

03062 6  
2ej.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de  
Postgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades.**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas.**



**EFFECTO DE LAS LECTINAS DE DOS VARIETADES DE FRIJOL SOBRE  
LA RESPUESTA INMUNE INTESTINAL EN RATAS.**

**T E S I S**  
Que para obtener el Grado de  
**MAESTRIA EN INVESTIGACION  
BIOMEDICA BASICA**  
p r e s e n t a

**Q.F.B. Francisco Enrique Gómez Rodríguez**

México, D. F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1992



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE GENERAL

I. INTRODUCCION .....	1
1. EFECTOS PRODUCIDOS POR LA INGESTION DE LECTINAS EN LA DIETA .....	3
2. SISTEMA INMUNE ASOCIADO AL INTESTINO .....	7
3. INDUCCION DE LA RESPUESTA INMUNE INTESTINAL. ....	11
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	16
III. OBJETIVOS .....	18
IV. MATERIALES Y METODOS .....	19
1. SELECCION DE LAS SEMILLAS .....	19
2. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS SALINOS. ....	19
3. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE LAS DOS VARIEDADES DE FRIJOL. ....	20
3.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE .....	20
3.2. ANALISIS ELECTROFORETICO EN GELES DE POLIACRILAMIDA. ....	21
3.3. ANALISIS POR "WESTERN BLOT". ....	22
4. CARACTERIZACION BIOLOGICA DE LA DIETA COMERCIAL PARA ROEDORES "Purina". ....	23
4.1. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE. ....	24
4.2. ACTIVIDAD MITOGENICA. ....	24
5. ENSAYOS BIOLOGICOS <i>in vivo</i> CON LOS EXTRACTOS SALINOS DE LAS DOS VARIEDADES DE FRIJOL. ....	25
5.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS CELULAS MONONUCLEARES TOTALES DE LOS DIFERENTES ORGANOS LINFOIDES .....	27
6. ANALISIS ESTADISTICO. ....	29

<b>V. RESULTADOS Y DISCUSION. ....</b>	<b>30</b>
<b>1. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE. ....</b>	<b>30</b>
<b>2. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LOS EXTRACTOS</b>	
<b>SALINOS. ....</b>	<b>34</b>
<b>2.1 GELES DE POLIACRILAMIDA ....</b>	<b>34</b>
<b>2.2 ANALISIS POR "WESTERN BLOT" ....</b>	<b>37</b>
<b>3. CARACTERIZACION BIOLOGICA DE LA DIETA COMERCIAL</b>	
<b>"Purina". ....</b>	<b>40</b>
<b>3.1. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE. ....</b>	<b>40</b>
<b>3.2. ACTIVIDAD MITOGENICA ....</b>	<b>41</b>
<b>4. ENSAYOS BIOLOGICOS. ....</b>	<b>42</b>
<b>4.1 ACTIVIDAD MITOGENICA <i>in vivo</i> DE LOS EXTRACTOS</b>	
<b>SALINOS CRUDOS Y COCIDOS DE LAS DOS</b>	
<b>VARIEDADES DE FRIJOL ....</b>	<b>42</b>
<b>VI. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>54</b>
<b>1. PROPIEDADES BIOLOGICAS Y FISICOQUIMICAS DE LAS LECTINAS</b>	
<b>CONTENIDAS EN LOS EXTRACTOS SALINOS DE LAS DOS</b>	
<b>VARIEDADES DE FRIJOL. ....</b>	<b>54</b>
<b>2. ACTIVIDAD MITOGENICA <i>in vivo</i> DE LA PHA CONTENIDA EN LOS</b>	
<b>EXTRACTOS SALINOS OBTENIDOS DE LAS DOS VARIEDADES</b>	
<b>DE FRIJOL. ....</b>	<b>55</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. ....</b>	<b>57</b>
<b>VIII. ANEXOS. ....</b>	<b>64</b>

