



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRIA EN NUTRICION HUMANA

**Efecto de una fracción de lectinas-Inhibidor de proteasas de frijol Tépari
(*Phaseolus acutifolius*) sobre células hematopoyéticas en ratas Sprague
Dawley.**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL GRADO DE:

Maestro en Nutrición Humana

PRESENTA:

Ulisses Moreno Celis

DIRIGIDO POR:

Dra. Teresa García Gasca

SINODALES

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Presidente

M.C. María de Jesús Guerrero Carrillo
Secretario

Dr. Alejandro Blanco Labra
Sinodal

Dra. Adriana Jheny Rodríguez Méndez
Sinodal

M.C. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Sinodal

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

Br. Inégo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Enero 2014
México

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

Dedico el presente trabajo a las 4 personas más importantes en mi vida, mi familia:

A Consuelo, mi mamá, por su cariño y apoyo incondicional en todo lo que me propongo.

A Asunción, mi papá, mi gran ejemplo de fortaleza, responsabilidad y trabajo.

A Linda y Uriel, mis hermanos menores, quienes me motivan a ser mejor cada día.

Los Amo...

Sin una familia, el hombre, solo en el mundo, tiembla de frío. André Maurois

AGRADECIMIENTOS

Tantos vienen a la mente y tan poco espacio para poder plasmarlos:

- Al CONACyT por brindarme el apoyo económico para la realización del proyecto.
- A la UAQ por adoptarme como estudiante de Posgrado.
- Al Cuerpo Académico de la Maestría en Nutrición Humana en general por su gran apoyo durante la realización del presente trabajo.
- A la Dra. Teresa García Gasca “Tere” por confiar en mí, por brindarme su amistad, por ser tolerante y por su gran apoyo en todo momento, no podría describirlo ni en una Tesis completa.
- A Roberto Ferriz, Jefe, Maestro, Compañero y Amigo.
- Al grupo de trabajo del laboratorio del Dr. Alejandro Blanco y al Doctor en especial por brindarme su amistad.
- A la Dra. Jheny Adriana Rodríguez y a su grupo de trabajo
- A la Dra. Mary y Pao por su ayuda en la obtención de los resultados.
- A la Dra. Aracely Anaya Loyola y su equipo de trabajo.
- A Lorena Oropeza, Compañera, Roommate y gran Amiga.
- A Adriana Aguilar y su familia por brindarme su incondicional Amistad.
- A Vania por ser clave en mi decisión de mi estancia en Querétaro.
- A Jesica por ser mi amiga incondicional, porque nunca me dejo solo y a su familia por todo su apoyo y confianza.
- A Diana, Ana Laura, Héctor y sus familias, grandes amigos.
- A Joss por su gran apoyo y amistad en el laboratorio.
- A mi familia que aunque distante siempre al tanto de mí y de mis proyectos. En especial a mi tía Carmen y mi tío Ricardo.
- Todos los que en su momento fueron parte del Laboratorio de biología celular y molecular y por ende de mi vida.
- Al equipo de trabajo de Nutrición Humana.
- A todos mis compañeros del propedéutico 2011 que concursamos por un lugar dentro de la MNH.
- A mis compañeros de generación por su apoyo en todo momento.
- A Alex, Mario y Rolando Iwi y todos los de la MSPAS mis nuevos amigos.
- A los Directivos y administrativos de la FCN quienes siempre se portaron amables.
Y a todos los que han formado parte de mi vida en estos años de formación...
¡GRACIAS

Índice

	i
Índice de Tablas	iii
Índice de figuras	iii
Resumen	iv
Summary	v
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
2.1 Frijol Tépari	2
2.2 Lectinas	4
2.2.1 Algunas aplicaciones de las lectinas	9
2.3 Inhibidores de Proteasas	10
2.3.1 Propiedades de los IPs de Plantas	12
2.3.2 Aplicaciones de los IPs en Medicina	13
2.4 Estudios de Lectinas e Inhibidores de Proteasas de frijol tépari contra cáncer	14
2.4.1 Estudios de FCL e IP de frijol tépari <i>in vitro e in vivo</i>	15
2.5 Sistema Hematopoyético	17
2.5.1 Serie plaquetaria	20
2.5.2 Serie roja: eritropoyesis	21
2.5.3 Serie granulocítica: granulopoyesis	22
2.5.4 Células de la médula ósea	22
Plaquetas	24
2.5.6 Factores de crecimiento hematopoyéticos	25
III. Justificación	27
IV. Hipótesis	28
V. Objetivos	28
Objetivo General	28
Objetivos Específicos	28
VI. Materiales y Métodos	29
6.1 Diseño Experimental	29
6.2 Biometría Hemática	30
6.3 Análisis Histopatológico	30
6.4 Análisis de IL-6 y TNF α	31
6.5 Análisis Estadístico	31

VII. Resultados y discusión	
7.1 Crecimiento, alimentación y efectos adversos.	32
7.2 Biometría Hemática	34
7.2.1 Frotis Sanguíneo	38
7.3 Análisis histopatológico	38
7.4 Análisis de IL-6 y TNF α	41
IL-6	41
TNF α	41
VIII. Conclusiones	44
IX. Bibliografía	45

Índice de Cuadros

	Pág.
Cuadro 1. Lectinas y su afinidad por distintos Carbohidratos	5
Cuadro 2. Acción de las citosinas en la hematopoyesis	29
Cuadro 3. Frotis Sanguíneo	41

Índice de Figuras

Figura 1. Frijol Tépari (<i>Phaseolus acutifolius</i>)	3
Figura 2. Distribución geográfica del cultivo de <i>P acutifolius</i>	4
Figura 3. Esquema general de la diferenciación del sistema hematopoyético	19
Figura 4. Micrografía de un megacarioblastos	21
Figura 5. Micrografía de un eritoblasto	21
Figura 6. Micrografía de un mieloblasto	22
Figura 7. Micrografía de eritrocitos inmaduros	23
Figura 8. Peso corporal de las Ratas	33
Figura 9. Consumo de alimento	33
Figura 10. Conteo de glóbulos blancos	35
Figura 11. Conteo de Linfocitos	35
Figura 12. Conteo de Granulocitos	36
Figura 13. Porcentaje de Linfocitos	36
Figura 14. Proporción de Linfocitos (%L) y Granulocitos (%G)	37
Figura 15. Diferencias poblacionales leucocitarias	39
Figura 16. Agregación Plaquetaria	39
Figura 17. Micrografías de Timo	39
Figura 18. Micrografías de Bazo	40
Figura 19. Micrografías de Medula ósea	40
Figura 20. Efecto de LIP-60 sobre IL-6	42
Figura 21. Efecto de LIP-60 sobre TNF- α	43

Resumen

El frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) es una leguminosa rica en proteínas, algunas de las cuales han sido descritas como factores antinutricios. Dentro de éstos se encuentran las lectinas y los inhibidores de proteasas (IP), de los cuales se han estudiado sus efectos anticancerígenos en sistemas *in vitro* e *in vivo*. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de un extracto de lectinas-IP de frijol Tépari obtenido mediante precipitación secuencial con sulfato de amonio al 40 y 60% (LIP-60) sobre células del sistema hematopoyético, a fin de evaluar sus posibles efectos farmacológicos. Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos y hembras de 3 semanas de edad, tratadas con LIP-60 (100 mg/kg de peso corporal). Las ratas se alimentaron e hidrataron *ad libitum* durante 30 días, al cabo de los cuales, se les administraron vía intragástrica 0.5 mL de solución salina (0.9% de NaCl) al grupo control y 0.5 mL de LIP-60 diluido en solución salina al grupo tratado. Durante este periodo se obtuvieron muestras de sangre de cola, de los días 0, 1, 3, 9, 14, 19, 24 y 30 para determinar los valores de biometría hemática (BH), así como IL-6 y TNF- α séricos. Al día 30 se realizó el sacrificio y se extrajo bazo, timo y médula ósea de fémur, a los que se les realizó análisis histopatológico mediante tinción con Hematoxilina-Eosina. Los resultados mostraron disminución de peso corporal y del consumo de alimento del grupo tratado respecto al control, lo cual corresponde con los efectos antinutricios propios de las lectinas e inhibidores de proteasas. La BH mostró disminución de linfocitos y aumento de granulocitos, lo que sugiere respuesta inmune tipo alérgica. Los análisis histopatológicos mostraron disminución de la pulpa blanca en bazo, lo cual sugiere un aumento en la liberación de leucocitos maduros para combatir un proceso infeccioso o alérgico, en médula ósea se observó un aumento en la celularidad blástica en general lo cual concuerda con los valores circulantes de células blancas diferenciadas, mientras que en timo no se encontró diferencia significativa respecto al control. Los niveles de IL-6 y TNF- α no mostraron diferencias significativas respecto al control, sin embargo, se observó una tendencia a disminuir con el tratamiento. Los resultados obtenidos sugieren que LIP-60 provoca respuesta del sistema inmunológico tipo alérgica.

Palabras clave: Frijol Tépari, inhibidores de proteasas, lectinas, *Phaseolus acutifolius*, respuesta inmune, sistema hematopoyético.

Summary

Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) is a legume rich in protein, some of which have been described as antinutritional factors. Among these are lectins and protease inhibitors (PIs) of which we have studied its anticancer effects in *in vitro* and *in vivo* systems. The aim of this study was to determine the effect of an extract of lectin-IP from Tepary bean (LIP-60) obtained by sequential ammonium sulfate precipitation at 40 and 60% on the hematopoietic system, in order to assess their potential pharmacological effects. Sprague Dawley male and female 3-week-old rats were treated with LIP-60 (100 mg/kg body weight). The rats were fed *ad libitum* and hydrated for 30 days where 0.5 mL saline solution (0.9% NaCl) was intragastrically administered to the control group and 0.5 mL of LIP-60 diluted in saline solution was administered to the treated group. During this period, blood samples from tail were obtained on days 0, 1, 3, 9, 14, 19, 24 and 30 to determine the values of cell blood count (CBC), as well as IL-6 and TNF- α . By day 30 the sacrifice was performed and the spleen, thymus and femur bone marrow were extracted and studied by histopathological analysis after hematoxylin-eosin staining. The results showed a decreased in body weight and food consumption of treated group compared to the control group, corresponding with the antinutritional effects of lectins and protease inhibitors. The CBC showed decreased lymphocytes and granulocytes increment, suggesting allergic-type immune response. Histopathological analysis showed decreased spleen white pulp which suggests an increase in the release of mature leukocytes to combat an infectious or allergic process, an increase in bone marrow blastic cellularity, which is consistent with the current observed values of differentiated white blood cells, whereas thymus showed no significant difference respect to control. The levels of IL-6 and TNF- α were not significantly different with respect to the control, however, a downward trend was observed with treatment. The results suggest that LIP-60 causes allergenic-type immune response.

Key words: Lectins, hematopoietic system, immune response, protease inhibitors, *Phaseolus acutifolius*, Tepary bean.

I. Introducción

El frijol Tépari se utiliza como alimento dentro de la dieta de algunas regiones del norte de México y sur de EU. Es rico en proteínas, aunque su resistencia a la cocción, sus efectos antinutricios así como la importación local de otras variedades de frijol reducen el consumo de éste, poniéndolo en desventaja y subutilizando su contenido proteico (Osman y col., 2003, SAGARPA 2005). Actualmente esta variedad de frijol se estudia por la importancia de dos de sus componentes bioactivos, las lectinas y los inhibidores de proteasas (IP) los cuales actualmente se sabe que tienen efectos sobre diversos procesos celulares relacionados con cáncer. El IP es capaz de provocar aumento de la adhesión celular y disminución de la invasión de las células cancerígenas, mientras que las lectinas causan la muerte celular por inducción de apoptosis de forma diferencial (García-Gasca y col., 2012, Ferriz-Martínez datos no publicados).

Actualmente se estudian los efectos tóxicos de un extracto de lectinas e inhibidores de proteasas en proporciones naturales, así como sus efectos en cáncer. Por lo anterior, el presente trabajo se centra en la evaluación del efecto de dicha fracción sobre el sistema hematopoyético ya que éste se ve afectado en la mayoría de las terapias para combatir el cáncer debido a su acelerado recambio celular.

II. Antecedentes

2.1 Frijol Tépari

En México, el frijol es un producto valioso en el desarrollo rural del país debido a que, en conjunto con el maíz, representa toda una tradición productiva y de consumo a nivel alimentario, socioeconómico y cultural. Su representación a lo largo de la historia de México lo ha convertido no sólo en un alimento tradicional, sino también en un elemento de identificación nacional, comparable con otros productos como el maíz y el chile que son básicos para explicar la dieta prehispánica, colonial, actual y muy probablemente del futuro. Se considera que en total existe un aproximado de 150 especies de esta leguminosa, aunque en México sólo existen 50 diferentes especies, destacando cuatro domésticas como *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus coccineus* L. (frijol ayocote), *Phaseolus lunatus* L. (frijol comba) y *Phaseolus acutifolius* Gray (frijol Tépari). En nuestro país las especies más importantes en cuanto a superficie sembrada y producción son las dos primeras (SAGARPA, 2005).

Actualmente las variedades más comunes de frijol y las regiones donde se siembran son Blanco 157 (Bajío), Canocel (Bajío), Pinto 133 y Durango 225 (Bajío y regiones semiáridas), Durango 664 (Durango, Zacatecas y Chihuahua), Durango 222 (Regiones semiáridas), Canario 72 (Sinaloa, Nayarit, Jalisco y Bajío), Ojo de Cabra 73 (Chihuahua, Zacatecas, Durango), Río Grande (Durango y Zacatecas), Bayo Calera (Zacatecas), Bayo Durango (Durango, Chihuahua, Zacatecas, Aguascalientes), Negro Perla, Bayo Macentral, Flor de Mayo M38, Flor de Junio Marcela, Flor de Mayo RMC, Flor de Mayo Bajío, Negro 150, Bayo INIFAP, Negro 8025, Flor de Durazno; éstas para zonas con clima templado subhúmedo. Pinto Mestizo, Pinto Bayacora, Negro Altiplano, Negro Sahuatoba, Pinto Villa, Bayo Victoria, Negro Durango, Negro Querétaro, Negro San Luis, (Altiplano Semiárido) (SAGARPA, 2005).

Phaseolus acutifolius (Figura 1) es nativo del desierto de Sonora en Norteamérica y es notable en el fenotipo de resistencia a la sequía. Esta planta también posee un ciclo de producción muy corto y es más tolerante al calor que el frijol común y a la sequía, representando una importante alternativa para el uso de terrenos áridos o semiáridos. Produce semillas con proteínas de alta calidad adecuadas para el consumo humano y con el uso de marcadores moleculares se busca el mejoramiento del frijol común para que pueda ganar tolerancia a los ambientes secos. Por tal motivo el frijol Tépari ésta cobrando importancia en la agricultura (Rosas y col., 1991; Cruz y col., 2013).



