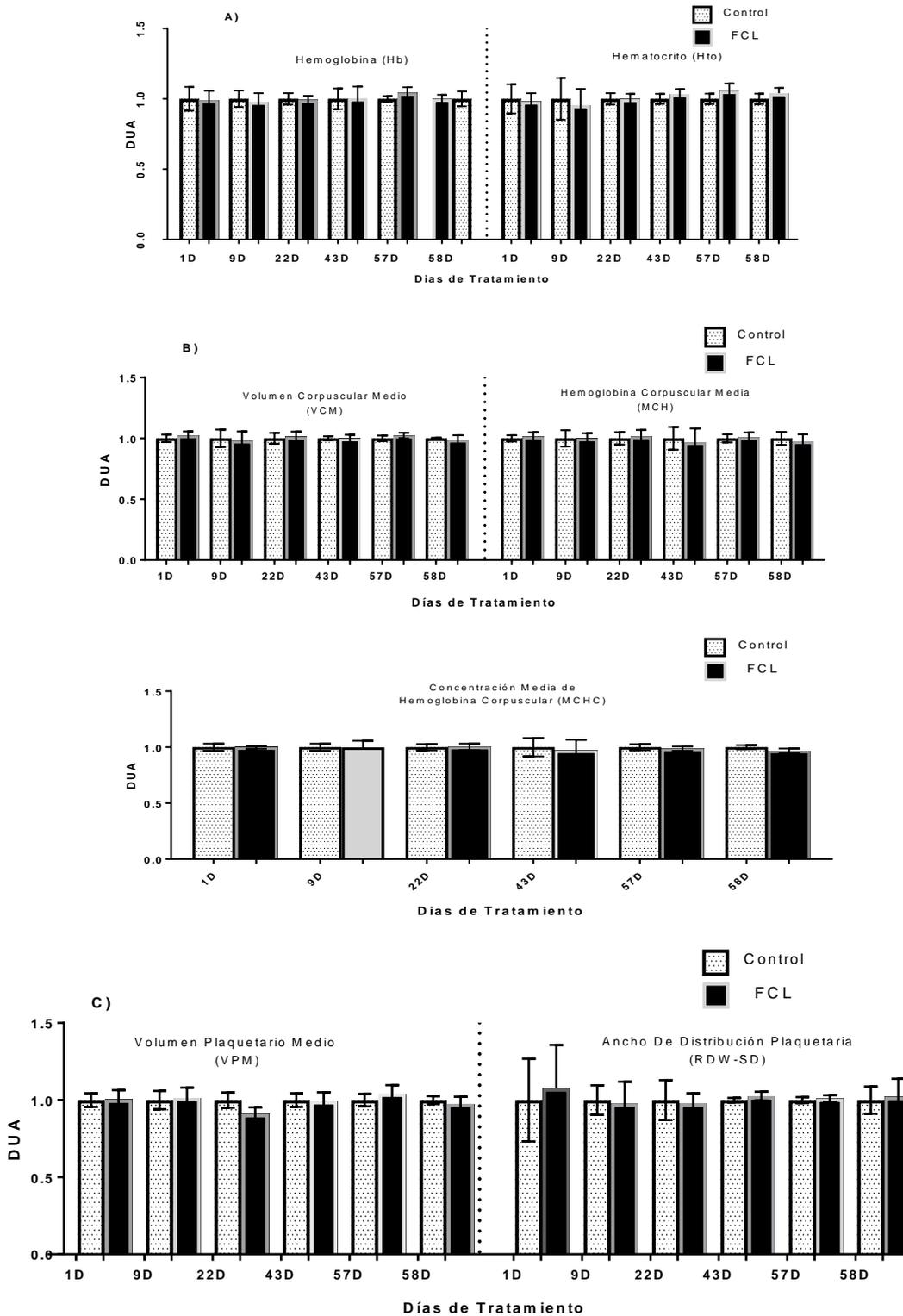
Con base en la capacidad que algunas lectinas presentan de aglutinar células rojas, se monitorearon parámetros hematopoyéticos y células rojas (Figura 14). Los resultados muestran que las células rojas no tienden a aglutinarse debido al efecto de la administración con la FCL, esto sugiere que no sufren procesos de alteración de tamaño, forma o color que alteren sus funciones, dado a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas

Para el caso de las plaquetas, aunque no se presentaron cambios estadísticamente significativos por el efecto de la FCL respecto al control, es importante continuar monitoreando este parámetro en los siguientes días de tratamiento, dada la tendencia que presentan las lectinas a generar agregación plaquetaria (Castillo-Villanueva, 2005).

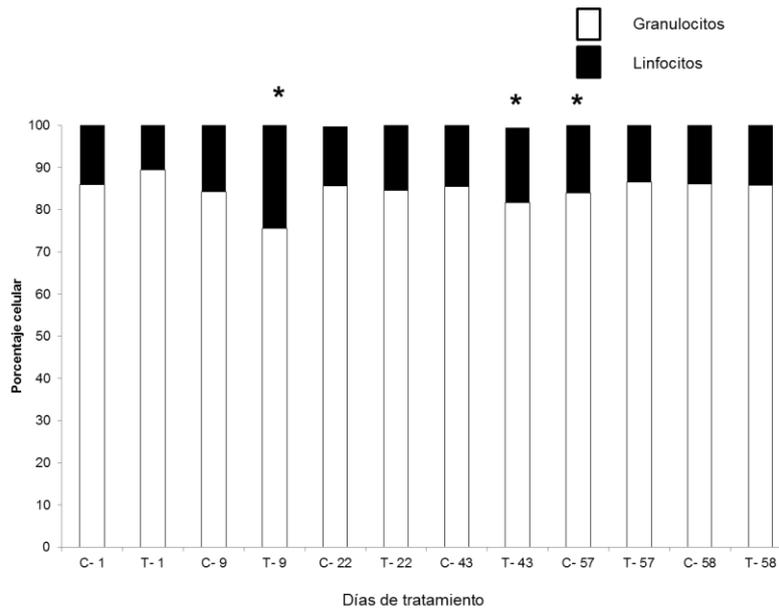


**Figura 13. Efecto de la administración de FCL sobre células sanguíneas.** Células sanguíneas (células blancas, células rojas y plaquetas) bajo el tratamiento de la Fracción concentrada de Lectinas (FCL). Se calculó la desviación estándar (DE) representadas por barras de error. (\*) Diferencia estadísticamente significativa,  $p \leq 0,05$  t student. Día 1 n=9, día 9 n=14, día 22 n=9, día 43 n=16, día 57 n=6 y día 58 n= 4

Se realizó un análisis más detallado de la proporción de linfocitos respecto a los granulocitos durante los días del tratamiento (Figura 15), bajo un esquema de administración más largo que los utilizados por Moreno-Celis en el 2014 y Ferriz-Martínez y col. en el 2015.