## INDICE DE CUADROS

No.	Página
1.	ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS SALINOS CRUDOS Y COCIDOS DE LAS DOS VARIETADES DE FRIJOL ..... 30
2.	ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE FRIJOL, CON Y SIN REMOJO PREVIO, Y DEL AGUA DE REMOJO ..... 32
3.	ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS SALINOS OBTENIDOS DE LA DIETA COMERCIAL "PURINA", DE LAS HECE DE RATAS ALIMENTADAS CON ELLA Y DE LA PHA COMERCIAL PURIFICADA ..... 40
4.	ACTIVIDAD MITOGENICA DEL EXTRACTO DE LA DIETA "Purina" Y DE LA PHA COMERCIAL, SOBRE ESLENOCITOS DE RATA ..... 41

## INDICE DE FIGURAS

No.		Página
1.	PATRON ELECTROFORETICO DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE LAS DOS VARIEDADES DE FRIJOL, EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES (CONDICIONES NATIVAS) .....	35
2.	PATRON ELECTROFORETICO DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE LAS DOS VARIEDADES DE FRIJOL, EN CONDICIONES SEMI-DESNATURALIZANTES .....	36
3.	"WESTERN BLOT" DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE FRIJOL BAYO, DESPUES DE SU SEPARACION ELECTROFORETICA EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES (CONDICIONES NATIVAS) .....	38
4.	"WESTERN BLOT" DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE FRIJOL BAYO, DESPUES DE SU SEPARACION ELECTROFORETICA EN CONDICIONES SEMI-DESNATURALIZANTES .....	39
5.	ACTIVACION DE LAS CMNT OBTENIDAS DE LAS RATAS QUE RECIBIERON PBS POR 30 DIAS (GRUPO CONTROL) .....	43
6.	ACTIVACION DE LAS CMNT OBTENIDAS DE LAS RATAS QUE RECIBIERON EL EXTRACTO COCIDO DE FRIJOL BAYO POR 30 DIAS. ....	44
7.	ACTIVACION DE LAS CMNT OBTENIDAS DE LAS RATAS QUE RECIBIERON EL EXTRACTO COCIDO DE FRIJOL NEGRO POR 30 DIAS. ....	45
8.	ACTIVACION DE LAS CMNT OBTENIDAS DE LAS RATAS QUE RECIBIERON EL EXTRACTO CRUDO DE FRIJOL BAYO POR 3, 7, 14 Y 30 DIAS. ....	46
9.	ACTIVACION DE LAS CMNT OBTENIDAS DE LAS RATAS QUE RECIBIERON EL EXTRACTO CRUDO DE FRIJOL NEGRO POR 3, 7, 14 Y 30 DIAS. ....	47
10.	ACTIVACION DE LAS CMNT OBTENIDAS DE LAS RATAS QUE RECIBIERON PHA (0.15 mg/ml) EN PBS POR 14 DIAS. ....	50
11.	ACTIVACION DE LAS CMNT OBTENIDAS DE LAS RATAS QUE RECIBIERON PHA (0.15 mg/ml) EN EL EXTRACTO COCIDO DE FRIJOL BAYO POR 14 DIAS. ....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS.

ASB-V	fracción V de albúmina sérica bovina.
B	bazo
BALT	tejido linfoide asociado a los bronquios.
Bq	Bequerel.
°C	grados centígrados (Celsius).
Ci	Curie.
CMNT	células mononucleares totales.
cpm	cuentas por minuto.
CS	componente secretor.
G	gravedad.
g	gramo.
GALT	tejido linfoide asociado al intestino.
h(s)	hora(s).
HBSS-CMF	solución salina balanceada de Hank, libre de calcio y de magnesio.
HEV	vénulas endoteliales "altas".
HLA	sistema principal de histocompatibilidad (humano).
HRP	peroxidasa de rábano.
I	intestino.
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular-1.
IEL	linfocitos intraepiteliales.
Ig	inmunoglobulina (anticuerpo), seguida de una letra.
IL	interleucina (interleuquina), seguida de un número.
kDa	kilodalton.
l	litro.
LFA-1	antígeno asociado a la función de linfocitos-1.
LPL	linfocitos de la lámina propia.
M	concentración molar.
mA	miliampere.
MALT	tejido linfoide asociado a las mucosas.
mCi	milicurie.
µCi	microcurie.
mg	miligramo.
µg	microgramo.
min	minuto.
mM	milimolar.
µm	micrómetro (micra).
ml	mililitro.
µl	microlitro.
NC	nitrocelulosa.
NM	nódulos mesentéricos.
PBS	solución amortiguadora de fosfatos.
PHA	fitohemaglutinina.
POPOP	(p-bis-2-(5-feniloxazolil)-benceno.
PPO	2,3-difeniloxazol.