Figura 1. Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*)

P. acutifolius crece de forma silvestre en algunas regiones áridas y semiáridas del suroeste de Estados Unidos desde la parte central del estado de Arizona (EUA) hasta el sur de Nicaragua y se ha logrado encontrar en algunas regiones de África (Figura 2). Su potencial cultivo en áreas desérticas es extenso debido a su resistencia a la sequía, al calor y a su adaptabilidad a altas concentraciones salinas del suelo (Facility Global Biodiversity Information, 2002).

El frijol Tépari se utiliza como alimento dentro de la dieta de algunas regiones del norte de México y sur de EU. Es rico en proteínas, aunque su resistencia a la cocción, sus efectos antinutricios y la importación local de otras variedades de frijol reducen el consumo de éste, poniéndolo en desventaja y subutilizando su contenido proteico (Osman y col., 2003; SAGARPA 2005).



Figura 2. Distribución geográfica del cultivo de *P. acutifolius*. Se muestran en amarillo las zonas de cultivo de frjol Tépari (Facility Global biodiversity information. 2002)

Entre los factores antinutricios del Tépari se encuentran las lectinas y los IP. Estas proteínas participan en los sistemas de defensa de la planta que al ser liberadas en el tracto digestivo del predador, interactúan con receptores endógenos a través de su actividad de unión a carbohidratos provocando efectos dañinos, como malestar estomacal y disminución de la absorción de nutrientes, para el caso de las lectinas; o inhibiendo proteasas digestivas en el caso de los IP evitando la asimilación de nutrientes (Castro-Guillén y col., 2012; Ferriz-Martínez y col., 2010).

2.2 Lectinas

El termino Lectinas se aplica a proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que comparten la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas. Estas proteínas usualmente tienen al menos dos sitios de unión por molécula. Como característica particular tienden a aglutinar a las células a las cuales se unen. La capacidad de estas proteínas para interactuar con células de respuesta inmune les confiere efectos inmunosupresores. También pueden ser tóxicas, inhibiendo el crecimiento de células tumorales y participan en la adhesión celular.

Todas las actividades biológicas reportadas para las lectinas tienen en común el reconocimiento de un receptor oligosacárido (Castillo-Villanueva y Abdullaev 2005).

En los vegetales, la mayoría de las lectinas se encuentran en órganos de reserva, lo cual es una evidencia indirecta de su papel como proteínas de respuesta a estrés o defensa (Mendoza y col., 2007). Una gran diversidad de lectinas han sido aisladas y caracterizadas de diferentes especies vegetales y/o animales. Estos estudios han permitido identificar que existe una gran similitud estructural entre las lectinas de una misma familia. En algunos casos se ha demostrado que las lectinas son capaces de reconocer carbohidratos en una determinada configuración o secuencia de carbohidratos es decir, que las características de especificidad por estructuras sacarídicas también está altamente conservada entre proteínas de una misma especie (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005). En el Cuadro 1 se muestran las principales lectinas y la especificidad a residuos de carbohidratos o secuencias de oligosacáridos (Aldana-Marcos, 2006). De acuerdo con su distribución natural, las lectinas pueden clasificarse como:

a) Lectinas animales. Se han encontrado en la hemolinfa y órganos sexuales de animales invertebrados como caracoles, cangrejos, camarones, moluscos, peces y lombrices, y también en animales vertebrados como el cerdo (Sharon y Lis 2004). Las galectinas, que constituyen una familia de proteínas extremadamente conservadas a través de la evolución. Investigaciones recientes han mostrado que estas proteínas juegan un papel fundamental en procesos relacionados con la regulación de la respuesta inmune tales como adhesión linfocitaria, crecimiento celular, producción de citocinas y regulación de la muerte celular programada (Rabinovich y Rubinstein 2001). En diversas especies animales se han reportado evidencias de que las lectinas participan en fenómenos tales como el reconocimiento y eliminación de glicoproteínas, tanto del sistema circulatorio como de células envejecidas y microorganismos mediante el proceso de opsonización y la participación de células con actividad fagocítica (Sharon y Lis 2004).

Cuadro 1. Lectinas y su afinidad por distintos carbohidratos (Hernández Díaz y col., 1999)

Nombre común	Acrónimo	Preferencias de unión a residuos de azúcares o secuencias de oligosacáridos
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	Terminal FP ^a >GalNAc α 1,3GalNAc>GalNAc α 1,3Gal
<i>Glycine maxims</i>	SBA	Terminal α , β GalNAc>-, β Gal
<i>Vicia villosa</i>	VVA	Terminal GalNAc α 1,3Gal>GalNAc α 1,6Gal=GalNAc-serina
<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSL-I	Terminal β Gal
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	Terminal Gal α 1,3GalNAc
<i>Ricinus communis</i>	RCA-I	Gal α 1,4GlcNAc β Gal> β Gal
<i>Sophora japónica</i>	SJA	Terminal Gal α 1,3GalNAc>Gal α 1,3GlcNAc> α , β GalNAc> α , β Gal
<i>Artocarpus integrifolia</i>	JAC	Terminal Gal α 1,3GalNAc>GalNAc α 1,6Gal tanto en la forma mono como disialatada.
<i>Erythrina cristagalli</i>	ECL	Oligosacáridos triantenarios o tetraantenarios conteniendo tres o cuatro ramificaciones de N-acetilactosamina respectivamente
<i>Phaseolus vulgariserythroagglutinin</i>	PHA-E	Complejos bi- o tri-antenarios unidos en forma N (bisected)
<i>Phaseolus vulgarisleukoagglutinin</i>	PHA-L	Secuencias complejas muy ramificadas (triantenarias o más) (non-bisected)
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	GlcNAc(β 1,4GlcNAc) ₁₋₂ > β 1,4GlcNAc>NeuAc
<i>Succinyl WGA</i>	S-WGA	GlcNAc(β 1,4GlcNAc) ₁₋₂
<i>Griffonia (Bandeiraea simplicifolia)</i>	GSL-II	Terminal α , β GlcNAc, glucógeno
<i>Solanum tuberosum</i>	STL	poli-N-acetilactosamina
<i>Lycopersicum esculentum</i>	LEL	Oligosacáridos conteniendo poli-N-acetilactosamina
<i>Datura stramonium</i>	DSL	Gal α 1,4GlcNAc(N-acetilactosamina)>GlcNAc
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con-A	β Man> β Glc
<i>Lens culinaris</i>	LCA	región fucosilada del núcleo de oligosacáridos bi o triantenarios unidos en forma N-glicosídica
<i>Pisum sativum</i>	PSA	Igual que LCA
<i>Galanthus nivalis</i>	GNA	Man α 1,3Man>Man α 1,6Man>Man α 1,2Man
<i>Ulex europaeus</i>	UEA-I	L-Fuc α 1,2Gal α 1,4GlcNAcB1,6
<i>Aleuria aurantia</i>	AAA	L-Fuc
<i>Maackia amurensis</i>	MAA	NeuAc α 2,3GalB1,4GlcNAc
<i>Sambucus nigra</i>	SNA	NeuAc α 2,6Gal=NeuAc α 2,6GalNAc

b) Lectinas microbianas. Existe un tipo de lectinas que se localiza en la superficie de microorganismos tales como bacterias, virus, hongos y parásitos y se les denomina adhesinas. Juegan un papel importante al colonizar mucosas produciendo lesiones tisulares (Hernandez-Cruz, 2005).

c) Lectinas vegetales. Se encuentran específicamente en los cotiledones y endospermos de las semillas de algunos vegetales como el trigo, frijol, soya, entre otros. Entre las lectinas vegetales mejor conocidas están (Micucci y Camps, 1987):

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

Las lectinas vegetales participan en las interacciones entre las bacterias fijadoras de nitrógeno con la raíz de plantas de leguminosas, además poseen actividad mitogénica y pueden tener efectos protectores en contra de la acción patogénica de algunos organismos simples como los nematodos herbívoros. Así mismo, se utilizan para reconocer específicamente carbohidratos por interacciones de puentes de hidrógeno, iones, interacciones hidrofóbicas entre otras (Benevides y col., 2012). Las lectinas vegetales han sido objeto de otras clasificaciones en función de su especificidad hacia el monosacárido que inhibe su actividad hemaglutinante y hacia las estructuras de oligosacáridos que reconocen (Micucci y Camps 1987; Hernandez-Cruz, 2005).

2.2.1 Aplicaciones de las lectinas

Las lectinas se consideran armas valiosas en el campo de la genética, la biomedicina y la inmunología. Su utilidad está basada en la propiedad que tienen de combinarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en las superficies celulares y fluidos corporales. Sus propiedades mitogénicas permiten que se utilicen en estudios que tienen como base la proliferación de linfocitos en cultivos, como son (Hernández-Díaz y col., 1999):

- La evaluación de la producción de citoquinas (interferón e interleucinas) y la expresión de sus receptores en sobrenadantes de cultivos de linfocitos provenientes de pacientes con enfermedades de alto impacto social como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la tuberculosis y la leishmaniasis, entre otras.
- La caracterización de algunos aspectos relacionados con la respuesta inmune y fenómenos asociados con ellas como la inmunosupresión.
- La interacción entre virus, como por ejemplo entre el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis B, así como la susceptibilidad y resistencia a éstos.
- Evaluación de la efectividad de terapias antirretrovirales de acuerdo con la respuesta de los linfocitos a la estimulación con las lectinas antes y después de la terapia, como por ejemplo en terapias contra el VIH.
- Análisis de funciones linfoproliferativas y citotóxicas en células mononucleares causadas por algunas drogas.
- Estudios acerca de la influencia nutricional en la proliferación de linfocitos y su cinética de proliferación.
- La inducción de genes en linfocitos.
- La detección de anormalidades cromosómicas
- La detección y tratamiento de ciertos tipos de cáncer.

2.3 Inhibidores de proteasas

No se puede iniciar a hablar de los inhibidores de proteasas sin hablar antes de las enzimas proteolíticas, las cuales tienen la capacidad de catalizar la ruptura de los enlaces peptídicos en las proteínas. Están involucradas en diversos aspectos fisiológicos y del desarrollo de los seres vivos que incluyen desde la movilización de las proteínas de almacenamiento durante la germinación de las semillas hasta la iniciación de la muerte celular y los programas de senescencia (Schaller, 2004).

Su acción se puede dividir en dos categorías: proteólisis limitada y proteólisis ilimitada. En la proteólisis limitada, por ejemplo en el caso de las plantas, la proteasa es capaz de romper sólo uno o un número restringido de enlaces peptídicos necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las funciones principales de esta proteólisis son la maduración de enzimas, el ensamblaje de proteínas, la modificación postraduccional de proteínas en sitios específicos y el control de la actividad de enzimas, proteínas reguladoras y péptidos (De Leo y col., 2002).

Por otro lado, la proteólisis ilimitada se caracteriza principalmente por degradar proteínas en sus unidades funcionales, aminoácidos, relacionada con otros procesos y moléculas como el caso de la ubiquitinación de proteínas de desecho. Otra vía es la compartimentalización de las proteínas y péptidos en los lisosomas, donde sufren una rápida hidrólisis por acción de las proteasas. La proteólisis ilimitada se necesita para la degradación de proteínas dañadas, mal plegadas y potencialmente nocivas para el organismo, proporcionando los aminoácidos para la síntesis de novo o proporcionar energía en algunos casos. La ruptura selectiva de proteínas reguladoras por la vía ubiquitina/proteasa controla aspectos claves del crecimiento, desarrollo y defensa de plantas y animales (Fan y Wu 2005).

Las proteasas se pueden clasificar según sus mecanismos catalíticos en cinco diferentes tipos: serín, cisteín, aspártico (o glutámico), treonin y metaloproteasas. Las primeras cuatro clases reciben su nombre de acuerdo con los aminoácidos

principales que conforman su sitio catalítico. y las metaloproteasas, como su nombre lo indica, requieren iones metálicos para lograr su actividad (Caffini y col., 1988). Actualmente se conocen también la treonín y la glutámico proteasas que utilizan treonina y ácido glutámico, respectivamente, para formar la llamada tríada catalítica (Rawlings y col., 2008)

Los inhibidores de proteasas (IP) son proteínas pequeñas, divididas en más de 60 familias según la identidad de las secuencias de aminoácidos o el tipo de proteasa con la cual interactúan: serín, cisteín, aspártico, metalo, glutámico y treonín proteasa (Rawlings y col., 2004; Rawlings, 2010). Estas familias se clasificaron en 38 clanes según comparaciones de estructura terciaria (Rawlings, 2010). Los IP se encuentran presentes en plantas, animales y microorganismos. En las plantas los IP representan una forma de proteína de almacenamiento (García-Gasca y col., 2002) o están involucrados en los mecanismos de defensa contra plagas y enfermedades (Ryan y Pearce 1998; Chaudhary y col., 2008). Además de sus funciones biológicas naturales y sus características funcionales, actualmente se estudian y utilizan para el tratamiento de patologías relacionadas con la coagulación sanguínea, hemorragias, inflamación y cáncer (García-Gasca y col., 2002).

Los IP forman enlaces reversibles proteína-proteína con proteasas animales y de algunas plantas, causando la inhibición de sus funciones. Cuentan con un sitio reactivo que es la parte de la molécula del inhibidor que entra en contacto directo con el centro activo de la proteasa afín para la formación de un complejo denominado inhibidor-proteasa (Laskowski y Kato, 1980). En el complejo estable enzima-inhibidor, el centro reactivo del inhibidor permanece intacto. Aunque el contacto ocurre en una pequeña porción de la enzima y el inhibidor, el ajuste es excelente con la formación de numerosas interacciones de Van der Waals y enlaces hidrofóbicos, por esto la conformación de residuos alrededor del enlace peptídico del centro reactivo es similar a la de un sustrato óptimo. El inhibidor actúa como un sustrato natural para la enzima, pero inhibe el mecanismo de ruptura del enlace peptídico con la disociación del producto (Vivanco y Cosio

2005). De acuerdo con Rawlings y col. (2004) y Fan y Wu (2005) los inhibidores de proteasas pueden caracterizarse por:

- En el complejo enzima-inhibidor todas las actividades enzimáticas hacia todos los sustratos se anulan completamente.
- La inhibición es competitiva.
- El centro reactivo de un inhibidor particular determina su especificidad.
- La especificidad de inhibición es altamente variable
- Los inhibidores mantienen su actividad a pesar del reemplazo del residuo P1 del centro reactivo.