**Figura 14. Efecto de la FCL sobre parámetros hematológicos.** Parámetros hematológicos A) Hemoglobina y Hematocrito, B) Volumen Corpuscular medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM), Concentración media de Hemoglobina (MCHC), C) Volumen Plaquetario Medio (VPM), Ancho de Distribución Plaquetaria (RDW-SD). Unidades arbitrarias ajustadas con respecto al control. (\*) Diferencia estadísticamente significativa,  $p \leq 0,05$  t student. Día 1 n=9, día 9 n=14, día 22 n=9, día 43 n=16, día 57 n=6 y día 58 n= 4.



**Figura 15. Proporción de linfocitos y granulocitos del total de glóbulos blancos en ratas tratadas con la FCL de frijol Tépari. (\*)** Diferencia estadística significativa (t de student,  $p \leq 0.05$ ). Día 1 n=9, día 9 n=14, día 22 n=9, día 43 n=16, día 57 n=6 y día 58 n= 4

Los resultados obtenidos mediante biometría hemática respecto al porcentaje celular, sugieren un cambio en la proporción linfocitos/granulocitos, desde el noveno día de administración, además, son consistentes con lo observado por Moreno-Celis en el 2014, ya que en el día 9 se observó cambio en la proporción de linfocitos/granulocitos, en donde la proporción de granulocitos aumentó. Lo anterior coincide con el número de placas de Peyer, lo cual sugiere que es en este día cuando la respuesta inmune se eleva. En el presente trabajo también se encontró un cambio significativo al día 43, que anteriormente no se había reportado, ya que este esquema de administración fue más largo que en trabajos realizados anteriormente en el grupo de investigación. Estos cambios podrían estar relacionados con los niveles y el patrón de citocinas.

Se realizó un recuento periférico de células sanguíneas mediante hemotinción (Cuadro 4) para confirmar los parámetros hematopoyéticos analizados mediante biometría hemática. Se observó que la administración con FCL no afectó la morfología de las células rojas respecto al control.

**Cuadro 4. Análisis de células sanguíneas mediante recuento en frotis sanguíneo y hemotinción en ratas tratadas con la FCL de Frijol Tépari.**

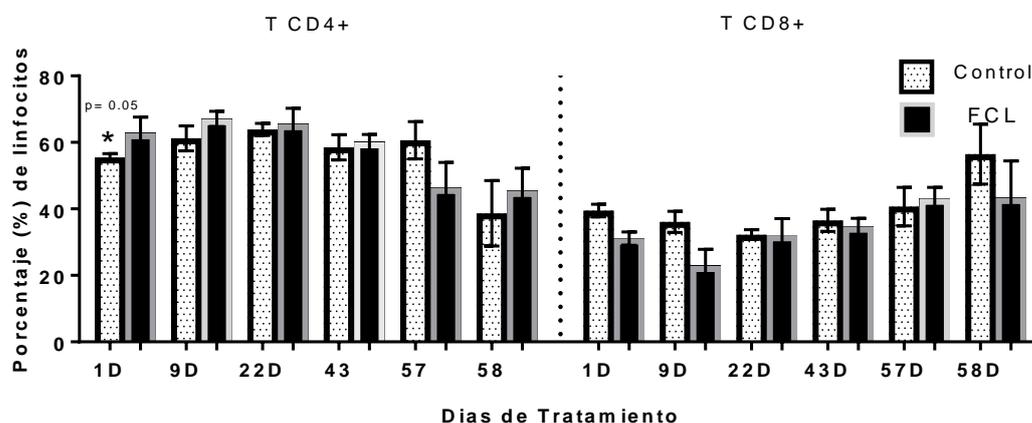
DIA 1				
% Linaje Celular	Media Grupo Control	Media Grupo Tratamiento	Valor de referencia (%)	p
Linfocitos	85.75 ± 7,88	86.25 ± 5,37	82.05-97.26	0.920
Neutrófilos Maduros	11,25 ± 4,03	9,75 ± 3.40	1.99-13.51	0.590
Monocitos	2.5 ± 3,10	2.75 ± 1.70	0-2	0.893
Eosinófilos	0 ± 0	0.25 ± 0.5	0-2	0.356
Basófilos	0 ± 0	0 ± 0	0-2	
Neutrófilos Inmaduros	0.5 ± 1	0.5 ± 1	1.99-13.51	1
DIA 9				
% Linaje Celular	Media Grupo Control	Media Grupo Tratamiento	Valor de referencia (%)	p
Linfocitos	87.5 ± 5.19	71.80 ± 9.34	82.05-97.26	0.285
Neutrófilos Maduros	9.25 ± 3.95	24.4 ± 8.39	1.99-13.51	0.167
Monocitos	2.75 ± 1.25	2.6 ± 2.07	0-2	0.903
Eosinófilos	0 ± 0	0.2 ± 0.45	0-2	0.407
Basófilos	0	0	0-2	
Neutrófilos Inmaduros	0.5 ± 0.58	1 ± 0.71	1.99-13.51	0.292
DIA 22				
% Linaje Celular	Media Grupo Control	Media Grupo Tratamiento	Valor de referencia (%)	p
Linfocitos	90.75 ± 2.22	82.25 ± 7.13	82.05-97.26	0.063
Neutrófilos Maduros	6.75 ± 2.06	10.5 ± 3	1.99-13.51	0.085
Monocitos	2.5 ± 1	6 ± 4.3	0-2	0.166
Eosinófilos	0	0	0-2	
Basófilos	0	0	0-2	
Neutrófilos Inmaduros	0	1.25 ± 1.5	1.99-13.51	0.147
DIA 43				
% Linaje Celular	Media Grupo Control	Media Grupo Tratamiento	Valor de referencia (%)	p
Linfocitos	78.5 ± 7.23	84.3 ± 9.86	82.05-97.26	0.404
Neutrófilos Maduros	11 ± 4.83	12.3 ± 5.77	1.99-13.51	0.752
Monocitos	8 ± 4.54	1.7 ± 1.52	0-2	0.072
Eosinófilos	0	0.5 ± 1	0-2	0.391
Basófilos	0	0	0-2	
Neutrófilos Inmaduros	2 ± 1.41	1.7 ± 2.89	1.99-13.51	0.846
DIA 57				
% Linaje Celular	Media Grupo Control	Media Grupo Tratamiento	Valor de referencia (%)	p
Linfocitos	80.75 ± 5.68	5.5 ± 7.77	82.05-97.26	0.929
Neutrófilos Maduros	13 ± 4.24	9.5 ± 6.24	1.99-13.51	0.604
Monocitos	6 ± 2.94	4 ± 2.16	0-2	0.670
Eosinófilos	0.25 ± 0.5	0.25 ± 0.5	0-2	1
Basófilos	0	0	0-2	
Neutrófilos Inmaduros	0	0.75 ± 0.96	1.99-13.51	<b>0.010*</b>
DIA 58				
% Linaje Celular	Media Grupo Control	Media Grupo Tratamiento	Valor de referencia (%)	p
Linfocitos	88.5 ± 7.05	83.5 ± 4.72	82.05-97.26	0.362
Neutrófilos Maduros	9.5 ± 4.79	11.5 ± 3.94	1.99-13.51	0.394
Monocitos	1.75 ± 2.21	3.5 ± 0.58	0-2	0.315
Eosinófilos	0	0.25 ± 0.5	0-2	1
Basófilos	0	0	0-2	
Neutrófilos Inmaduros	0.25 ± 0.5	1 ± 0.81	1.99-13.51	0.168