PP	placa de Peyer.
prot	proteína.
rpm	revoluciones por minuto.
SDS	dodecil sulfato de sodio.
SFT	suero fetal de ternera.
TBS	solución salina amortiguada con TRIS.
TCR	receptor de célula T.
Th	linfocito T cooperador/inductor.
tim-H <sup>3</sup>	timidina tritiada.
TRIS	trihidroximetil amino metano.
Ts	linfocito T supresor/citotóxico.
Tween 20	polioxietylén sorbitán monolaurato (20).
U	unidades.
V	volt.

## I. INTRODUCCION

Tradicionalmente, el tubo digestivo se ha estudiado bajo la perspectiva de sus funciones dentro de la nutrición, es decir, como el órgano donde ocurre la digestión enzimática de los alimentos ingeridos en la dieta (proteínas, lípidos y polisacáridos) y de absorber los componentes básicos que los constituyen (aminoácidos, ácidos grasos y monosacáridos, respectivamente).

Además de estas funciones, el aparato digestivo y en especial el intestino delgado, cumple un papel de protección muy importante contra cientos de sustancias potencialmente dañinas que diariamente ingresan en él (1-3).

Estas sustancias son ingeridas principalmente junto con los alimentos de diferentes maneras: algunas son agregadas intencionalmente durante su producción (fertilizantes, pesticidas), su procesamiento (estabilizantes) y su conservación (antioxidantes, aditivos), o bien, pueden ser el resultado de la contaminación de los alimentos por microorganismos y sus productos (bacterias, hongos y sus toxinas). Por otro lado, algunos alimentos contienen sustancias que están presentes en ellos de manera natural, los cuales pueden ocasionar diferentes alteraciones, como los alérgenos (4), algunos aminoácidos no fisiológicos (L-canavanina), proteínas que al hidrolizarse enzimáticamente producen péptidos con acción tóxica en sujetos susceptibles (proteínas del gluten) (5) y los llamados factores "antinutricionales" o "antifisiológicos" (5-8). Estos últimos, comprenden a inhibidores de enzimas (inhibidor de la tripsina, de la quimotripsina y de la  $\alpha$ -amilasa), factores productores de bocio y de latirismo, fitatos, saponinas, glucósidos cianogénicos, oligosacáridos que producen flatulencia (estaquiosa, rafinosa) y las hemaglutininas o lectinas (6-10).

En la mayoría de las ocasiones, ninguna de estas sustancias produce daño o alteración en las funciones normales del tracto gastrointestinal, debido a que son inactivadas o destruidas por los procesos digestivos normales, o simplemente no son

absorbidas y se eliminan con las heces. Junto con ésto, los métodos empleados en el procesamiento y la preparación de los alimentos contribuyen a su inactivación y su destrucción. Los tratamientos térmicos (cocción) a base de calor seco y húmedo que se emplean en la preparación de la mayoría de los alimentos, constituyen el principal mecanismo de inactivación de estas sustancias (6-8, 11-16).