2.3.1 Propiedades de los IPs de Plantas

En general, los IPs de plantas presentan una masa molecular entre 4 a 85 kDa, pero la mayoría se encuentran en el rango de 8 a 20 kDa. Estos inhibidores tienen usualmente un alto contenido de residuos de cisteína con los cuales forman puentes disulfuro (Hartl y col., 2011), lo cual los hace una estructura compacta y resistente al calor, a pH extremo y a la proteólisis (Fan y Wu 2005). La presencia de secuencias polipeptídicas anexas en los inhibidores conocidos recientemente indica que estas secuencias pudieran ser péptidos señal, utilizados en procesos de transporte de los inhibidores del citoplasma a los compartimentos de las vacuolas celulares (Nelson y Ryan, 1980).

Los IPs de las semillas actúan como una forma de almacenamiento de proteínas que no son digeridas hasta ser requeridos durante la germinación. Esto se logra ya que la mayoría de inhibidores son particularmente resistentes a calor, a pH extremo y a enzimas proteolíticas (Fan y Wu, 2005). Además, el alto contenido de cisteínas de muchos IP de plantas podría señalarlos como depósitos de azufre. Los inhibidores de serín proteasas se acumulan durante la maduración de las semillas, facilitando el almacenamiento de las proteínas de reserva debido a que disminuyen la actividad de las proteasas. Este proceso también es un indicador de

su función de defensa, dado que la integridad de estos órganos es esencial para la supervivencia de las especies (Hartl y col., 2011).

2.3.2 Aplicaciones de los IP

Se han realizado varios estudios, en los que se ha comprobado el papel insecticida de los inhibidores de proteasas. Inicialmente, se estudiaron los provenientes de la soya y de la papa en ensayos *in vivo* a través de dietas artificiales o plantas transgénicas que expresen estos inhibidores. También se han llevado a cabo pruebas *in vitro* con el uso de proteasas de los extractos digestivos de organismos patógenos y con microorganismos como hongos, nemátodos, virus y bacterias. Por medio de la transferencia de genes que codifican estos inhibidores se han creado plantas transgénicas como por ejemplo de tabaco. Varias de estas plantas han mostrado un grado de resistencia a un amplio rango de plagas de insectos y otros patógenos (Carrillo, 2009).

En biotecnología, se aplican estas biomoléculas en procesos industriales para obtener proteínas naturales, recombinantes o modificadas las cuales requieren cada vez más de la presencia de inhibidores de proteasas durante los procesos de producción, purificación y aplicación. Garantizan altos rendimientos e incrementan la estabilidad operacional y de conservación de las proteínas de interés. En farmacología se han aplicado inhibidores de proteasas en el diagnóstico o terapéutica del cáncer, enfermedades cardiovasculares, respiratorias, infecciosas como el VIH, así como desórdenes neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer. Estos son ejemplos en los que se ha probado su eficacia o las potencialidades de los inhibidores de proteasas como herramientas terapéuticas (Pascual, 2005; García y col., 2009).

2.4 Estudios del efecto de Lectinas e inhibidores de proteasas de frijol Tépari contra cáncer.

Diversos estudios muestran el efecto citotóxico de las lectinas vegetales sobre células cancerígenas mediante su alta especificidad por carbohidratos de las

membranas celulares (Ferriz-Martinez y col., 2010). El anclaje de lectinas a los ligandos de la superficie celular inicia la internalización de las lectinas a la célula lo cual a veces lleva a la muerte celular por medio de la inactivación ribosomal o encendiendo cascadas de señalización que conducen a la apoptosis (Ashraf y Khan, 2003). Es necesario señalar que la acción de las lectinas varía desde la especificidad de unión a azúcares hasta el mecanismo de acción a nivel molecular. La especificidad sobre las diferentes líneas celulares tumorales podría reflejar distintas vías de progresión de estas últimas (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005). Entre los posibles mecanismos de acción de las lectinas están los siguientes tres (Bilyy y Stoika 2003; Choi y col., 2004; Ferriz-Martinez y col., 2010):

1. Unión a linfocitos
2. Liberación de citocinas en la sangre.
3. Activación y liberación de linfocitos del bazo en la circulación.
4. Activación de células NK y macrófagos.
5. Producción de antiangiogénicos, dando como resultado una escasa vascularización y estancamiento de suministros de oxígeno.
6. Combinación de hiperplasia intestinal y efecto antiangiogénico reduciendo la disponibilidad de nutrientes para el tumor.
7. Efecto citotóxico sobre las células tumorales. Se proponen diferentes mecanismos de acción: 1) La unión de lectinas a moléculas de adhesión de la superficie (epCAM) que participan en una gran variedad de señales de transducción importantes para la regulación celular. 2) Un segundo mecanismo sugiere que la lectina se internaliza en la célula y afecta el proceso celular fundamental para la división celular.
8. Inducción de apoptosis por diversas vías: 1) Dependiente de la activación intracelular de la caspasa 8/FLICE requiriendo la internalización de la lectina e involucra su actividad inhibitoria ribosomal y de la síntesis de proteínas. 2) A través de la activación de la caspasa-3 y la ruptura de PARP.46 3) Por la activación de Bax (acelerador de apoptosis) y la inhibición tanto de Bcl-2 (supresor de apoptosis) como de la telomerasa.

Las semillas del frijol Tépari, son ricas en lectinas (Kabbara y col., 1987) y estudios previos han demostrado que las lectinas de diferentes fuentes y a diferentes concentraciones inhiben el crecimiento de células cancerígenas e inducen apoptosis (Castañeda Cuevas y col., 2007; González de Mejía y Prisecaru, 2005). Por otro lado, los inhibidores de proteasas son proteínas con gran afinidad por enzimas proteolíticas y reducen o inhiben parcial o totalmente su actividad. Algunos estudios han mostrado que estas proteínas presentan efectos antinutricios, antiproliferativos y antitumorales (García-Gasca y col., 2002; 2012; Nishimura y col., 2004).

2.4.1 Estudios de FCL e IP de frijol tépari *in vitro* e *in vivo*

Hoy en día existe evidencia de que las lectinas tienen efecto mitogénico dado por la especificidad de éstas para reconocer y aglutinar tanto eritrocitos como leucocitos, promoviendo la proliferación de estos últimos (Mayani y col., 2007). Actualmente se sabe que lectinas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) inducen la proliferación de células linfoides del sistema hematopoyético, así como la activación de linfocitos presentadores Th1 en pacientes a los cuales se les administran lectinas de muérdago tailandés (VCA) (Choi y col., 2004).

Las lectinas de frijol Tépari separadas por precipitación con sulfato de amonio y por cromatografía de afinidad no muestran efectos aglutinantes sobre un tipo de sangre en específico y resultan tener menor actividad mitogénica que lectinas de frijol común y de muérdago tailandes, pero muestran una diferencia selectiva, aunque no significativa, en diversas clonas de fibroblastos de ratón 3T3 (T4, N5 y J20) a diversas concentraciones (Valadez-Vega y col., 2011a). Esta fracción fue probada en células de adenocarcinoma de colon (SW 480) y células de carcinoma epitelial de Cervical (C33-A) siendo más efectiva en las células de cáncer de colon (Valadez-Vega y col., 2011b).

Por otro lado, lectinas obtenidas por cromatografía de exclusión de peso molecular ejercen efecto citotóxico diferencial sobre fibroblastos transformados de ratón

(3T3/v-mos) respecto a a su contraparte normal. Por su parte, el IP tipo Bowman-Birk de frijo Tépari provoca disminución de la capacidad invasiva *in vitro* y aumento de la adhesión (García-Gasca y col., 2002 y 2012). Esta misma fracción de lectinas (FCL) presenta actividad citotóxica en células de diversos tipos de cáncer, siendo más efectivas sobre cáncer de colon, y haciendo un comparativo de células no transformadas (IEC-18) con células de cáncer de colon (Caco 2) se encontró que la FCL fue casi 4 veces más tóxica sobre las células de cáncer, lo cual sugiere un efecto citotóxico diferencial (López-Sánchez y col., 2010, Garcia-Gasca y col., 2012).

En estudios *in vivo* se observó que una dosis de 50mg de FCL/kg de peso corporal de las ratas presentó pocos efectos adversos (López-Sánchez y col., 2009) y se utilizó esta dosis en estudios contra cáncer de colon donde se encontró disminución de la incidencia de tumores y de lesiones pre-cancerígenas en ratas Sprague Dawley con cáncer inducido químicamente (Ferriz-Martínez, datos no publicados).

Debido a que hasta ahora se han evaluado los efectos del IP y de FCL por separado, se ha propuesto evaluar los efectos toxicológicos de una fracción de Lectinas e IP de frijol Tépari (LIP-60) en proporciones naturales. Se ha observado que una dosis de 100 mg de LIP-60/kg de peso (dosis ajustado por unidades de aglutinación a la dosis de FCL) los efectos tóxicos son menores que los que presenta la FCL en ratas Sprague Dawley (Noriega, datos no publicados).

2.5 Sistema hematopoyético

La hematopoyesis comprende la formación, el desarrollo y la especialización de todas las células sanguíneas funcionales. Los sitios de hematopoyesis cambian varias veces desde el embrión al feto y hasta el adulto. En general se conocen tres fases: mesoblástica, hepática y medular o mieloide. Todas las células sanguíneas provienen de una célula madre hematopoyética (CMH). La localización anatómica del sistema hematopoyético cambia a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal. Hoy día se piensa que este proceso se inicia durante la embriogénesis, a partir de células mesodérmicas. Iniciando el segundo trimestre de la gestación, las CMH migran del saco vitelino al hígado y a continuación al bazo, siendo estos los principales órganos hematopoyéticos durante todo este trimestre. A partir del quinto mes de gestación aparece la hematopoyesis en la médula ósea (MO), reemplazando a las células anteriores. Al momento de nacer, la hematopoyesis esplénica y hepática ha desaparecido, aunque durante los primeros años de vida pueden reaparecer frente a condiciones de demanda aumentada de células sanguíneas. El tejido hematopoyético, que al nacer ocupa prácticamente todo el tejido óseo, disminuye gradualmente con el desarrollo hasta que en el adulto normal se localiza solamente en los huesos planos como vértebras, esternón, costillas y pelvis. Las células sanguíneas del adulto se forman, con la excepción de los linfocitos, exclusivamente en la MO (Rodak, 2005a, 2005b).

Como ocurre con el resto de células madre totipotenciales, dos rasgos principales caracterizan a las CMH. El primero es que tienen células con capacidad de dividirse de forma asimétrica, dando lugar a una célula que conserva su carácter multipotencial y a una célula comprometida. En segundo lugar, y en contraste con una célula unipotente que se diferencia sólo en un tipo celular, una CMH es multipotente y por consiguiente, capaz de generar los distintos tipos de células hemáticas maduras: eritrocitos, granulocitos, monocitos, se diferencia a una célula progenitora linfoide común o una célula progenitora mieloide común. Las células progenitoras linfoides dan lugar a células B y T; mientras que las células progenitoras mieloides generan de glóbulos rojos (eritrocitos),

megacariocitos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) y monocitos. El compromiso hacia una u otra vía depende de la expresión de distintos grupos de genes determinantes y específicos de linaje en los tiempos apropiados y en el orden correcto. Diariamente millones de células sanguíneas maduras, principalmente eritrocitos y granulocitos, mueren y son eliminadas de la circulación. Un número equivalente de células jóvenes alcanza la sangre periférica de manera que se compensa la pérdida. La hematopoyesis hace referencia a este proceso continuo de producción de células hemáticas y se conoce el mecanismo responsable del crecimiento y diferenciación de las células hematológicas. El sistema hematopoyético permite la reposición continua de estas células y la respuesta a situaciones de estrés o aumento de demanda. De acuerdo con Orellana y Gutierrez (2004) éste tejido está formado por:

- Células precursoras multipotentes.
- Células precursoras comprometidas (en la producción de células de una línea hematológica determinada)
- Células diferenciadas o maduras.

La función principal de la médula ósea es la producción de células sanguíneas diferenciadas. Éstas derivan de células troncales multipotenciales con capacidad de renovación, capaces de diferenciarse. Esta última capacidad lleva a la producción de células unipotenciales dando origen a las líneas celulares eritropoyética, granulopoyética y trombopoyética. Las células unipotenciales están en una etapa activa del ciclo celular, con capacidad de autorrenovarse y proliferar por tiempo prolongado. Sin embargo, estas células necesitan del estímulo humoral de ciertas sustancias con capacidad hematopoyética. La mejor conocida de estas es la eritropoyetina, que es elaborada por el riñón en respuesta a la hipoxemia y que estimula la producción de eritrocitos. También se conoce la existencia de leuco y trombopoyetinas (Orellana y Gutiérrez, 2004). El desarrollo y maduración celular sucede en localizaciones anatómicas concretas, los elementos maduros y, en menor medida, los inmaduros circulan juntos por la sangre periférica (SP) (Figura 3).

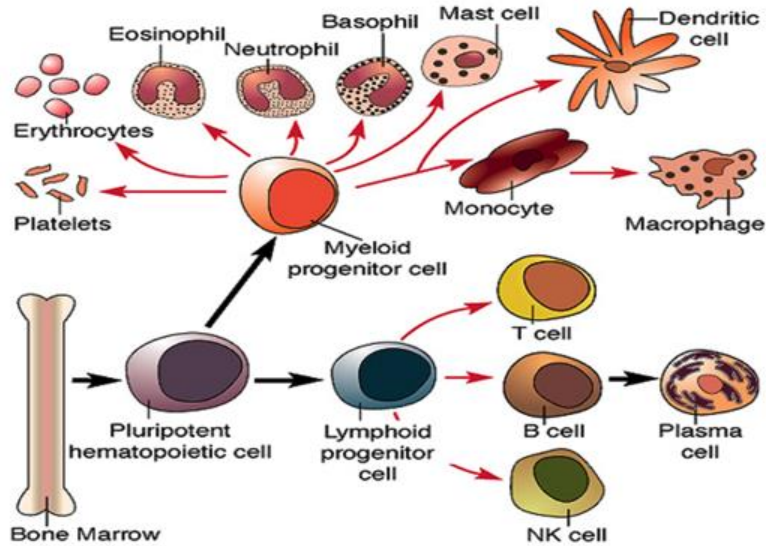


Figura 3. Esquema general de la diferenciación del sistema hematopoyético (Rollins, 2009)

El funcionamiento correcto de los diversos tipos celulares del sistema hematopoyético asegura la producción de las células responsables del transporte de oxígeno, la coagulación sanguínea y la inmunidad. Se organiza como una jerarquía en la que las relaciones entre los diferentes tipos celulares se basan en la capacidad de proliferación y de diferenciación celular. El funcionamiento normal de la hematopoyesis resulta de la interacción entre mecanismos intracelulares y la influencia del microambiente donde se desarrollan las células hematopoyéticas. Los estadios intermedios de desarrollo celular entre las células madre y las células hematopoyéticas maduras están constituidos por células que han sufrido restricciones en la capacidad de diferenciación, pero todavía no han adquirido los cambios morfológicos típicos de las células hemáticas maduras: Se trata de los progenitores comprometidos (es decir, los progenitores comprometidos han sufrido cierta diferenciación hacia un tipo celular concreto, pero todavía no son células maduras). Las CMH son las únicas capaces de regenerar el sistema hematopoyético del receptor de un trasplante (Orellana y Gutiérrez, 2004).