(\*) Indica la diferencia estadística significativa (t student, p<0.05)

Se observó aumento en la neutrófilos inmaduros en el día 57 ( $p \leq 0.05$ ) respecto al control, sin que esto tenga repercusiones fisiológicas a lo largo del esquema de administración. Los resultados, hasta aquí, sugieren que la posible activación inmune encontrada no es inespecífica, sino que puede ser realizada por parte de una familia especializada de linfocitos.

#### 7.4 Evaluación de marcadores de diferenciación CD mediante Citometría de flujo

Como parte de los objetivos del presente trabajo, se evaluaron las subpoblaciones de linfocitos T: TCD4+ que corresponde al linfocito T cooperador ( $T_H$ ), y TCD8+ que corresponde al linfocito T citotóxico ( $T_C$ ), para poder entender el papel de la FCL sobre células reguladoras en un modelo sano animal de crecimiento acelerado (Figura 16). Se encontraron valores diferentes respecto al control ( $p \leq 0.05$ ) en el primer de administración por parte de los CD4+, lo anterior sugiere un cambio respecto a la respuesta, este suceso puede estar en relación con la edad de la rata, ya que actualmente se sabe que en la pubertad los niveles de CD4+ circulante es mayor, pero estos niveles se estabilizan conforme el crecimiento (Klein y col., 2016).

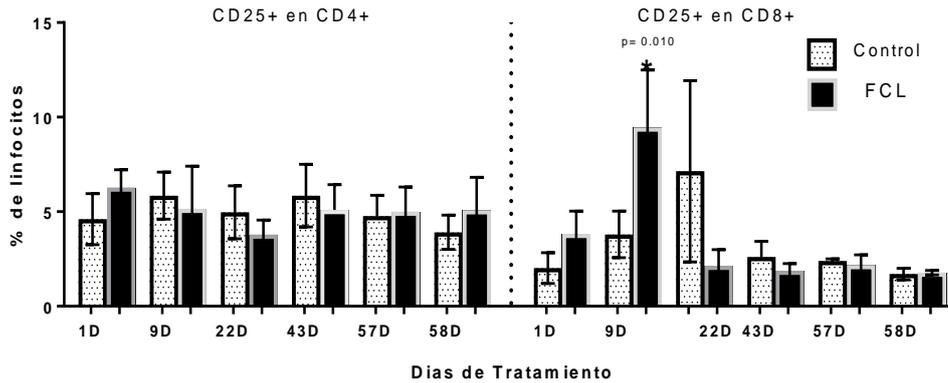


**Figura 16. Porcentaje de linfocitos TCD4+ ( $T_H$ ) y linfocitos TCD8+ ( $T_C$ ) en ratas tratadas con la FCL de frijol Tépari. (\*) Indica diferencia estadística significativa (t de student,  $p \leq 0.05$ ). Día 1 n= 4, día 9 n= 5, día 22 n= 4, día 43 n= 10, día 57 n=6 y día 58 n= 4**

Estudios anteriores realizados con la lectina de frijol *Phaseolus acutifolius*, variedad escumite, realizado por Castillo-Villanueva y col. en el 2007, probando la lectina de *Phaseolus acutifolius* variedad escumite se evaluó el efecto sobre leucocitos humanos *in vitro*, encontrando que a concentraciones de 15 µg/mL hubo una inducción de efecto mitogénico, y proliferación tanto de CD4+ y CD8+, con mayor tendencia a CD8+ es decir, linfocitos del tipo citotóxicos (Castillo-Villanueva y col., 2007). En contraste, en este estudio no se encontró una tendencia sobre CD8+, sin embargo nuestro modelo, a diferencia del de Castillo-Villanueva y col., es *in vivo*.

Además se evaluó la actividad de un cluster extra: el CD25+. Esta subpoblación se evaluó a partir de la población de TCD4+ y TCD8+, siendo CD25 un marcador indicador de células T reguladoras (Tregs), (Figura 17). No se observaron cambios estadísticamente significativos ( $p \leq 0.05$ ), por parte de los CD25 que forman parte de los CD4+, mientras que en CD8+ los cambios observados fueron en los días 9. Estos resultados sugieren, que puede ser en el día 9 donde puede haber mayor influencia de las células Tregs debido a la administración de la FCL, lo cual puede traducirse en una mayor activación del sistema inmune. Cabe mencionar que este modelo de estudio son ratas sanas de 6 semanas de edad, por tanto están en proceso de maduración de su sistema inmunológico y no están expuestos a ninguna enfermedad que modique a las células Tregs. Si bien en este estudio no se analizó de forma periférica la presencia de FoxP3, la presencia positiva de CD25+ es indicador que FoxP3 puede estar presente de forma periférica.

Es importante, en un futuro analizar estos parámetros en ratas sanas con una muestra más grande, y también en un contexto global con un modelo de cáncer a nivel periférico, dado que las células Tregs pueden impedir la respuesta antitumoral en forma dependiente de IL-2. Es posible que el incremento de la IL-2 debido a la administración de la FCL pueda impedir las respuesta inmunes antitumorales (Antony y col., 2005).