Desde el punto de vista nutricional, los factores antifisiológicos mas importantes son los inhibidores de proteasas (inhibidores de la tripsina, de la quimotripsina y de la elastasa), y las lectinas (11-16), debido a que ambos se encuentran ampliamente distribuidos en un gran número de productos de origen vegetal, principalmente en los pertenecientes a las familias *Leguminosae* (frijoles, lentejas) (17), *Graminae* (cereales) y *Solanaceae* (papa y jitomate) (6,8,10,13-17), así como por su gran resistencia a la inactivación por calor.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*), constituye una fuente importante de proteína y de energía para gran parte de la población mundial y ha formado parte de la dieta humana desde hace miles de años. A pesar de su notable papel en la dieta, desde hace tiempo se sabe que estas semillas son tóxicas para el ser humano y para otros animales, cuando son consumidas en forma cruda (6,8,12-16).

La ingestión de semillas crudas de frijol, resulta en síntomas de toxicidad, tanto para el ser humano como para diferentes especies animales. Es de notable importancia práctica que las formas más tóxicas de las lectinas son, al mismo tiempo, las más resistentes a la inactivación por calor (6,8,12,13,15).

Además, existen algunas condiciones que también pueden incidir para disminuir la inactivación térmica de las lectinas, tales como la localización geográfica de algunos lugares situados a gran altitud sobre el nivel del mar (una situación muy frecuente en gran parte de Latinoamérica), lo que ocasiona la disminución del punto de ebullición del agua, a veces hasta los 85°C.

Los tratamientos térmicos empleados en la cocción de las semillas del género *Phaseolus*, no solo mejoran su digestibilidad sino que además, constituyen el principal mecanismo de inactivación de los inhibidores de proteasas y de las lectinas (5,6,8,11,13). Actualmente se sabe que el mejor indicador para determinar la eficiencia de los tratamientos térmicos, sobre el mejoramiento de la digestibilidad de las semillas, no es la actividad del inhibidor de tripsina, sino que es mas apropiado la detección de la actividad de las lectinas (8,11,15).

## **1. EFECTOS PRODUCIDOS POR LA INGESTION DE LECTINAS EN LA DIETA.**

Se ha demostrado que un gran número de alimentos, tanto naturales como procesados, contienen cantidades importantes de lectinas lo que significa que la dieta representa, por sí misma, el principal medio de exposición a estas proteínas (18,19). Esto representa un riesgo potencial de que alguna porción de la población pueda presentar algún trastorno del tubo digestivo, tales como vómito, diarrea, inflamación intestinal, síndromes de mala absorción o enfermedad celíaca (5,8,20,21)

Aunque sería de esperarse que los tratamientos térmicos y los procesos digestivos normales neutralicen o destruyan la actividad de las lectinas ingeridas con la dieta, esto no es necesariamente cierto: se ha reportado que en algunos productos de panificación, preparados a base de harinas de frijol crudo, merecen ser considerados con precaución, debido a que las lectinas resisten la inactivación por calor seco, hasta por 18 horas (11,13).

Por otro lado, algunas lectinas son resistentes a la digestión proteolítica que ocurre en el tracto digestivo, como la lectina de germen de trigo (WGA), del jitomate y del frijol (PHA), ya que se les ha recuperado intactas en las heces de animales alimentados con ellas (20-22).

Un gran número de lectinas presentes en los alimentos, escapan a uno ó a ambos mecanismos de inactivación, por lo que son capaces de interactuar con secreciones, células y microflora del tracto digestivo y ocasionan diversos trastornos anatómicos y funcionales, tanto a nivel intestinal como a nivel sistémico.

La administración de lectinas en animales de experimentación, por vía oral o por inyección intrainestinal, en forma de extractos salinos o en forma purificada, ocasionan cambios morfológicos y metabólicos en el intestino tales como el acortamiento de las vellosidades intestinales (21,23,24), rompimiento del "borde en cepillo" de las microvellosidades intestinales (21,24), aumento del peso del intestino debido a la hipertrofia y la hiperplasia de las células (25,26), disminución en la actividad de enzimas asociadas al epitelio de la mucosa (27-29) y aumento en el contenido de moco por el vaciamiento de las células caliciformes (30).