Las células más maduras de los diferentes linajes mieloides (eritrocitos, polimorfonucleares, monocitos y megacariocitos) se reconocen fácilmente gracias a sus características morfológicas. Suponen el estadio final en el proceso de

maduración hematopoyética y son las células cuya morfología y marcadores específicos se analizan en los diferentes procesos fisiopatológicos de la práctica médica. Son, además, las células diana de los diferentes mecanismos de control que afinan los cambios en su viabilidad, expansión y diferenciación, así como de la liberación final de las células maduras a la circulación sanguínea (Ramírez y Cornejo 2004). Tanto las células madre como los progenitores y las células maduras se encuentran en la MO, en la sangre periférica y también en la sangre del cordón umbilical del recién nacido (Mayani y col., 2007).

El proceso de diferenciación hematopoyética se describe como una jerarquía de células progenitoras, en la que cada estadio sucesivo se distingue del siguiente por un fenotipo característico, así como por el número y tipo(s) de células hijas maduras que son capaces de generar (Fernández-Nocelo, 2011). Esta organización no se puede visualizar *in vivo* directamente, en parte por la movilidad de los progenitores dentro de la MO y en parte porque muchos cambios tempranos e irreversibles en la expresión génica suceden antes de que se expresen como cambios en la morfología celular. Por este motivo, todas las células hematopoyéticas inmaduras se clasifican morfológicamente de manera indiscriminada como células blásticas: células de tamaño pequeño, redondas, con núcleo grande y citoplasma escaso (Mayani y col., 2007). La clasificación de las células hematopoyéticas es:

1. Serie plaquetaria

El megacarioblasto es una célula de observación infrecuente en la médula ósea. Es el elemento de menor tamaño de esta serie, de 6-24 μm . El núcleo es único, grande, ovalado o bilobulado, con cromatina laxa y numerosos nucleolos. El citoplasma es intensamente basófilo, agranular, sin vestigios de granulogénesis y puede presentar algunas prolongaciones a modo de pseudópodos muy característicos (Figura 4) (Ramírez y Cornejo, 2004).

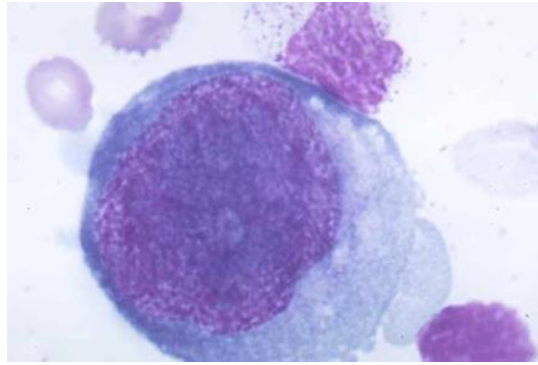


Figura 4. Micrografía de un megacarioblasto teñido por el método de Hematoxilina-Eosina (Rollins, 2009).

2. Serie roja: eritropoyesis

El eritroblasto ortocromático tiene un tamaño pequeño (7-10 μm) con núcleo intensamente picnótico y cromatina muy condensada de aspecto homogéneo (Figura 5). El citoplasma muy acidófilo va aumentando su contenido hemoglobínico hasta adquirir la tonalidad propia del hematíe maduro. Este eritroblasto no posee capacidad mitótica, aunque puede sintetizar proteínas y hemoglobina. El núcleo, una vez finalizada su maduración, es expulsado de la célula por un mecanismo no del todo conocido, siendo éste posteriormente fagocitado por las células del sistema mononuclear fagocítico de la médula ósea (Fernández-Nocelo, 2011).

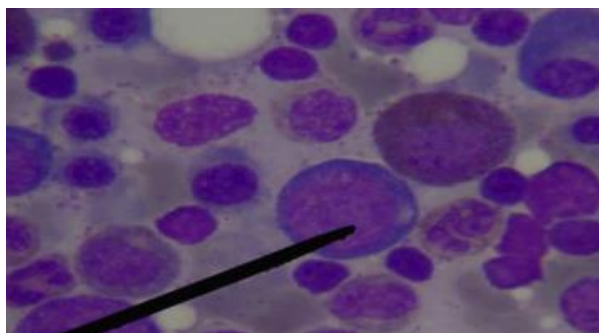


Figura 5. Micrografía de un eritoblasto teñido por el método Hematoxilina-Eosina (Rollins, 2009)

3. Serie granulocítica: granulopoyesis

El mieloblasto es un elemento con ausencia de granulación al microscopio óptico (Figura 6). Se trata de una célula de tamaño comprendido entre 15-20 μm , de forma redondeada u oval y de contorno liso. El núcleo, de gran tamaño en relación con el diámetro celular, es redondo y está provisto de una cromatina finamente reticulada, con presencia de dos o tres nucleolos bien visibles. El citoplasma, de color basófilo aunque menos intenso que el del proeritroblasto, es escaso y está desprovisto ópticamente de granulación y vacuolas. A nivel ultraestructural puede detectarse mieloperoxidasa en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Ramírez y Cornejo, 2004).

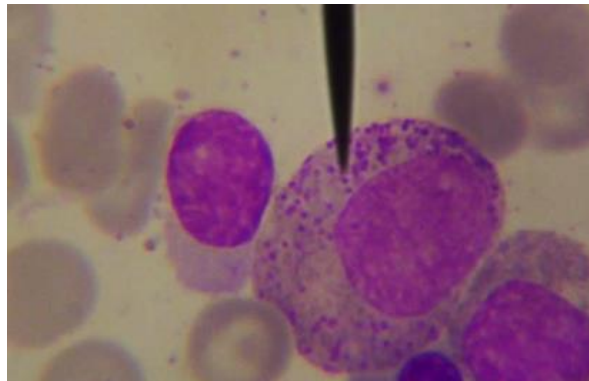


Figura 6. Micrografía de un mieloblasto, teñido por el método de Hematoxilina-Eosina (Pieraccini, 2012)

2.5.1 Células de la médula ósea

Glóbulos rojos. También llamados eritrocitos o hematíes. Son células anucleadas (sin núcleo), en forma de disco bicóncavo y de aproximadamente 7 μm de diámetro. La cantidad de glóbulos rojos es diferente en función del sexo, de esta forma un hombre tendría del orden de los 5 millones de células por mm^3 y una mujer la cifra oscila en los 4.5 millones. La célula predecesora del eritrocito es el reticulocito, esta célula si tiene, a diferencia del eritrocito, material nuclear, en concreto ARN (el cual se identifica por tinción). El contenido de un hematíe es básicamente hemoglobina, proteína encargada del transporte de oxígeno. El valor

de hemoglobina es también otro factor a tener en cuenta en el diagnóstico de la anemia. La hemoglobina se forma a partir de hierro, vitamina B12 y ácido fólico. La hemoglobina está formada por cuatro cadenas de polipéptidos denominados globina unidas a un grupo hemo. El grupo hemo contiene hierro que será el que se une al oxígeno. Un grupo hemo está formado por un grupo pirrólico que será el resultado de la unión de succinil CoA y el aminoácido glicina. Los cuatro grupos pirrólicos formados darán lugar a la protoporfirina uniéndose ésta al Fe^{2+} para formar el grupo hemo. El eritrocito presenta una coloración roja propia de la hemoglobina. La vida media de un eritrocito es de unos 120 días (Fernández-Nocelo, 2011).

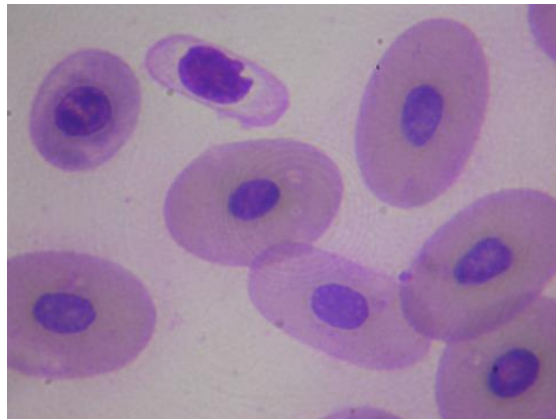


Figura 7. Micrografía de eritrocitos inmaduros (Servixotic, 2011).

Glóbulos blancos. Los glóbulos blancos forman la serie blanca. Sus valores oscilan entre 4000 y 11000 mm^3 . Su vida media es muy variada: desde horas a años (linfocitos T). Tienen núcleo. Dentro de los leucocitos se distinguen:

Leucocitos con granulaciones en el interior de su citoplasma. Leucocitos granulados o polimorfos nucleares. No tienen forma específica. Entre estos destacan: 1) Basófilos: 0%-4%, liberan a la sangre heparina, intervienen en procesos inflamatorios y a veces en la inflamación crónica; 2) neutrófilos, son más abundantes, suponen del 50% al 70% de los leucocitos. Intervienen en la inmunidad congénita. En procesos de infección aguda se dirigen a zonas de inflamación intensa. Tienen la capacidad de fagocitar y actúan como factores

quimiotácticos (los tejidos infectados liberan sustancias químicas que atraen a los neutrofilos); 3) eosinófilos, 1%-3%. Están implicados en los fenómenos de alergias produciendo sustancias “alérgicas” como la histamina (Ramírez y Cornejo, 2004).

Leucocitos agranulados. No presentan gránulos intracitoplasmáticos y tienen forma esférica. Se trata de los linfocitos T y los linfocitos B (Ramírez y Cornejo, 2004). Dentro de los linfocitos T se encuentran distintos tipos:

- Células T4: colaboradoras, cuya función va a ser la de producir citocinas que van a modular la producción de linfocitos B y monocitos. Estas células producen el recptos CD4.
- Células T8 o supresoras: por medio de citocinas impiden la formación de células T4 colaboradoras e indirectamente de anticuerpos.
- Células T citotóxicas: producen la lisis o ruptura de células infectadas.

Los linfocitos B están implicados principalmente en la inmunidad humoral. Las sustancias que producen son inmunoglobulinas y reciben el nombre de anticuerpos. Entre ellos se encuentran los monocitos y los macrófagos. Los monocitos (3% y 9%), tienen la capacidad de abandonar el vaso sanguíneo por diapédesis (los monocitos se deslizan a través de los poros de los vasos sanguíneos). Tienen una gran capacidad fagocitaria. Los macrófagos tienen dos funciones principalmente: fagocitosis y como células presentadoras de antígenos (Ag) ya que son las encargadas de ponerse en contacto con el antígeno, de introducirlo en su interior, modificar su estructura y exponerlo en su superficie para la acción de los linfocitos T, para neutralizarlo o eliminarlo (Ramírez y Cornejo, 2004).

Plaquetas. Las plaquetas se producen en la MO y tienen una forma de células grandes que reciben el nombre de megacariocitos. Los megacariocitos sufren particiones (se dividen en fragmentos) y son llevados al sistema circulatorio (sangre) y allí se llaman plaquetas. Las plaquetas son anucleares y tienen una vida media de entre 5 a 8 días. Están implicados en procesos de coagulación

sanguínea, la cual es activada con una lesión vascular. Los mecanismos de coagulación se activan por medio de cascada enzimática. Ante una lesión vascular, las plaquetas se adhieren (adherencia plaquetaria) entre ellas y con las paredes de la lesión provocando la liberación de sustancias vaso-activas y sustancias que intervienen en la coagulación (López, 2012).

- Sustancias vaso-activas: serotonina y bradiquinina: provocan vasoconstricción regulada por mecanismos de vasodilatación.
- Sustancias coagulativas: tromboplastina que va a ser liberada por las plaquetas y actúa activando a la protrombina.

La protrombina es la primera enzima de síntesis hepática que circula por la sangre y cuando es estimulada produce el paso de protrombina a trombina mediante la enzima protrombinasa. La protrombina es de origen hepático. Para que el hígado elabore la protrombina se necesita la presencia de la vitamina K que se puede aportar de un origen externo (dieta o mediante la flora bacteriana intestinal). En el paso de protrombina a trombina también se necesita Ca^{2+} y vitamina K. La trombina activada actúa en el paso de fibrinógeno a fibrina, esta fibrina consiste en monómeros con forma filamentosa con un aspecto de hilos. Forma una red entorno a la lesión endotelial y esta red tiene la función de ligar y atrapar células sanguíneas (hematíes, plaquetas, leucocitos) (Rodak, 2005a).

2.5.6 Factores de crecimiento hematopoyéticos

El funcionamiento normal de la hematopoyesis resulta de la interacción entre mecanismos intracelulares y la influencia del microambiente donde se desarrollan las células hematopoyéticas. El crecimiento y diferenciación de las células sanguíneas está regulado por una serie de hormonas glicoproteínas denominadas: “factores de crecimiento hematopoyéticos” (FCH) o “factores estimuladores de colonias” (Cuadro 2) (Huguley ,1927).

La citoquinas presentes en el microambiente medular promueven o inhibien el crecimiento de los elementos celulares, inducen la quiescencia o la proliferación y

diferenciación de los progenitores hematopoyéticos primitivos y resultan en la progresión ordenada del sistema hematopoyético. Pero no toda la regulación *in vivo* es local. La eritropoyetina es una molécula circulante prototipo de un mecanismo de control por retroalimentación. Cambios mensurables en los niveles circulantes de otros factores hematopoyéticos pueden ser detectados en una gran variedad de enfermedades y alteraciones del sistema hematopoyético (Lopez, 2012). Asimismo, la administración de dosis farmacológicas de algunos factores de crecimiento produce efectos importantes en el número de células hemáticas circulantes y la salida desde la MO a la SP de progenitores muy inmaduros (movilización de progenitores a la SP). Este proceso resulta clínicamente útil porque permite recoger dichos progenitores mediante leucoaféresis, lo que ha permitido la realización de trasplantes hematopoyéticos (Rodak, 2005a).