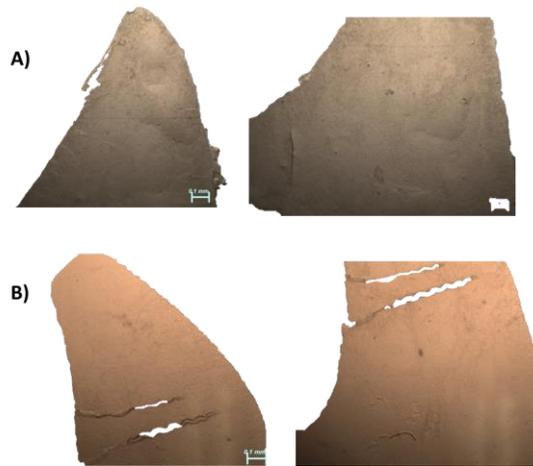


**Figura 17. Porcentaje de Linfocitos TCD25+ (T<sub>H</sub>) (T<sub>C</sub>) en CD4+ y CD8+, en ratas tratadas con la FCL de frijol Tépari. (\*) Indica diferencia estadística significativa (t de Student, p≤0.05). Día 1 n= 4, día 9 n= 5, día 22 n= 4, día 43 n= 10, día 57 n=6 y día 58 n= 4**

### 7.5 Análisis de Inmunohistoquímica para FoxP3

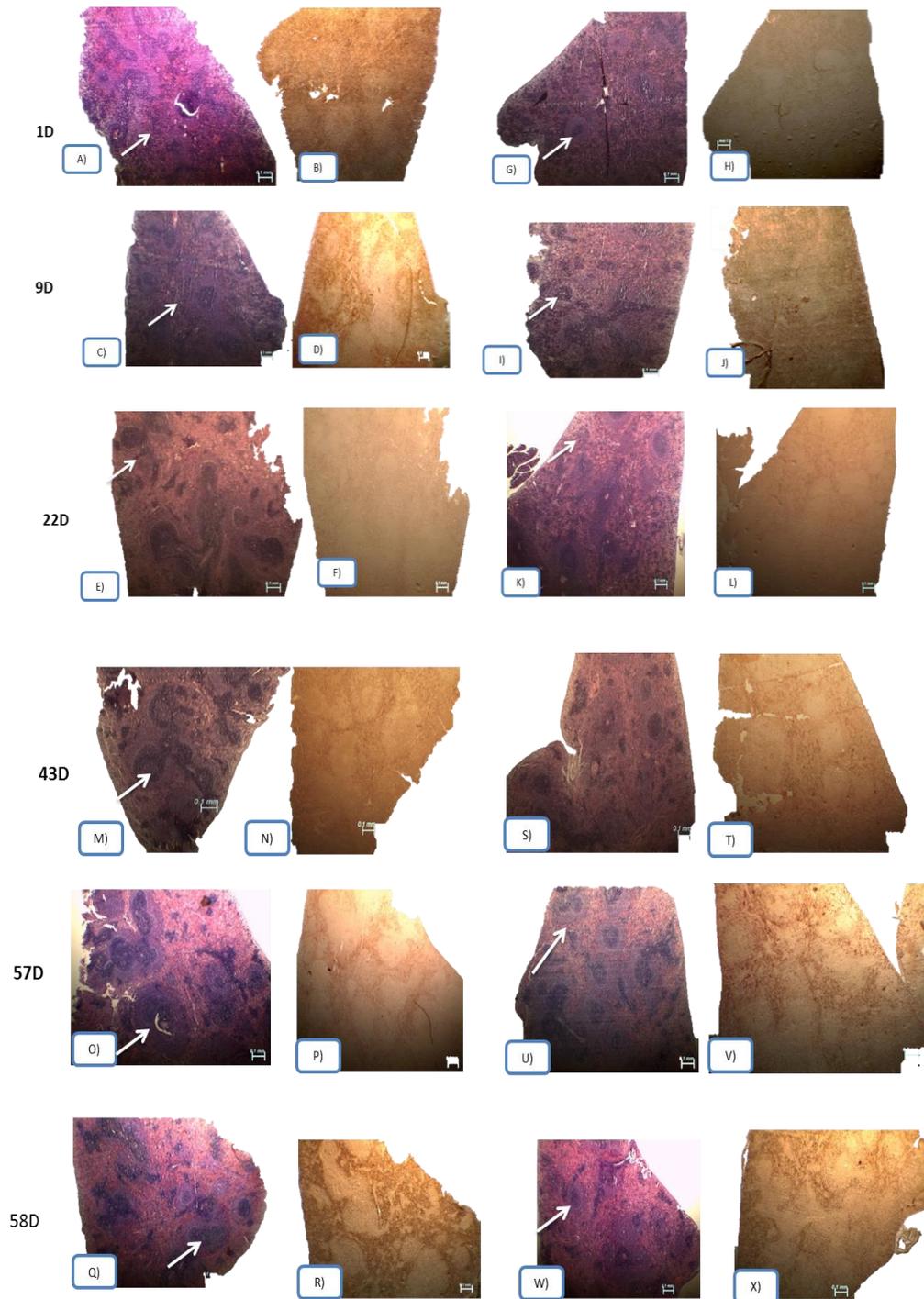
Durante la estandarización de la técnica con este anticuerpo primario, se utilizaron controles negativos, que no dieron señal (Figura 18). Los análisis se realizaron con ayuda del software Image proplus® en el laboratorio B11, de la UNAM campus Juriquilla con el objetivo 4x y una escala de medición de 0.1 mm para todo el tejido. Se realizó el cálculo de densidad óptica de los tejidos de bazo de ratas como cociente de la densidad máxima entre la división media.

La Figura 19 muestra la inmunohistoquímica para FoxP3, en donde se observó mayor presencia de este factor de transcripción relacionado con la regulación de la respuesta inmune con el tratamiento con FCL respecto al control. Esta tendencia estuvo presente alrededor de los centros germinales, lo cual se ha estudiado anteriormente en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* por Wollenberg y col. (2011), Linterman y col. (2011) y Chung y col. (2011). En estos estudios se relaciona el papel de los centros germinales con la presencia de células Tregs orquestadas por Foxp3, lo cual puede sugerir porque es en el día 9 y 22 donde se observa mayor presencia de esta proteína en bazo.