A nivel sistémico, algunas lectinas como la fitohemaglutinina (PHA), producen cambios en el tamaño y en el peso de diferentes órganos: el páncreas aumenta su tamaño de manera dosis-dependiente en ratas, junto con una disminución en la concentración de insulina produciendo un aumento en el catabolismo general y la pérdida de masa muscular (ambos procesos contribuyen al aumento observado en la excreción fecal y urinaria de nitrógeno). También se produce un aumento en el peso del hígado (debido principalmente al aumento en la síntesis proteica, acompañado por la disminución en el contenido de lípidos y de glucógeno) y atrofia del timo (25). A nivel sanguíneo, se produce un aumento en la concentración de cuerpos cetónicos (principalmente de  $\beta$ -hidroxibutirato), así como un incremento en el contenido total de agua corporal (23,25,31).

De las lectinas que resisten la hidrólisis enzimática, algunas pueden unirse a las células epiteliales del intestino y producen una disminución en la absorción de algunos nutrimentos individuales mediante un mecanismo de interferencia inespecífico, como

ocurre para el caso de la glucosa (32), de los lípidos (triglicéridos y ácidos grasos), del nitrógeno (proteico y no proteico) y de la vitamina B<sub>12</sub> (28,32).

El grado y el sitio de unión en las diferentes porciones del intestino, dependen de la especificidad de la lectina y de la presencia de los azúcares para los cuales es afín, en la superficie de las células que forman la mucosa intestinal (28, 32, 33). A este respecto, se ha demostrado que algunas lectinas, como la de *Phaseolus vulgaris* (PHA) y la de *Sambucus nigra-II* (SNA-II), se unen fuertemente al epitelio del intestino delgado, mientras que otras lo hacen con menor intensidad, como la lectina de soja (*Glycine max*, SBA) y de *Sambucus nigra-I* (SNA-I), mientras que algunas otras lectinas no se unen al epitelio del intestino, como ocurre con la lectina de haba (*Vicia faba*, VFL) y de *Galanthus nivalis* (GNA) (33).

Existe una relación directa entre el grado de unión de las lectinas al epitelio intestinal y su toxicidad: mientras mayor es su unión, mayor es su toxicidad. Esto se debe a que una vez que se ha unido a las células epiteliales, la lectina es endocitada rápidamente e incorporada al torrente sanguíneo, por lo que puede alcanzar diferentes órganos periféricos como el hígado, el riñón, el páncreas y el bazo. Se ha demostrado que después de la administración intragástrica de una dosis de 50 mg de PHA a ratas, cerca del 10% se encuentra distribuida en la sangre y en diferentes órganos, en tan solo 3 horas (34).

Además de sus propiedades como agentes tóxicos, las lectinas actúan como potentes factores de crecimiento para el intestino delgado: mientras mayor es el retraso en el crecimiento del organismo, mayor es el grado de hiperplasia intestinal (23, 25, 26,29,31,33-36). El aumento en el tamaño del intestino, está precedido por la acumulación de poliaminas en el intestino (26, 34,37-39), así como del aumento en el contenido de ácidos nucleicos (ADN y ARN)(25,26,34,35,37). Estos eventos también están íntimamente relacionados con el grado de toxicidad de las lectinas, el cual depende de la unión de la lectina con su receptor en la superficie de las células epiteliales, de su internalización

mediante endocitosis y de las señales intracelulares accesorias que producen el crecimiento del intestino.

A diferencia de lo que ocurre con otras proteínas de origen dietario, las lectinas exhiben propiedades inmunológicas similares cuando se les administra por vía enteral o parenteral, lo que indica que pueden atravesar el epitelio intestinal en cantidades apreciables (34,40).

La administración oral de las lectinas también se ha asociado con un aumento en la flora bacteriana normal del yeyuno y del ileon, aunado a un aumento en la adherencia bacteriana al epitelio intestinal e invasión de los tejidos subyacentes (28). La toxicidad de la PHA aumenta en relación directa con el número de coliformes, ya que se ha observado que en animales abióticos, la PHA no es tóxica. En estos casos se ha demostrado que el aumento en la población de coliformes se debe exclusivamente a la PHA, puesto que al utilizar otra variedad no tóxica de frijol (Pinto III), el aumento en la población bacteriana es insignificante. Mas aún, el efecto de la PHA sobre la población bacteriana puede ser revertido, eliminando a la lectina de la dieta (37).