Cuadro 2. Acción de las citosinas en la hematopoyesis (Mayani y col., 2007)

Factor de crecimiento hematopoyético	Sitios de Producción	Principales funciones
Eritropoyetina	Riñón, Hígado	Producción de eritrocitos
G-CSF	Células endoteliales, fibroblastos, macrófagos	Producción de neutrófilos.
Trombopoyetina	Hígado y Riñón	Producción de plaquetas
M-CSF	Células endoteliales, fibroblastos, macrófagos	Producción de macrófagos y osteoclastos
Ligando SCF/c-kit	Células estromáticas de la medula ósea	Célula madre, supervivencia y división de células progenitoras
Ligando F κ -3	Células endoteliales, fibroblastos	Expansión de célula progenitora temprana; pro-célula B
IL-3	Células T (TH1 y TH2), Macrófago	Crecimiento de células madre y células progenitoras mieloides y células cebadas
IL-5	Células T colaboradoras, solo respuesta TH2	Producción de eosinófilos, producción de células B murinas.
IL-6	Células T activas, monocitos, fibroblastos, endoteliales.	Estimulación de células progenitoras, producción de plaquetas, producción de inmunoglobulinas en células B
IL-11	Células estromáticas de la medula ósea y fibroblastos estimulan por IL-1	Factor de crecimiento de macrófagos.
IL-7	Células estromáticas de la medula ósea y fibroblastos	Crecimiento de células T.

III. Justificación

La utilización de terapias naturales para combatir diversas patologías ha cobrado hoy en día gran importancia, es por esto que conocer las implicaciones biológicas de estas posibles terapias ayudará a entender su mecanismo de acción, así como sus efectos generales en sistemas biológicos. Actualmente el frijol Tépari es estudiado por presentar dos efectos muy importante en el control del cáncer, inducir la muerte celular por apoptosis de forma diferencial así como, evitar la migración celular. Lo anterior se debe a la presencia de dos componentes bioactivos, lectinas e inhibidores de proteasas (García-Gasca y col., 2012).

Trabajos previos han mostrado el efecto *in vitro* por separado de estos dos tipos de proteínas así como el efecto *in vivo* de una fracción concentrada en lectinas sobre cáncer de colon. Por otro lado, se sabe que uno de los tejidos más sensibles al efecto de agentes anticancerígenos es el sistema hematopoyético, es por lo anterior, que como parte de la evaluación toxicológica y farmacológica de LIP-60, el presente trabajo se enfocó al estudio del efecto de la administración de LIP-60 a ratas para determinar su efecto sobre células de sistema hematopoyético;. Dado que ambos tipos de proteínas ejercen efectos diferentes sobre las células cancerígenas y sobre el organismo en general, resulta importante la evaluación del complejo natural de lectinas-IP a la que se le ha denominado LIP-60.

IV. Hipótesis

La fracción combinada de lectinas e inhibidores de proteasas de frijol Tépari (LIP-60) presenta efectos diferenciales sobre células del sistema hematopoyético.

V. Objetivos

Objetivo General

Determinar si LIP-60 tiene la propiedad de inducir cambios sobre el sistema hematopoyético.

Objetivos Específicos

1. Determinar si la administración subcrónica de LIP-60 tiene efecto sobre la proliferación de células hematopoyéticas ratas Sprague Dawley.
2. Determinar si la administración subcrónica de LIP-60 promueve la proliferación y diferenciación de células del sistema hematopoyético en ratas Sprague Dawley.
3. Determinar si la administración subcrónica de LIP-60 tiene un efecto sobre la producción de citosinas (TNF- α e IL-6) en ratas Sprague Dawley.

VI. Materiales y Métodos

6.1 Diseño Experimental

Estudio de tipo comparativo, experimental, longitudinal.

Se utilizaron 20 ratas Sprague Dawley (10 hembras y 10 machos) de 3 semanas de edad, obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Campus Juriquilla, Querétaro. Se les dio una semana de adaptación al bioterio de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Posteriormente se formaron 2 grupos aleatorizados y ajustados por peso corporal, el grupo 1 se le denominó grupo control (C) y al grupo 2 grupo de tratamiento (Tx). Los animales se mantuvieron en las condiciones del bioterio a 26° C, con 12 h de luz y 12 h de oscuridad con alimentación y agua *ad libitum*. El alimento de ambos grupos fue autoclaveado para eliminar el efecto de lectinas contenidas en el mismo, ya que se sabe que la lectina de frijol tépari, es sensible a este proceso. En todo momento se observaron los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el uso de animales de laboratorio bajo las consideraciones éticas correspondientes.

La dosis de LIP-60 fue definida en base a unidades de aglutinación (UA) considerando como base las UA de la FCL previamente estudiada (López-Sánchez y col., 2010). Al grupo C se le administró 0.5 mL de solución salina vía intragástrica mientras que al grupo Tx 100 mg/kg de peso en 0.5 mL de solución salina vía intragástrica durante 28 días consecutivos. Durante el periodo de administración se obtuvo sangre por medio del corte de cola, con ayuda de una guillotina de 4 cuchillas, realizando un corte de 4 mm. Se obtuvieron alrededor de 150 μ L de sangre a las 0 h, 8 h, 24 h, 72 h, 9 días, 14 días, 19 días, 24 días y 30 días después de iniciado el tratamiento. Aproximadamente 50 μ L se colectaron en capilares heparinizados y se utilizaron para realizar la biometría hemática (BH) y el resto se obtuvo en tubos de microcentrifuga de 200 μ L de volumen. La sangre se

centrifugó a 5000 g por 10 min para la separación del suero, el cual se almacenó a -80° C para su posterior análisis. Cada uno de los animales fue pesado y se les determinó diariamente el consumo de alimento. Los animales se observaron de manera individual hasta completar un periodo de 30 días.

Llegado los 28 días de administración diaria se les dio un periodo de descanso de dos días y se procedió al sacrificio por el método de decapitación con ayuda de una guillotina de 4 cuchillas para obtener la mayor cantidad de sangre y no causar toxicidad sanguínea o hepática por anestésicos o sedantes. Se obtuvo suero, plasma, bazo, timo, placas de Peyer (intestino delgado) y médula ósea de columna vertebral y fémur. Los órganos fueron medidos, pesados y fijados en formalina al 10% para conservarlos y realizar su posterior análisis.

6.2 Biometría Hemática

La biometría hemática se realizó con ayuda de un hematocitómetro de la marca CellDyn® serie 1600 el cual mide los siguientes parámetros:

- | | | |
|----------------------------|-----------------------------------|--|
| • WBC: Glóbulos Blancos | • RBC: Globulos Rojos | • MCH: Hemoglobina Corpuscular Media. |
| • LYNF: Linfocitos | • HGB: Hemoglobina | • MCHC: Concentración Media de Hemoglobina Corpuscular |
| • GRAN: Granulocitos | • HCT: Hematocrito | • PLT: Plaquetas |
| • %LINF: % de Linfocitos | • VCM: Volumen Corpuscular Medico | |
| • %GRAN: % de Granulocitos | | |

6.3 Análisis Histopatológico

Los órganos obtenidos del sacrificio se fijaron en formaldehido al 10%, para su posterior análisis, después se realizaron los cortes semifinos de timo, bazo y

epífisis de fémur. Los tejidos se deshidrataron y fueron incluidos en parafina con ayuda del equipo Histoquinete Leica TP1020. Posteriormente se realizaron los cortes finos a un grosor aproximado de 5 μm con ayuda del equipo micrótomo RM21 de la marca Leica y fueron montados en un porta objetos adheridos con una fina capa de gelatina en agua caliente. Después de montados se procedió a la rehidratación y a la tinción de hematoxilina y posteriormente a la tinción de eosina. Los tejidos se deshidrataron nuevamente y se sellaron con ayuda de centellan y un cubreobjetos. Posteriormente se realizó el análisis al microscopio.

6.4 Análisis de IL-6 y TNF α

El estudio de las interleucinas se realizó por medio de kits comerciales de ELISA para interleucina-6 (Thermo Scientific, número de catálogo ER3IL-6) y TNF- α (Thermo Scientific, número de catálogo ER3TNFA), para suero directo de ratas.

6.5 Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron con ayuda del programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 21.0 IBM. Se realizaron pruebas de t de student para muestras independientes con un nivel de significancia de 0.05 para comparar los controles contra los tratamientos y ANOVA de un Factor en los casos de comparar grupo control macho y control hembra contra tratamiento macho y tratamiento hembra.

VII. Resultados y discusión

7.1 Efecto sobre el peso corporal, consumo de alimento y efectos adversos.

El peso y tamaño de los animales homeotérmicos, como el caso de las ratas de laboratorio, está determinado por la tasa metabólica basal (Hill y col., 2006) el cual cambia para adaptarse a factores ambientales y del comportamiento conductual. En cuanto al efecto sobre el peso corporal, no se encontró una alteración significativa entre animales tratados con LIP-60 (100 mg/kg de peso corporal) y el grupo control (Figura 8). Se observó disminución de peso de aproximadamente un 10% al final del experimento, de forma similar a lo observado anteriormente para la FCL. Sin embargo, el efecto de LIP-60 fue menos pronunciado que el de FCL ya que esta última provoca disminución del peso corporal desde el inicio del tratamiento (López-Sánchez y col., 2010).

En lo que se refiere el consumo de alimento, no se encontró una diferencia estadística significativa (t de student, $p > 0.05$) sin embargo, se observó una ligera disminución en el consumo de alimento del grupo tratado posterior al inicio de la administración (Figura 9). El patrón de consumo fue el mismo para los dos grupos, considerando los cambios conductuales y efectos de la dieta isocalórica de las ratas (Díaz-Reséndiz y col., 2009) lo cual se puede explicar cómo una sobre-alimentación inicial, seguida de una reducción del consumo para compensar las calorías ingeridas.

Los efectos adversos encontrados fueron muy similares aunque menos severos a los reportados al administrar FCL en el esquema subcrónico los cuales consistieron en piloerección, aletargamiento, diarrea, pelo amarillento (irsulto) y una disminución en el consumo de alimento (López-Sánchez y col., 2010). Lo anterior sugiere que LIP-60 provoca menor toxicidad que la FCL bajo un esquema subcrónico.

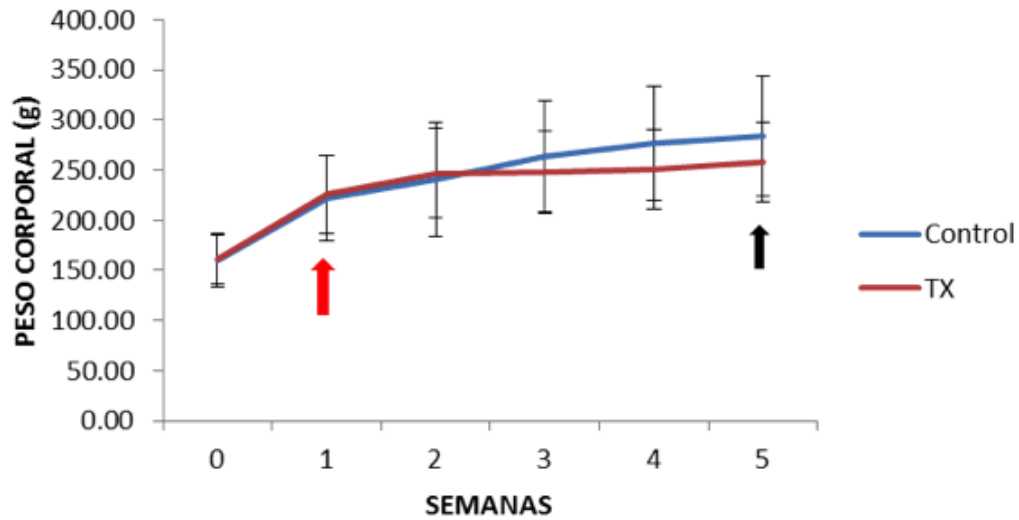


Figura 8. Efecto de LIP-60 sobre el peso corporal de ratas. No se observó diferencia estadística significativa (t de student, $p > 0.05$), las barras de error representan la desviación estándar. Las flechas indican, Roja: Inicio de Tratamiento; Negra: Sacrificio.

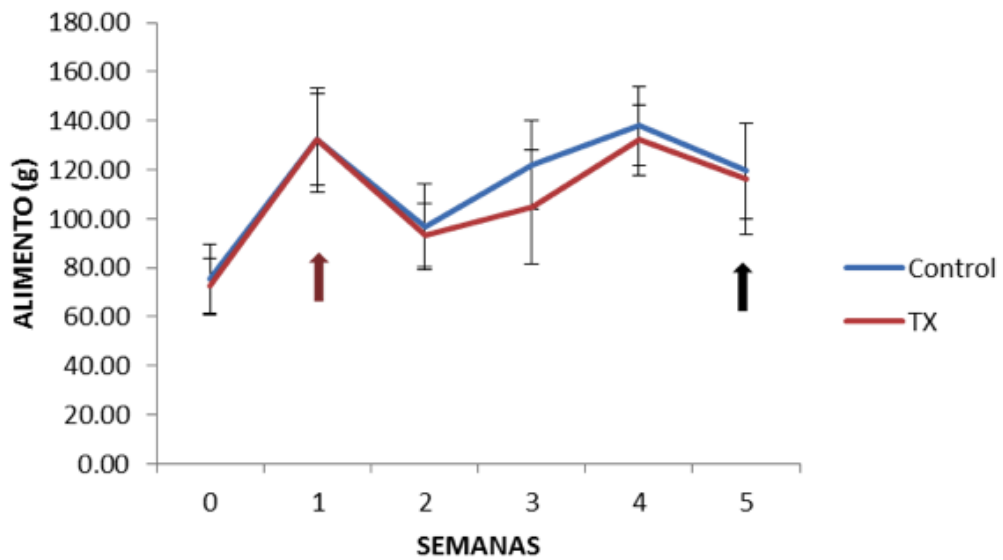


Figura 9. Efecto de LIP-60 sobre el consumo de alimento. No se observó diferencia estadística significativa (t de student, $p > 0.05$), las barras de error representan la desviación estándar. Las flechas indican, Roja: Inicio de Tratamiento; Negra: Sacrificio.

7.2 Biometría Hemática

Con respecto a las BH, no se observó diferencia significativa (t de student, $p \geq 0.05$) en cuanto al número total de glóbulos blancos (GB) (Figura 10). Se observó un ligero incremento a las 24 h de administrar el tratamiento, lo cual podría estar relacionado a una respuesta mitogénica mostrada por otras lectinas como la Concanavalina A, Fitoheماغلوتينina y Fitolaca americana (González y col., 1991). De igual forma, en el recuento de glóbulos rojos no mostró diferencia estadística (t de student, $p \geq 0.05$) entre los grupos control y tratamiento en los diversos tiempos de evaluación (Figura 11).