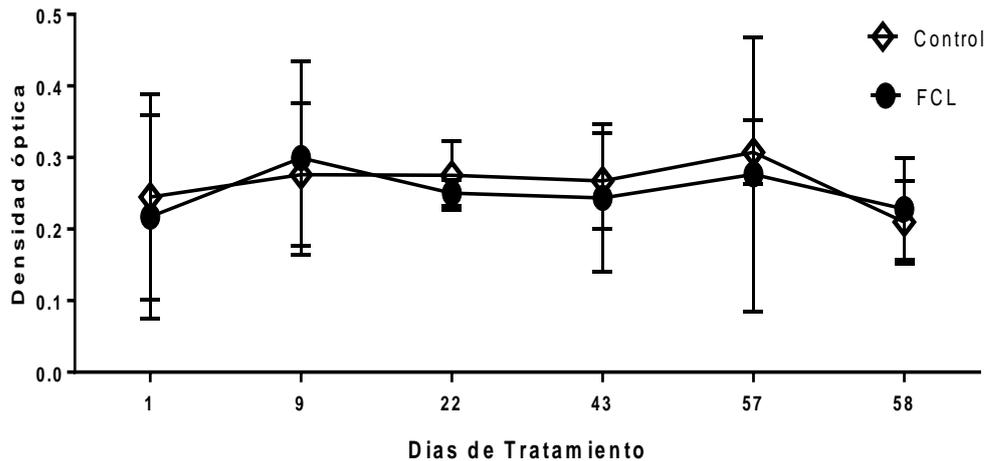


**Figura 18. Controles negativos para inmunohistoquímica.** A) Control negativo sin la presencia del primer anticuerpo FoxP3. B) Control doble negativo, sin ningún anticuerpo.

Al realizar el análisis estadístico no se encontraron cambios significativos ( $p > 0.05$ ) del tratamiento respecto al control a lo largo de los días de administración (Figura 20). No debe pasar por alto que la cantidad de FoxP3 presente en órganos inmunes secundarios, como es el caso del bazo, es muy baja (Sakaguchi y col., 2005). En estudios a futuro debe tomarse en consideración no solo la evaluación por citometría de flujo de los marcadores de diferenciación CD4, CD8 y CD25 sino también de FoxP3 con la finalidad de poder tener una idea general de cómo están siendo estimuladas las células Tregs. Tampoco debe descartarse la evaluación de FoxP3 sobre la actividad de centros germinales ya que en este trabajo se observó que la mayor expresión de FoxP3 estuvo presente alrededor de los centros germinales, lo cual se ha estudiado anteriormente en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* (Wollenberg y col., 2011; Linterman y col., 2011; Chung y col., 2011).



**Figura 19. Inmunohistoquímica de Bazo de ratas tratadas con la FCL.** Corte histológico de bazo con tinción de H y E (A, C, E, M, O, Q) 4x, e inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal contra FoxP3 (B, D, F, N, P, R) del grupo control. Corte histológico de bazo con tinción H y E (G, I, K, S, U, W) 4x, e inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal contra FoxP3 (H, J, L, T, V, X), del grupo tratado con la FCL. Grupos correspondientes a los días, 1, 9, 22, 43, 57 y 58 de administración. Día 1 n= 4, día 9 n= 5, día 22 n= 4, día 43 n= 4, día 57 n=4 y día 58 n= 4



**Figura 20. Densidad óptica de la Inmunohistoquímica para FoxP3 en bazo de ratas tratadas con la FCL.** Densidad óptica obtenida de la inmunohistoquímica de bazo de rata tratada con la FCL. OD: Densidad óptica. (\*) Indica diferencia estadística significativa (t de student,  $p \leq 0.05$ ). Día 1 n= 4, día 9 n= 5, día 22 n= 4, día 43 n= 4, día 57 n=4 y día 58 n= 4

Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo han mostrado que la FCL afecta la integridad intestinal. FoxP3 podría ser un buen candidato para estudiar el efecto en modelos murinos, ya que en estudios de pacientes con déficit de FoxP3 se ha sugerido que las células Tregs son importantes para mantener la homeostasis intestinal (Izcue y col., 2009). Dado el papel regulador que tiene FoxP3 sobre linfocitos T (Fontenot y col., 2005; de Leeuw y col., 2012), y los cambios observados en eosinófilos, resulta conveniente ampliar el estudio utilizando pruebas que evalúen citocinas relacionadas con eosinófilos como la IL-25 e IFN- $\gamma$  (Daiy col., 2016).

## 8 CONCLUSIONES

El presente estudio determinó el posible efecto inmunomodulador de la FCL en ratas Sprague Dawley de 6 semanas de edad por 58 días en un esquema de tratamiento de 43 días de administración cada tercer día, descanso de 14 días y una administración única al día 57. Bajo este esquema no se observaron diferencias estadísticamente significativas sobre la pérdida en la ganancia de peso en las ratas ni sobre el consumo de alimento. En cuanto al peso de los órganos analizados, bazo y timo, no se encontraron cambios estadísticamente significativos a lo largo del tratamiento.

Respecto al efecto sobre células del sistema hematopoyético, no se encontraron evidencias de cambios estadísticamente significativos debido a la administración de la FCL en células rojas ni parámetros hematopoyéticos relacionados. Sin embargo, se observaron cambios en la proporción granulocitos/linfocitos, particularmente aumento en eosinófilos. Lo anterior sugiere que hay una estimulación de citocinas en las ratas tratadas con FCL respecto al control, por lo que se recomienda determinar el patrón de citocinas.

No se presentaron cambios en el número de centros germinales en bazo pero ni un aumento en área y longitud en los días, lo que sugiere que no hay un aumento en la reactividad del sistema inmune de asociado a centros germinales. Nuevos estudios deben enfocarse a determinar cuáles células inmunitarias se encuentran más activas.

Las pruebas relacionadas con los marcadores para identificar los diferentes linajes de linfocitos T mostraron un mayor efecto sobre los Tregs en CD25 debido a la administración con la FCL. Esto sugiere que puede haber una mayor secreción de citosinas.

Las pruebas de inmunohistoquímica para evaluar la presencia y cantidad de FoxP3 no mostraron cambios estadísticamente significativos. Dado que este modelo de estudio fue en ratas sanas, se sugiere continuar con el estudio de FoxP3 en modelos con cáncer inducido de la misma edad.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman A H, Peber J. 2012. Inmunología Celular y Molecular. Editorial. Elsevier. 5° Edición. Pp. Capítulo 1.
- Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. 2006. IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood.*; 107(6):2409-14.
- Aucouturier P, Pineau N, Brugier JC, Mihaesco E, Duarte F, Skvaril F, Preud'homme JL. 1989. Jacalin: a new laboratory tool in immunochemistry and celular immunology. *J Clin Lab Anal.* 3(4):244-51.
- Antony PA, Piccirillo CA, Akpinarli A, et al. CD8+ 2005. T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol.* 174:2591-2601.
- Bandeira-Melo C, Weller PF. 2005. Mechanisms of eosinophil cytokine release. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.*;100(Suppl 1):73-81.
- Baihao Zhang, Shunsuke Chikuma, Shohei Hori, Sidonia Fagarasan, and Tasuku Honjo 2016. Nonoverlapping roles of PD-1 and FoxP3 in maintaining immune tolerance in a novel autoimmune pancreatitis mouse model *PNAS* 113 (30) 8490-8495.
- Barbosa-Lorenzi VC, Buranello PA, Roque-Barreira MC, Jamur MC, Oliver C, Pereira-da-Silva G. 2011. The lectin ArtinM binds to mast cells inducing cell activation and mediator release. *Biochem Biophys Res Commun.* 416(3-4):318-24.
- Barnes, M. J., Griseri, T., Johnson, A. M. F., Young, W., Powrie, F., & Izcue, A. 2013. CTLA-4 promotes Foxp3 induction and regulatory T cell accumulation in the intestinal lamina propria. *Mucosal Immunology*, 6(2), 324–334.
- Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL et al. 2006. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* 24:5373-5380.

- Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(14):5138-43.
- Blanco-Labra A, Aguirre Mancilla C. 2002. Proteínas Involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta Universitaria*, 3:3-28
- Bloom. W., Fawcett. D.W. 1987. The spleen. In: *A Textbook of Histology*. pp. 470-484. Ed. Interamericana-McGraw Hill.
- Blue J., Weiss, L. 1981. Species variation in the structure and function of the marginal zone: an electron microscope study of cat spleen. *Am. J. Anat.* 161:169-187
- Bronte V, Pittet M. 2013. The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. *Immunity*, 39, 806-818.
- Burke. J.S., Simon G.T. 1970. Electron microscopy of the spleen.. *Anatomy and microcirculation*. *Am. J. Path.* 58: 127-155.
- Cardoso MR, Mota CM, Ribeiro DP, Santiago FM, Carvalho JV, Araujo EC, Silva NM, Mineo TW, Roque-Barreira MC, Mineo JR, Silva DA. 2011. ArtinM, a D-mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against *Neospora caninum*. *Vaccine*.;29(49):9183-93.
- Castillo-Villanueva A, Abdullaev F. 2005. Plant lectins and their effects on cancer. *Rev Invest Clin*; 57(1):55-64.
- Castillo-Villanueva A, Caballero-Ortega H, Abdullaev-Jafarova F, Garfias Y, del Carmen Jiménez-Martínez M, Bouquelet S, Martínez G, Mendoza-Hernández G, Zenteno E. 2007. Lectin from *Phaseolus acutifolius* var. *escumite*: chemical characterization, sugar specificity, and effect on human T-lymphocytes. *J Agric Food Chem.* 55(14):5781-7.
- Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascurain R. 2009. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol.* 6(1):15-25.

- Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S, Wang YH, Lim H, Reynolds JM, Zhou XH, Fan HM, Liu ZM, Neelapu SS, Dong C. 2011. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med.*;17(8):983-8.
- Carr TF, Berdnikovs S, Simon HU, Bochner BS, Rosenwasser LJ. 2016. Eosinophilic bioactivities in severe asthma. *World Allergy Organ J.* 9:21.
- Coffer PJ, Burgering BM. 2004. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 4(11):889-99.
- Cruz-Jiménez S. 2013. Efecto de la fracción concentrada en lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) en médula ósea de ratas. Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- Da Silva LC, Correia MT. 2014. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. *Front Microbiol*; 5:20
- Dai C, Lu FN, Jin N, Yang B, Gao C, Zhao B, Fu JZ, Hong SF, Liang HT, Chen LH, Chen ZS, Chen J, Qi ZQ. 2016. Recombinant IL-33 prolongs leflunomide-mediated graft survival by reducing IFN- $\gamma$  and expanding CD4(+)Foxp3(+) T cells in concordant heart transplantation. *Lab Invest.*;96(8):820-9.
- Dantas M, Nunes-Pinheiro D.D, Albuquerque D, Mourao R., Melo D, Silva Lima M. 2000. Immunogenicity and Modulatory Effect of the Lectins from *Artocarpus heterophyllus* (Jackfruit) Seeds, Artocarpin and Jacalin. *Acta Farm. Bonaerense* 19 (2): 105- 117
- DeLeeuw RJ, Kost SE, Kakal JA, Nelson BH. 2012. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. *Clin Cancer Res.*;18(11):3022-9.
- Desai A, Grolleau-Julius A, Yung R. Leukocyte function in the aging immune system. *J Leukoc Biol.* 2010 Jun;87(6):1001-9.
- Düllmann J, Feldhaus S, Van Damme EJ, Peumans WJ, Schumacher U. 2000. Lectin histochemistry of the spleen: a new lectin visualizes the stromal architecture

of white pulp and the sinuses of red pulp. *J Histochem Cytochem.* ;48(7):923-31.

Ferriz- Martinez R, Torres- Arteaga I, Blanco- Labra A, Garcia- Gasca T. 2010. The role of plant lectins in cancer treatment. Nova Science Publisher Inc; 978. 71-89.

Ferriz- Martínez R, García-García K, Torres-Arteaga I, Rodríguez-Méndez AJ, Guerrero-Carrillo M, Moreno-Celis U, Angeles-Zaragoza V, Blanco-Labra A, Gallegos-Corona M, Robles-Alvarez J, Mendiola-Olaya E, Andrade-Montemayor H, Garcia-Gasca T. 2015. Tolerability Assesment of a lectin fraction from Tepary been sedes (*Phaseolus acutifolius*) orally administired to rats. *Toxicology Reports* 2:63–69

Freed DL. 1999. Do dietary lectins cause disease? *BMJ*;318:1023-4.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4:330–336.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, et al. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22: 329–341.

Izcue A, Coombes JL, Powrie F. 2009. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol.*;27:313-38. .

Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B., Kuby, J. and Palacios Martínez, R. 2007. *Inmunología de Kuby*. México. Editorial: McGraw-Hill Interamericana., 6° Edición. Pp 39-47.

Gabius HJ. 2001. Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: case studies for the mistletoe lectin and galectin-1. *Biochimie.*;83(7):659-66.

Gao J, Bernatchez C, Sharma P, Radvanyi LG, Hwu P. 2013. Advances in the development of cancer immunotherapies. *Trends Immunol.* 34(2):90-8. Doi: 10.1016/j.it.2012.08.004.

García-Gasca T, García-Cruz M, Hernandez-Rivera E, López-Matínez J, Castañeda-Cuevas AL, Yllescas-Gasca L, Rodríguez-Méndez AJ, Mendiola-Olaya E,

- Castro-Guillén JL, Blanco-Labra A. 2012.: Effects of Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Protease Inhibitor and Semipure Lectin Fractions on Cancer Cells, *Nutrition and Cancer* 64:1269-1278.
- Gartner L, Hiatt J. 2015. *Texto Atlas en color y texto de histología*. Editorial: MacGraw-Hill, 3ª Edición. P.P 1-25
- Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY. 2007. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*. 445: 771–775.
- Geiger TL, Tauro S. 2012. Nature and nurture in Foxp3(+) regulatory T cell development, stability, and function. *Hum Immunol*. 73(3):232-9.
- Goldstein IJ, Hayes CE. 1978. The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plant and animals. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 35:127.
- Gong F, Ma Y, Ma A, Yu Q, Zhang J, Nie H, Chen X, Shen B, Li N, Zhang D. 2007. A lectin from Chinese mistletoe increases gamma delta T cell mediated cytotoxicity through induction of caspase-dependent apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 39(6):445-52.
- González de Mejía E, Hankins CN, Paredes-López O, Shannon ML. 1989. The lectins and lectin-like proteins of tepary beans (*Phaseolus acutifolius*) and tepary-common bean (*Phaseolus vulgaris*) hybrids. *J Biochem* 14:117-126.
- González de Mejía E, Prisecaru VI. 2005. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr.*; 45(6):425-45
- González Parias JL, Duque Giraldo V, Velásquez-Lopera M. 2010. FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología*. 29:74-84
- Hadrup S, Donia M, Straten P. 2013. Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment*. 6:123–133
- Hajto T, Hostanska K, Gabius HJ. 1989. Modulatory potency of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients. *Cancer Res*. 49(17):4803-8.

- Haiqi H, Yong Z, Yi L. 2011. Transcriptional regulation of Foxp3 in regulatory T cells. *Immunobiology.*;216(6):678-85.
- Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. 2006. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 12:5423-5434.
- Hong T, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H. 1998. Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of Kampo (Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To". *Phytomedicine.*;5(5):353-60.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061. Huehn, J., Polansky, J.K., and Hamann, A. (2009). Epigenetic control of FOXP3 expression: The key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat. Rev. Immunol.* 9,83–89.
- Hori S. 2012. The Foxp3 interactome: a network perspective of T(reg) cells. *Nat Immunol.* 13(10):943-5.
- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5<sup>a</sup> edition. New York: Garland Science.
- Jones AL. 1999. Phaseolus bean: Post-harvest Operations. Food Agriculture Organization of the United States. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-av015e.pdf>
- Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. 2012. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol.* 30: 531-64.
- Khattari R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 4(4):337-42.
- Kelsall A, FitzGerald AJ, Howard CV, Evans RC, Singh R, Rhodes JM, Goodlad RA. 2002. Dietary lectins can stimulate pancreatic growth in the rat. *Int J Exp Pathol.* 83:203-8.
- Klein SL, Flanagan KL. 2016. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol.*;16(10):626-38.

- Końska G, Wójtowicz U, Pituch-Noworolska A. 2008. Possible application of lectins in diagnostics and therapy. Part II. *Przeegl Lek*; 65(5):252-5.
- Lajolo FM, Genovese MI. 2002. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *J Agric Food Chem.*;50(22):6592-8.
- Langer, M., Mockel, B., Eck, J., Zinke, H., Lentzen, H.:1999. Sitespecific mutagenesis of mistletoe lectin: the role of RIP activity in apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264(3), 944–948.
- Lannoo N, Van Damme EJ. 2014. Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Front Plant Sci.* 2014 Aug 13;5: 397.
- Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, Srivastava M, Divekar DP, Beaton L, Hogan JJ, Fagarasan S, Liston A, Smith KG, Vinuesa CG.2011. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med.*;17(8):975-82.
- López-Sánchez C, López-Martínez FJ Castañeda- Cuevas AL, Yleyascas-Gasca L, Ferriz-Martínez RA, Torres-Arteaga IC, García-Gasca T. 2010. Evaluación de la toxicidad In vitro e In vivo de Lectinas de frijol Tépari. *Ciencia@UAQ.* 3:3-13.
- Lyu SY, Park WB. 2010. Mistletoe lectin transport by M-cells in follicle-associated epithelium (FAE) and IL-12 secretion in dendritic cells situated below FAE in vitro. *Arch Pharm Res.*;33(9):1433-41.
- Maloy KJ, Powrie F. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* 2: 816–822.
- Martin F, Ladoire S, Mignot G, Apetoh L, Ghiringhelli F. 2010. Human FOXP3 and cancer. *Oncogene.* ;29(29):4121-9.
- MacLennan IC. 1994. Germinal centers. *Annu Rev Immunol*; 12:117–139.
- Melo RC, Liu L, Xenakis JJ, Spencer LA. 2013. Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unraveling novel mechanisms of selective secretion. *Allergy.* 68(3):274-84.

- Milanez-Almeida P, Meyer-Hermann M, Toker A, Khailaie S, Huehn J. 2015. Foxp3+ regulatory T-cell homeostasis quantitatively differs in murine peripheral lymph nodes and spleen. *Eur J Immunol.* (1):153-66.
- Mitchell, J., Abbot, A. 1971. Antigen in immunity. XVI. A light and electron microscope study of antigen localization in the rat spleen. *Immunology* 2 1 :207-224.
- Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, Fujii H. 2008. Localisation pattern of Foxp3+ regulatory T cells is associated with clinical behaviour in gastric cancer. *Br J Cancer* 98:148-153
- Mody R, Joshi S, Chaney W. 1995. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J Pharmacol Toxicol Methods* 33(1):1-10.
- Moreno-Celis Ulisses, 2014. Efecto de una fracción de lectinas–Inhibidor de proteasas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células hematopoyéticas en ratas Sprague Dawley. Tesis de Maestría en Nutrición Humana, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México
- Morishima N, Mizoguchi I, Okumura M, Chiba Y, Xu M, Shimizu M, Matsui M, Mizuguchi J, Yoshimoto T. 2010. A pivotal role for interleukin-27 in CD8+ T cell functions and generation of cytotoxic lymphocytes, *J Biomed Biotechnol.* 23: 35-42
- Moro-García MA, Alonso-Arias R, López-Vázquez A, Suárez-García FM, Solano-Jaurrieta JJ, Baltar J, López-Larrea C. 2012. Relationship between functional ability in older people, immune system status, and intensity of response to CMV. *Age*, 34(2), 479–495.
- Mosmann TR, Cherwinsky H, Bond MW, GiedlinMA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-2357.
- Muraille E, Pajak B, Urbain J, Leo O. 1999. Carbohydrate-bearing cell surface receptors involved in innate immunity: interleukin-12 induction by mitogenic and nonmitogenic lectins. *Cell. Immunol.* 191(1):1–9
- Nakano T, Goto S, Lai CY, Hsu LW, Tseng HP, Chen KD, Chiu KW, Wang CC, Cheng YF, Chen CL. 2013. Induction of antinuclear antibodies by de novo

autoimmune hepatitis regulates alloimmune responses in rat liver transplantation. Clin Dev Immunol.;413928.