Un análisis más detallado de los glóbulos blancos mostró un comportamiento diferencial entre linfocitos y granulocitos (Figuras 12 y 13). Para el caso de linfocitos el comportamiento fue similar al control y, aunque no se observó diferencia significativa, al día 14 de tratamiento se observó una disminución del 33% aproximadamente. Para el caso de los granulocitos, se observó un aumento del 100% a partir del primer día de administración que fue normalizándose después de 9 días, lo cual podría tener implicaciones fisiológicas importantes.

Derivado de lo anterior, se realizó un recuento diferencial de los glóbulos blancos (Cuadro 3). Los resultados del frotis sanguíneo mostraron diferencia significativa en el recuento de linfocitos con una depleción del 22% de los linfocitos con respecto al control y aumento en las diversas poblaciones de granulocitos, en especial de los eosinófilos (8 veces más). Lo anterior sugiere una respuesta alérgica (Rollins, 2009) en las ratas que recibieron el tratamiento con LIP-60 desde las primeras 24 h del tratamiento. El incremento de neutrófilos se pueden relacionar con un aumento de la cantidad de histamina liberada (Ramos y col., 2004), lo cual puede estar relacionado con un posible aumento del peristaltismo provocado por las lectinas. La proporción linfocitos/granulocitos mostró una tendencia a disminuir por parte de los linfocitos y a aumentar por parte de los granulocitos (Figura 14), lo que sugiere una reacción inmunológica a la presencia de una molécula extraña en el organismo.

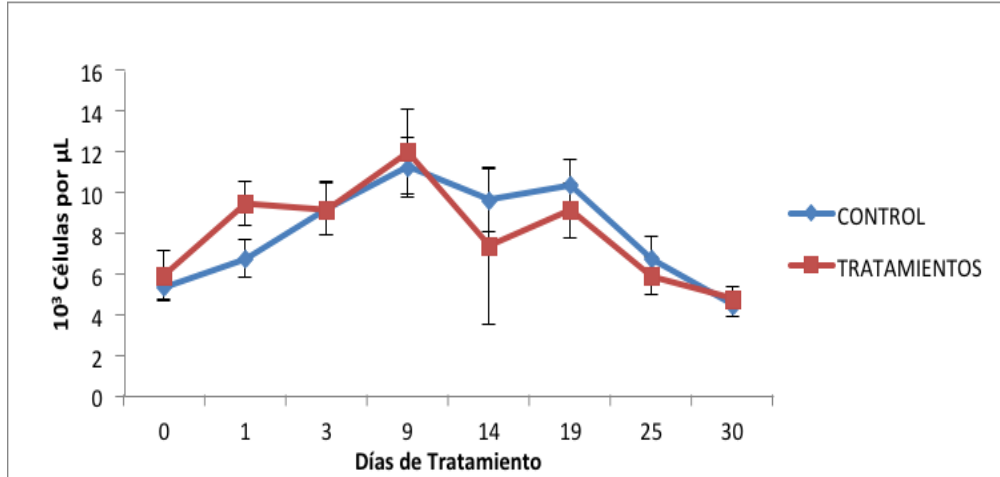


Figura 10. Recuento de glóbulos blancos en ratas tratadas con LIP-60. No se observó diferencia estadística significativa (t de student, $p > 0.05$), las barras de error representan el error estándar.

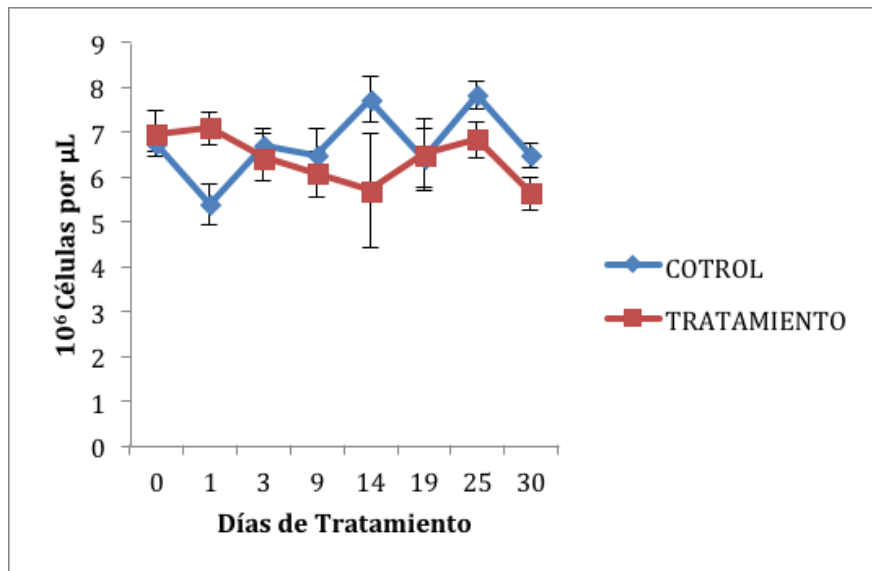


Figura 11. Recuento de glóbulos rojos en ratas tratadas con LIP-60. No se observó diferencia estadística significativa (t de student, $p > 0.05$), las barras de error representan el error estándar.

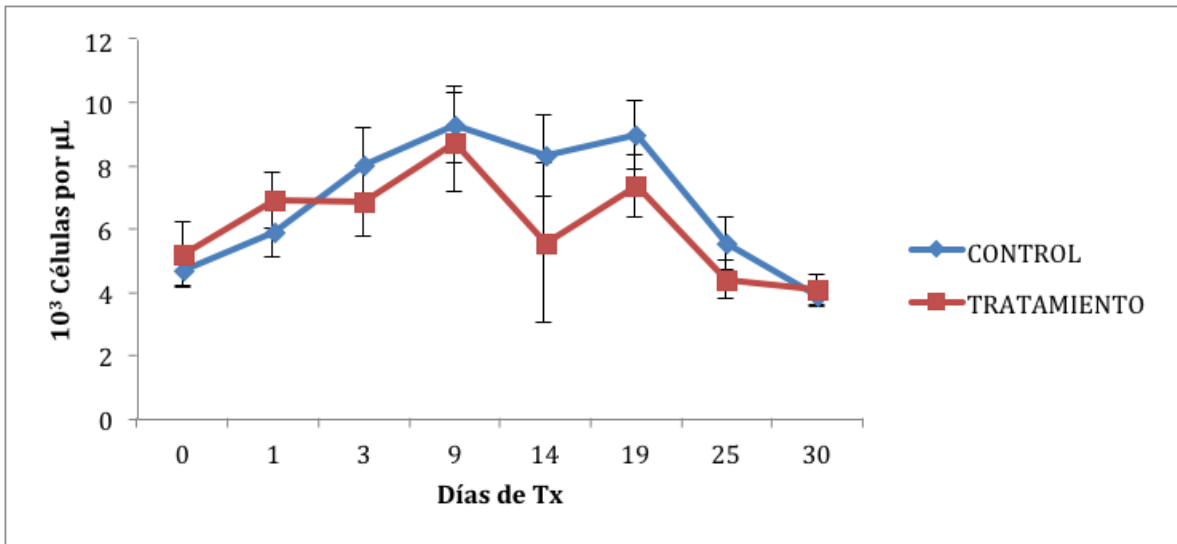


Figura 12. Recuento de linfocitos en ratas tratadas con LIP-60. (*) Indica diferencia estadística significativa (t de student, $p \leq 0.05$), las barras de error representan el error estándar.

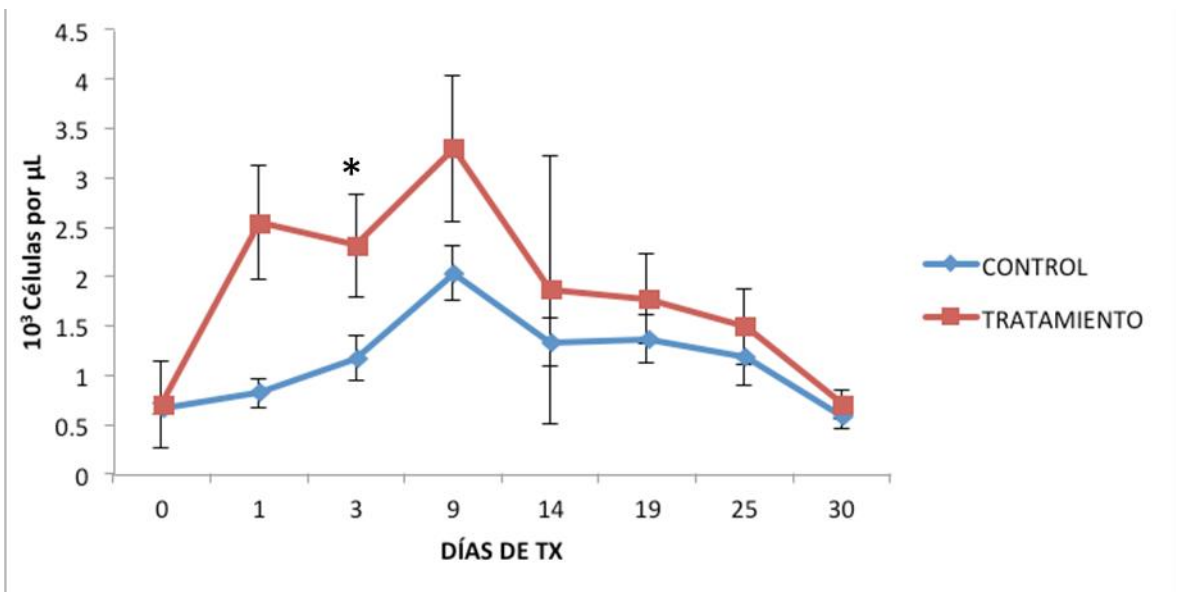


Figura 13. Recuento de granulocitos en ratas tratadas con LIP-60. (*) Indica diferencia estadística significativa (t de student, $p \leq 0.05$), las barras de error representan el error estándar.

Cuadro 3. Porcentajes de células obtenidos por recuento en frotis sanguíneo y hemotinción en ratas tratadas con LIP-60.

Linaje Celular	Grupo	Media	Desviación	Valor de referencia (%)	p
Linfocitos %	CONTROL	87.67	4.79	82.05-97.26	0.004*
	LIP-60	68.19	7.06		
Neutrófilos maduros %	CONTROL	8.33	1.28	1.99-13.51	0.018*
	LIP-60	19.17	4.90		
Eosinófilos %	CONTROL	1.00	1.28	0-2	0.031*
	LIP-60	8.42	5.11		
Monocitos%	CONTROL	3.00	4.40	0-2	0.765
	LIP-60	4.21	6.30		

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

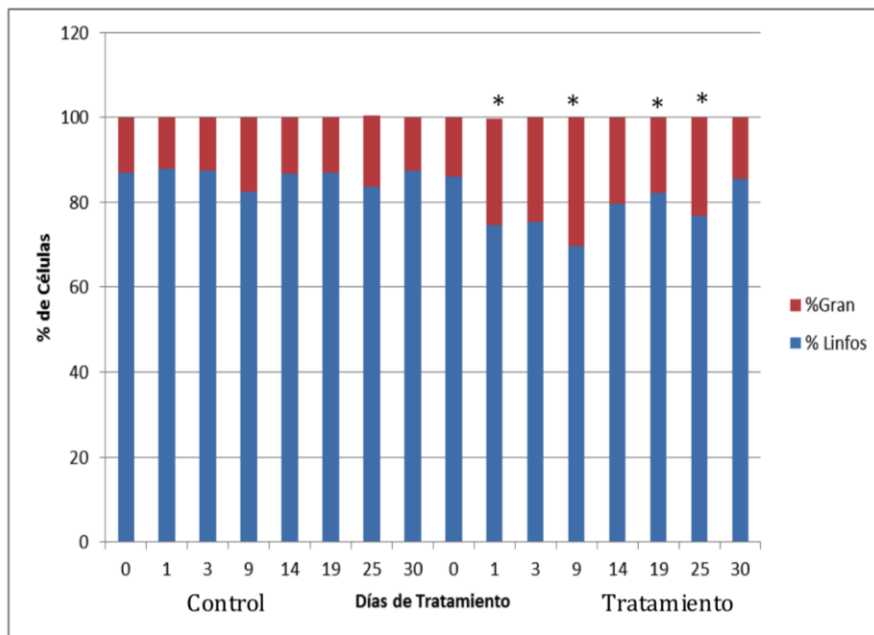


Figura 14. Proporción de Linfocitos (%L) y Granulocitos (%G) del total de Glóbulos Blancos en ratas tratadas con LIP-60. (*) Indica diferencia estadística significativa (t de student, $p \leq 0.05$).

7.2.1 Frotis Sanguíneo

En el frotis sanguíneo se logró observar una diferencia marcada entre las diferentes poblaciones celulares de leucocitos (Figura 15). Otro de los hallazgos de este estudio fue la observación de un incremento de la agregación plaquetaria (Figura 16). Lo anterior concuerda con lo descrito por Castillo-Villanueva (2005), donde reporta que las lectinas son capaces de aglutinar diferentes tipos células entre ellas las plaquetas. Este aspecto puede tener implicaciones en la coagulación sanguínea ya que la segregación es uno de los mecanismos por medio del cual las plaquetas forman el trombo para evitar las hemorragias en heridas.

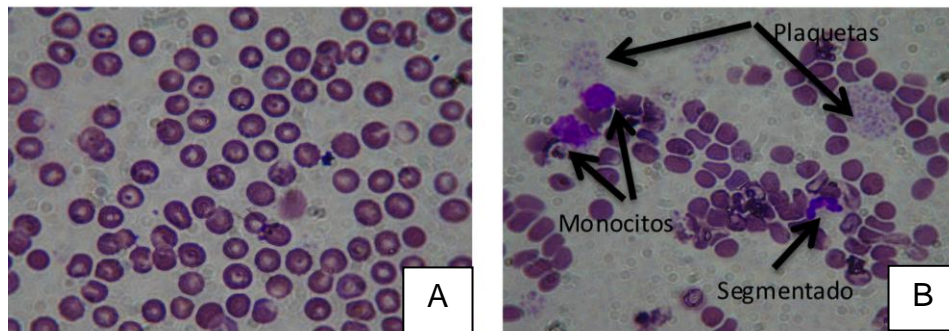


Figura 15. Diferencias poblacionales leucocitarias entre el grupo control (A) y el tratado con LIP-60 (B). Aumento 100X

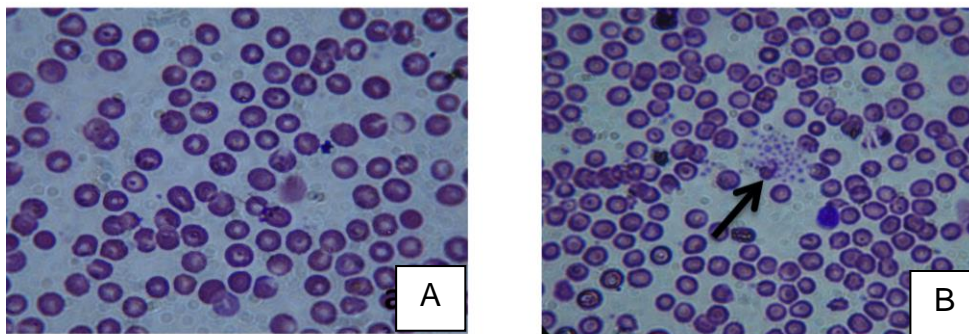


Figura 16. Agregación plaquetaria entre el grupo control (A) y el tratado con LIP-60 (B). Aumento 100X

7.3 Análisis histopatológico

En el análisis de timo no se encontró diferencia histopatológica aparente por el método de tinción de H-E (Figura 17) lo cual sugiere que no existe una respuesta inmunológica desde este órgano, tal como se reporta en otros trabajos con la FCL (Reyes, 2011). Por otro lado, en bazo y MO se encontró una disminución leve (35% menos en la medición de los diámetros) en la pulpa blanca en el 70% de los animales tratados y un aumento de la celularidad blástica (Figura 18) en un 60% de los casos, lo cual podría relacionarse con un aumento en la liberación de linfocitos maduros a la circulación sanguínea y una mayor producción de éstos desde el sistema hematopoyético. Esta respuesta también fue observada por (Reyes, 2011) en un esquema de administración farmacológico (3 veces por semana) de FCL.

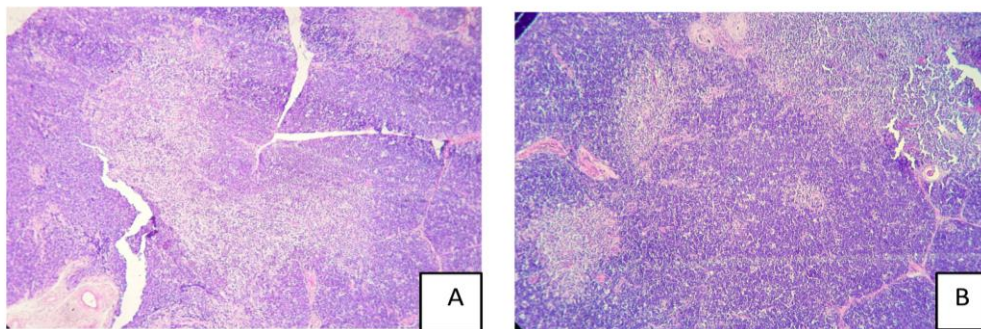


Figura 17. Microfotografías de timo de ratas control (A) y tratadas con LIP-60 (B). Aumento 10x.

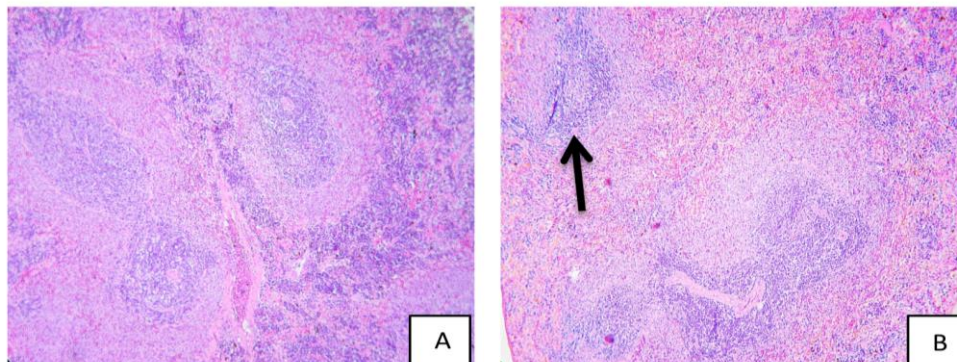


Figura 18. Microfotografías de bazo de ratas control (A) y tratadas con LIP-60 (B). Las flechas indican los sitios disminuidos de la pulpa blanca. Aumento 10x.

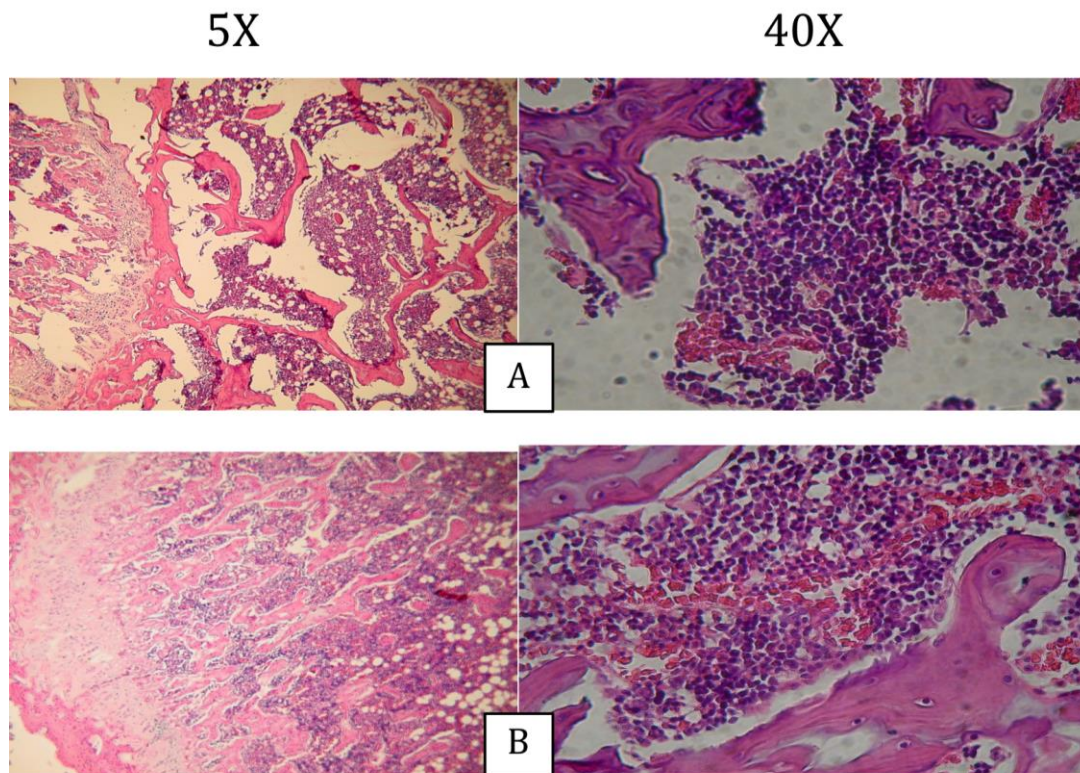


Figura 19. Microfotografías de médula ósea de ratas control (A) y tratadas con LIP-60 (B). Aumento 5X y 40X.

7.4 Análisis de IL-6 y TNF α

IL-6

El análisis de la IL-6 no mostró diferencia estadística significativa (t de student, $p > 0.05$) entre los grupos control y tratamiento, (Figura 20A). Al realizar un análisis separando machos y hembras fue posible distinguir una mayor tendencia a la disminución en el grupo hembras con tratamiento respecto al control (Figura 20B). La disminución de IL-6 está relacionada con la diferenciación de leucocitos lo que promueve una mayor utilidad de dicho factor disminuyendo sus niveles séricos (Mayani y col., 2007).

TNF α

El resultado por ELISA de TNF- α no mostró diferencia estadística significativa comparando controles contra tratamientos aunque se observó disminución del 15% aproximadamente en el grupo tratado (Figura 21A). Al realizar el análisis separando los grupos en machos y hembras se observó que los grupos tratados tanto de machos como de hembras se encuentran disminuidos en los niveles de TNF- α (Figura 21B). TNF- α está involucrado con un aumento en la producción de monocitos y macrófagos, los cuales no se encontraron aumentados en el recuento diferencial y es un inhibidor de la mielopoyesis (Mayani y col., 2007), lo cual concuerda con un aumento notable de linfocitos en sangre.

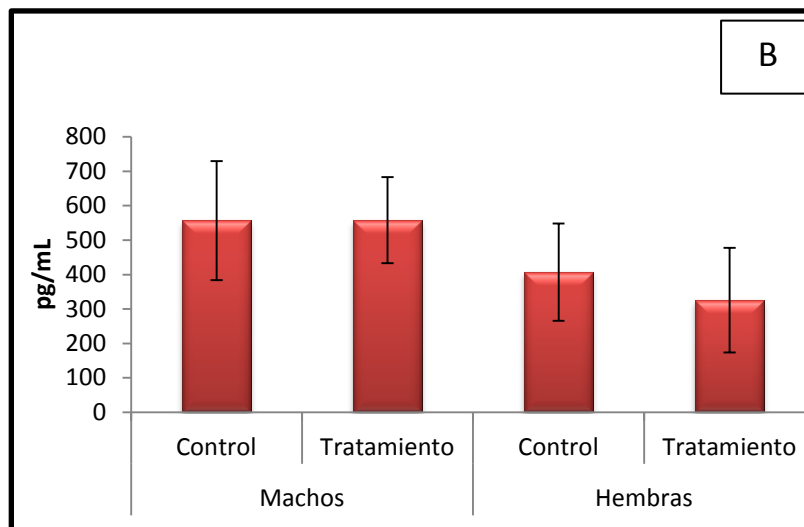
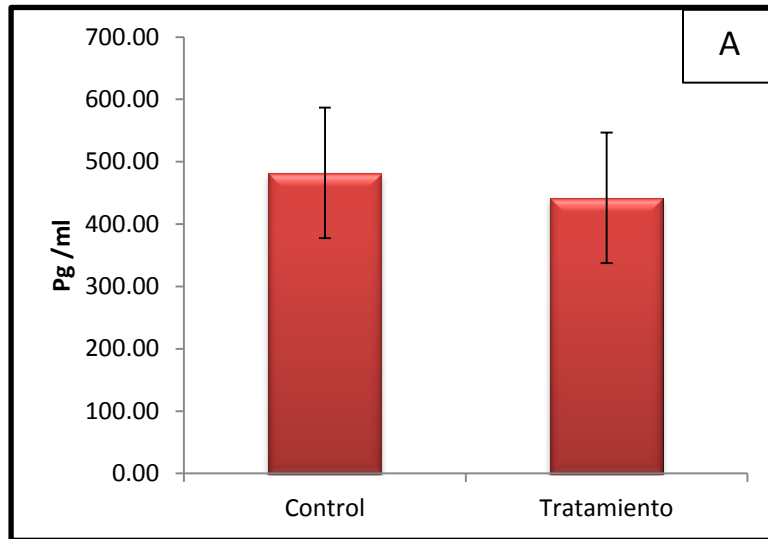


Figura 20. Efecto de LIP-60 sobre la concentración de IL-6 séricas (A) y por sexos (B). No se observó diferencia estadística significativa ($p > 0.05$), las barras de error representan el error estándar.

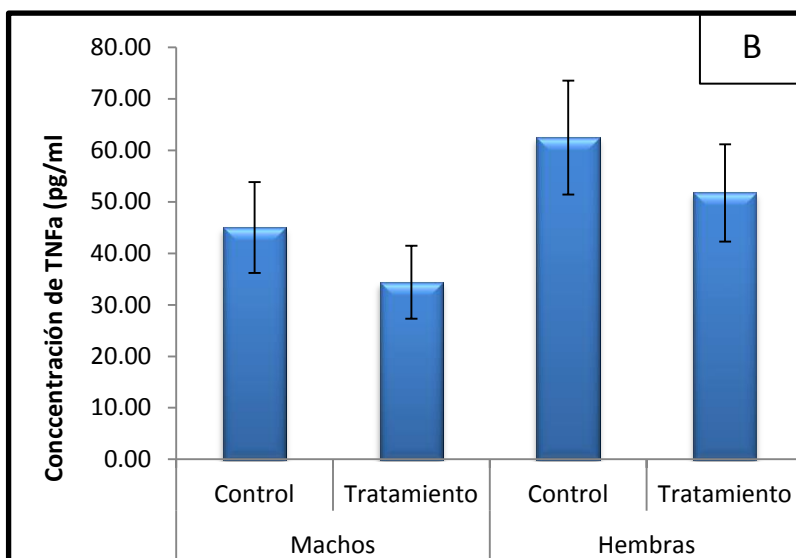
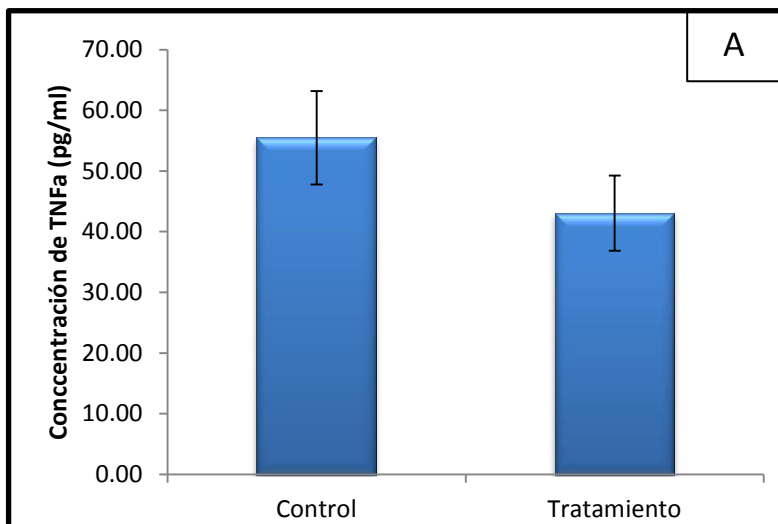


Figura 20. Efecto de LIP-60 sobre la concentración de TNF- α séricas (A) y por sexos (B). No se observó diferencia estadística significativa ($p > 0.05$), las barras de error representan el error estándar.