Nishikawa H, Sakaguchi S. 2014. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. Curr Opin Immunol. 27:1-7.

Ohkura N, Sakaguchi S. 2010. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. Semin Immunopathol. 32(2):95-106.

Owen J, Punt J, Stranford S, Jones P, Ribera Muñoz B. 2014. Kuby inmunología. 7° Edición. México : McGraw Hill Interamericana. Pp.317-335

Pack M, Trumpfheller C, Thomas D, Park CG, Granelli-Piperno A, Münz C, Steinman RM. 2008. DEC-205/CD205+ dendritic cells are abundant in the white pulp of the human spleen, including the border region between the red and white pulp. Immunology.;123 (3):438-46.

Panunto-Castelo A, Souza MA, Roque-Barreira MC, Silva JS. 2001. KM (+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. Glycobiology. 11(12):1035-42.

Pereira-da-Silva G, Carvalho FC, Roque-Barreira MC. 2012. Neutrophil activation induced by plant lectins: modulation of inflammatory processes. Inflamm Allergy Drug Targets. 11(6):433-41.

Ramsdell F, Ziegler SF. 2014. FOXP3 and scurfy: how it all began. Nat Rev Immunol. 14(5):343-9. doi: 10.1038/nri3650.

Reis EA, Athanzio DA, Cavada BS, Teixeira EH, de Paulo Teixeira Pinto V, Carmo TM, Reis A, Troccoli G, Croda J, Harn D, Barral-Netto M, Reis MG. 2008. Potential immunomodulatory effects of plant lectins in *Schistosoma mansoni* infection. Acta Trop.;108(2-3):160-5.

Reyes-Rocha B. 2011. Efecto de la administración de la fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre el sistema inmune de rata. Tesis de Doctorado en Ciencias de la Salud. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

- Reynoso-Camacho R, Gonzalez de Mejía E, Loarca Piña G. 2003. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food and Chemical Toxicology*, 41:21-27.
- Rhodes JM. Beans means lectins. *Gut*. 1999; 44(5):593-4.
- Rogério AP, Cardoso CR, Fontanari C, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, Silva EV, Koyama NS, Basei FL, Soares EG, Calixto JB, Stowell SR, Dias-Baruffi M, Faccioli LH. 2007. Anti-asthmatic potential of a D-galactosebinding lectin from *Synadenium carinatum* latex. *Glycobiology* 17(8), 795–804.
- Ross M, Pawlina W. 2015. *Histología Texto y atlas, correlación con biología molecular y celular*. Wolters Kluwer. Ed. LWW. 7ª Edición.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995. Immunologic tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155, 1151–1164.
- Sakaguchi S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6:345–2.
- Sathyanarayanaiah K, Sánchez I. 1991. Evaluación de características de raíz y vástago de frijol Tèpari (*Phaseolus acutifolius*). *Revista Científica Agraria*. 7:26-35.
- Sharon N, Lis H y Lotan R. 1974. On the structural diversity of lectins. *Colloq. Int Du C.N.R.S* 221, 693-709.
- Sharon N, Lis H. 1995. Lectins proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. *Essays Biochem.*; 0:59-75.
- Sharon N. 2007. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol Chem*; 282(5):2753-64.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. 2011. Cancer immunoediting: integration immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 331:1565
- Silva AF, Matos MP, Ralph MT, Silva DL, de Alencar NM, Ramos MV, Lima-Filho JV. 2016. Comparison of immunomodulatory properties of mannose-binding

- lectins from *Canavalia brasiliensis* and *Cratylia argentea* in a mice model of *Salmonella* infection. *Int Immunopharmacol.* 31:233-8.
- Souza MA, Carvalho FC, Ruas LP, Ricci-Azevedo R, Roque-Barreira MC. 2013. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj J.* 30(7):641-57.
- Sobotta Welsch. 2009. *Histología*. Ed. Panamericana, 2da. Edición. México, DF. Pp 277.
- Spencer LA, Szela CT, Perez SA, Kirchhoffer CL, Neves JS, Radke AL, Weller F. 2009. Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *J Leukoc Biol*, 85:117-123.
- Szylberg Ł, Bodnar M, Harasymczuk J, Marszalek A. 2014. Expression of FoxP3 protein plays a key role in thyroid tumors in children. *Fetal Pediatr Pathol.* 33(2):84-91. doi: 10.3109/15513815.2013.864347.
- Tablin F., Weiss L. 1983. The equine spleen: an electron microscopic analysis. *Am. J. Anat.* 166:393-416.
- Tomiyama C, Watanabe H, Izutsu Y, Watanabe M, Abo T. 2011. Suppressive role of hepatic dendritic cells in concanavalin A-induced hepatitis. *Clin Exp Immunol.* 166(2):258-68.
- Valadez-Vega C, Guzmán-Partida AM, Soto-Cordova FJ, Alvarez-Manilla G, Morales-González JA, Madrigal-Santillán E, Villagómez-Ibarra JR, Zúñiga-Pérez C, Gutiérrez-Salinas J, Becerril-Flores MA. 2011. Purification, biochemical characterization, and bioactive properties of a lectin purified from the seeds of white tepary bean (*Phaseolus acutifolius* variety *latifolius*). *Molecules.* 16(3):2561-82.
- Van- Damme EJM, Peumans WJ, Pusztai A, Bardocz S. 1998. *Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications*. London. Wiley. 978: 31-50.
- Wei HX, Chuang YH, Li B, Wei H, Sun R, Moritoki Y, Gershwin ME, Lian ZX, Tian Z. 2008. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells protect against T cell-mediated

fulminant hepatitis in a TGF-beta-dependent manner in mice. *J Immunol.* 181(10):7221-9

Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernández A, Almeida C, Oliveira VG, Faro J, Graca L. 2011. Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. *J Immunol.* 1;187(9):4553-60.

Yomogida K, Wu S, Baravati B, Avendano C, Caldwell T, Maniaci B, Zhu Y, Chu CQ. 2013. Cell penetrating recombinant Foxp3 protein enhances Treg function and ameliorates arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 434(2):263-7.

Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Her E, Kim SH, Kim K, Azuma I, Kim JB. 2001. Cellular and humoral adjuvant activity of lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album colaratum*). *Int Immunopharmacol.*;1(5):881-9.

Ziegler SF. 2006. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol.* 24:209-26.