VIII. Conclusiones

De acuerdo con los resultados en el presente trabajo se puede concluir:

- LIP-60 resultó ser una fracción menos tóxica que la FCL, mostrando menos efectos adversos y una ligera disminución de peso en periodos iniciales del tratamiento y, aunque se logró una recuperación, los grupos con tratamiento no logran recuperar el 100% del peso, dado quizá por una afectación en una etapa crucial del crecimiento de la rata.
- LIP-60 afectó a tejido del sistema mielopoyético en bazo, lo cual se relaciona con las reacciones del sistema inmunológico detectadas en suero sanguíneo.
- LIP-60 mostró un efecto marcado en los linfocitos y en los granulocitos y al realizar el conteo diferencial se puede notar que los más afectados son los Eosinófilos, indicando una reacción alérgica durante las primeras 24 h del tratamiento, lo cual se normaliza con el paso del tiempo.
- Aunque el método automatizado de biometría hemática (CELL DYN 1600) no lo detectó, existe un notable aumento en el número de glóbulos blancos en los frotis sanguíneos de ratas tratadas con LIP-60.
- El análisis histopatológico demostró el efecto de LIP-60 a nivel sistémico lo cual fortalece la teoría de una acción sanguínea por la internalización de las lectinas y de forma activa por absorción gástrica.
- LIP-60 resultó tener un efecto aparente sobre la disminución de las citosinas IL-6 y TNF α , lo cual servirá como referencia para futuros trabajos.

La fracción combinada de lectinas e inhibidor de proteasas resulta tener efectos sobre el sistema hematopoyético de las ratas, los cuales se pueden deber a una reacción alérgica al tratamiento. Sin embargo, es necesario profundizar más en este efecto para comprender mejor su significado fisiológico y, en su momento, la implicación farmacológica de su administración.

IX. Referencias Bibliográficas

- Aldana-Marcos, H. 2006. Las Lectinas. Disponible en: <http://www.ht.org.ar/lectinas.htm>.
- Ashraf, M. T., Khan, R. H. 2003. Mitogenic lectins. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 9(11), RA265–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14586291>
- Benevides RG, Ganne G, Da Conceição Simões R, Schubert V, Niemietz M, Unverzagt C, Chazalet V, y col., 2012. A Lectin from *Platypodium elegans* with unusual Specificity and Affinity for Asymmetric Complex N-glycans. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (31): 26352–64.
- Bilyy, R. O., & Stoika, R. S. 2003. Lectinocytochemical detection of apoptotic murine leukemia L1210 cells. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 56(2), 89–95. doi:10.1002/cyto.a.10089.
- Caffini NO, Lopez LMI, Natalucci CL, Priolo NS. 1988. Proteasas de Plantas Superiores. 1. Características Generales, Rol Fisiológico y Aplicaciones. *Acta Farmacológica Bonaerense* 7 (3):195–213.
- Carrillo L. 2009. Cistatinas de cebada: proteínas de defensa contra artrópodos. Disponible en: http://oa.upm.es/3003/1/LAURA_CARRILLO_GIL.pdf
- Castañeda Cuevas, AL, Lorena Yllescas Gasca, Josué López Martínez, and Elizabeth Mendiola. 2007. Efecto Antiproliferativo In Vitro De Una Lectina De Frijol Tépari Sobre Diferentes Tipos De Cáncer Humano. 2–5. 2º Congreso Nacional de Química.
- Castillo-Villanueva A, Abdullaev F. 2005. Lectinas Vegetales y sus Efectos en el Cáncer. *Revista de Investigación Clínica* 57(1): 55–64.
- Chaudhary NS, Shee C, Islam A, Ahmad F, Yernool D, Kumar P, Sharma AK. 2008. Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Putranjiva Roxburghii* Seeds. *Phytochemistry* 69 (11):2120–6.
- Cruz J, Jiménez Galindo, Acosta A. 2013. Rendimiento de Frijol Común (*Phaseolus Vulgaris* L) y Tépari (*Phaseolus acutifolius* Gray) bajo el Método

- Riego-sequia En Chihuahua. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas* 4:557–567.
- De Leo FMV, Licciulli F, Liuni S, Gallerani R, Ceci LR. 2002. PLANT-PIs: a Database for Plant Protease Inhibitors and Their Genes. *Nucleic Acids Research* 30(1):347–8.
- Díaz-Reséndiz, F. de J., FRanco-paredes, K., Martínez-Moreno, alma G., López-espinoza, A., & AGuilera-CerVantes, V. G. (2009). Efectos de variables ambientales sobre la ingesta de alimento en ratas : una revisión histórico-conceptual, 519–532.
- Facility Global biodiversity information. 2002. Global Biodiversity Information Facility. *Environmental Health Perspectives*. Retrieved from: <http://www.gbif.org/>
- Fan SG, Wu GJ. 2005. Characteristics of Plant Proteinase Inhibitors and Their Applications in Combating Phytophagous Insects. *Bot. Bull. Acad. Sin*: 273–292.
- Fernández Nocelo S. 2011. Papel De La Miostatina en la Regulación de la Hematopoyesis. Universidad de Santiago Compostela. ISBN 978-84-9887-749-6. Disponible en:
http://dspace.usc.es/bitstream/10347/3602/1/9788498877496_content.pdf
http://dspace.usc.es/bitstream/10347/3602/1/9788498877496_content.pdf
- Ferriz-Martinez RA, Torres-Arteaga IC, Blanco-Labra A, Garcia-Gasca T. 2010. The role of plant lectins in cancer treatment. In Nova Science Publishers, Inc., 71–89. ISBN 978-1-61728-304-8, In: *New Approaches in the Treatment of Cancer*.
- García-Gasca T, Salazar-Olivo LA, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A. 2002. The Effects of a Protease Inhibitor Fraction from Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) on in Vitro Cell Proliferation and Cell Adhesion of Transformed Cells. *Toxicology in Vitro* 16 (3):229–33.
- García-Gasca, T., García-Cruz, M., Hernandez-Rivera, E., López-Matínez, J., Castañeda-Cuevas, A. L., Yllescas-Gasca, L., Blanco-Labra, A. 2012. Effects of Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) protease inhibitor and

- semipure lectin fractions on cancer cells. *Nutrition and cancer*, 64(8), 1269–78. doi:10.1080/01635581.2012.722246
- García R, Salas A, Del Monte M, Del Rivero A, Guerra Y, Chávez M. 2009. Micro y nano-biotecnologías en la detección y caracterización de inhibidores de proteasas de interés biomédico. Disponible en: <http://www.fisica.uh.cu/biblioteca/revcubfi/2009/vol.26-No.1/RCF-26-1-2009-76.pdf>.
- González De Mejía, E., y Prisecaru, V. I. 2005. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(6), 425–45. doi:10.1080/10408390591034445
- Gonzalez, L., Sáenz, E., Rodríguez, S., & Porras, O. 1991. Cuantificación de linfocitos T mediante rosetas con globulos de carnero y respuesta mitogenica a lectinas. *Rev. Cost. Cienc. Med.*, 13 (1-2), 37–42. Retrieved from <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v13n1-2/art7.pdf>.
- Hartl M, Giri AP, Kaur H, Baldwin IT. 2011. The Multiple Functions of Plant Serine Protease Inhibitors: Defense Against Herbivores and Beyond. *Plant Signaling and Behavior* 6(7):1009–11.
- Hernandez-Cruz P. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones. *Revista de Educación Bioquímica*. 24 (1): 21-27.
- Hernández-Díaz P, Martín González O, Rodríguez de Pablos Vélez Y, Ganem Báez FA. 1999. Aplicaciones De Las Lectinas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 15 (2):91–95.
- Hill, R., Wyse, G., & Anderson, M. (2006). *Fisiología Animal*. (Médica Panamericana., Ed.) (5th ed., p. 805). Madrid, España.
- Huguley Jr, C. M. 1927. The hematopoietic system. *Hematopoietic System*.
- Kabbara, S. A. R., Abbas, I. R., Scheerens, J. C., Tinsley, M., & Berry, J. W. 1987. Soaking and cooking parameters of tepary beans : effects of cooking time and cooking temperature on hardness and activity of nutritional antagonists teparies as a substitute for beans commonly used in these regions indicated dishes to be moderately to hig, 307, 295–307.
- Laskowski M, Kato I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 49:593-626.

- Lopez A. 2012. Hematopoietic Stem Cells. Biological Discovery in Wools Hole: 10776. Tomado de: <http://hdl.handle.net/10776/1960>.
- López-Sánchez, C., López-Martínez, F., Castañeda-Cuevas, A., Yllescas-Gasca, L., Ferriz-Martínez, R., Torres-Arteaga, I., & García-Gasca, T. 2009. Evaluación de la Toxicidad In Vitro e In Vivo de Lectinas de Frijol Tépari, CIENCIA@UAQ. 3(1):3-13.2010 3.
- Mayani, H., Flores-Figueroa, E., Pelayo, R., Montesinos, J. J., Flores-Guzman, P., Chavez-Gonzalez, A. 2007. Hematopoyesis. Cancerología 2, 2, 95–107.
- Mendoza W, Gandolfo L, Ponce L, Novello J, Marangoni S. 2007. Estudios estructura y función de una lectina aislada de semillas de *Caesalpinia spinosa* kuntze (Tara). IDESIA. 25:49–58.
- Micucci AH, Camps E. 1987. Lectinas: Obtención, Estructura Química, Propiedades. Acta Farm. Bonaerense 6: 35–54.
- Mosolov VV, Grigoreva LI, Valueva TA. 2001. Involvement of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection. Appl. Biochem. Microbiol. 37: 115-213.
- Nelson CE, Ryan CA. 1980. In Vitro Synthesis of Pre-proteins of Vacuolar Compartmented Proteinase Inhibitors That Accumulate in Leaves of Wounded Tomato Plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 77(4):1975–9.
- Nishimura, H; Nishimura, M; Oda, R; Yamanaka, K; Matsubara, T; Ozaki, Y; Sekiya, K; Hamada, T; Kato, Y. 2004. Lectins induce resistance to proteases and/or mechanical stimulus in all examined cells—including bone marrow mesenchymal stem cells—on various scaffolds. Exp. Cell Reseach. 295: 119-127.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Disponible en: <http://148.243.71.63/default.asp?doc=743>
- Oliva ML, Sampaio MU. 2009. Action of Plant Proteinase Inhibitors on Enzymes of Physiopathological Importance. Anais Da Academia Brasileira de Ciências 81(3): 615–21.

- Osman MA, Reid PM, Weber CW. 2003. The Effect of Feeding Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Proteinase Inhibitors on the Growth and Pancreas of Young Mice. *Pakistan Journal of Nutrition* 2(3):111–115.
- Pascual I. 2005. Purificación y caracterización parcial del primer inhibidor natural de piroglutamil aminopeptidasa II (enzima que degrada al TRH), aislado del anélido marino *Hermodice carunculata*, Pallas, 1 766 (*Polychaeta*). Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana, Cuba. pp. 1, 10, 11, 12.
- Pieraccini, V. 2012. Dipartimento di Anatomia Istologia e Medicina Legale - Sezione di Istologia. Revisado de : <http://www.unifi.it/anatistol/istologia/ematop.htm>
- Rabinovich, GA, Rubinstein N. 2001. Galectinas: Una Nueva Familia De Proteínas Involucradas En La Regulación De La Respuesta Inmune. *Medicina (Buenos Aires)*: 85–92.
- Ramírez OM, Cornejo Gutiérrez AM. 2004. Fisiología de la Hematopoyesis. *Pediatr Integral* 8:377–382.
- Ramos A, D., Angulo H, P., & Chavera C, A. 2004. Propuesta de un modelo experimental de enteritis aguda inducida por indometacina en ratas albinas. *Rev. Inv. Vet. Perú*, 15(1), 37–43.
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. 2004. Evolutionary Families of Peptidase Inhibitors. *The Biochemical Journal* 378: 705–16.
- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. 2008. MEROPS: The Peptidase Database. *Nucleic Acids Research Nucleic Acids Research Vol. 36, Database issue* doi:10.1093/nar/gkm954
- Reyes Rocha BL. 2011. Efecto de la administración de la fracción concentrada en lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre el sistema inmune. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencias de la Salud. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Rodak B. 2005a. Hematología: Fundamentos y Aplicaciones Clínicas. Libro de consulta, editorial Médica Panamericana. disponible en:

- http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=rFqhpbnKnWX8C&oi=fnd&pg=PA3&dq=Hematolog%C3%ADa:+fundamentos+y+aplicaciones+cl%C3%A9nicas&ots=spmy8prb_s&sig=i0QWIZYFqI0ltRen9ssvWIm1CBQ.
- Rodak B. 2005b. Hematología: Fundamentos y Aplicaciones Clínicas. Editorial Médica Panamericana. Disponible en: http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=rFqhpbnKnWX8C&oi=fnd&pg=PA3&dq=Hematolog%C3%ADa:+fundamentos+y+aplicaciones+cl%C3%A9nicas&ots=spmy8prb_s&sig=i0QWIZYFqI0ltRen9ssvWIm1CBQ.
- Rollins, A. 2009. Sistema inmune y c. doi:10.1016/S0304-5412(09)70601-8. Revisado en: <http://dc172.4shared.com/doc/e3B6LGeh/preview.html>
- Rosas JC, Erazo JD, Moncada JR. 1991. Tolerancia a la sequia en germoplasma de frijol comun y frijol tepari. CEIBA 32(2): 91–106.
- Ryan CA, Pearce G. 1998. Systemin: a Polypeptide Signal for Plant Defensive Genes. Annual Review of Cell and Developmental Biology 14:1–17.
- SAGARPA. 2005. “Situación Actual y Perspectiva de Frijol En México 2000-2005” Disponible en: http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaDerivada/ComercioExterior/Estudios/Perspectivas/Frijol00-05.pdf
- Schaller A. 2004. A Cut Above the Rest: The Regulatory Function of Plant Proteases. Planta 220(2):183–197.
- Serviexotic. (2011). Eritrocito inmaduro y trombocito. Tomado de: http://www.serviexotic.com/?attachment_id=480
- Sharon N, Lis H. 2004. History of Lectins: From Hemagglutinins to Biological Recognition Molecules. Glycobiology 14(11): 53R–62R.
- Valadez-Vega C., Guzmán-Partida AM., Soto-Cordova FJ., Álvarez-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 2011a, 16, 2561-2582;

doi:10.3390/molecules16032561.

ISSN

1420-3049.

www.mdpi.com/journal/molecules

- Valadez-Vega C., Alvarez-Manilla G., Riverón-Negrete L., García-Carrancá A., Morales-González JA., Zuñiga-Pérez C, Madrigal-Santillán E., Esquivel-Soto J., Esquivel-Chirino C., Villagómez-Ibarra R.,Bautista M., I Morales-González A., 2011b. Detection of Cytotoxic Activity of Lectin on Human Colon Adenocarcinoma (Sw480) and Epithelial Cervical Carcinoma (C33-A). *Molecules* 2011, 16, 2107-2118; doi:10.3390/molecules16032107. ISSN 1420-3049. www.mdpi.com/journal/molecules
- Vivanco JM, Cosio E. 2005. Mecanismos Químicos De Defensa En Las Plantas. *Rev. Investigación y Ciencia* pp- 68-75.