El mecanismo por el cual la PHA resulta altamente tóxica para animales convencionales, a diferencia de lo que ocurre en animales abióticos, no está del todo claro, aunque se supone que está mediado por un efecto indirecto: la actividad de la PHA como factor de crecimiento, aumenta el recambio de las células del epitelio intestinal y favorece la aparición de formas inmaduras (ricas en manosa) de los receptores en la membrana, los cuales sirven a la fimbria de la *E. coli* como "puntos de anclaje" en la superficie celular (33).

Otra posibilidad para explicar el aumento en el número de bacterias, la cual aún no ha sido explorada totalmente, es que la PHA modifica o altera los mecanismos de defensa naturales e inmunes, asociados al intestino delgado.

En el caso de los mecanismos naturales, el principal efecto de la PHA sería el de romper la protección mecánica que representa la mucosa intestinal, permitiendo el acceso hacia el interior del organismo a diferentes sustancias, tales como proteínas, toxinas, sustancias químicas y microorganismos.

Por otro lado, aunque es bien conocido el efecto de la PHA como mitógeno para linfocitos T, son escasos los reportes en la literatura acerca de la estimulación de esta población linfoide en el ambiente intestinal (41-43), así como de las posibles modificaciones que operan en los mecanismos de defensa a nivel celular.

Esta dificultad obedece a varias razones: en primer lugar, las reacciones inmunes asociadas al intestino frecuentemente ocurren de manera independiente a las de la inmunidad sistémica, lo cual se debe a la distribución característica de la población de células linfoides en el intestino (1-3,44-46). En segundo lugar, el tracto gastrointestinal debe efectuar la delicada tarea de prevenir o limitar el ingreso de los cientos de sustancias con las que diariamente entra en contacto, sin interferir con las funciones normales de digestión y de absorción.

## **2. SISTEMA INMUNE ASOCIADO AL INTESTINO.**

Desde el punto de vista inmunológico, el intestino es un órgano que participa activamente en los mecanismos de defensa específicos del organismo. El sistema inmune asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés), forma parte de un sistema de protección especializado que se conoce como Sistema Inmune Asociado a las Mucosas (MALT), dentro del cual también se incluye al sistema inmune asociado a los bronquios (BALT)(1-3,44,46).

Considerado como órgano linfoide, el intestino posee el mayor número de células inmunocompetentes (70-80%), que las que tienen el bazo, los nódulos linfáticos y la médula ósea en conjunto (20-30%) (3). Estas células linfoides, están distribuidas a todo

lo largo del intestino y se encuentran en forma dispersa o formando agregados linfoides (placas de Peyer). Las células linfoides que están en forma dispersa, ocupan una disposición característica en el tejido, que les permite mantener y regular lo que se conoce como "estado crónico de inflamación intestinal" (47). Para realizar estas funciones de protección, el GALT contiene diferentes poblaciones celulares: linfocitos (T y B), células NK, macrófagos, células cebadas y eosinófilos.

Recientemente se ha incluido dentro de este "repertorio" inmunológico a las células epiteliales que constituyen la mucosa intestinal, ya que presentan características especiales que hacen suponer su participación en la respuesta inmune a nivel intestinal (47-51):

- debido a su ubicación, las células epiteliales constituyen la interfase entre los antígenos dietarios y ambientales con las células que constituyen el sistema inmune del intestino.
- participan activamente en la respuesta inmune humoral de las mucosas, mediada por IgAs, ya que ellas sintetizan el componente secretor (CS) necesario para el ensamble y el transporte de esta clase de inmunoglobulina.
- están en contacto directo con una población especial de células linfoides, los linfocitos intraepiteliales (IEL, por sus siglas en inglés), así como con las proyecciones citoplásmicas de los histiocitos de la lámina propia.
- participan activamente en la degradación final de los alimentos y de algunos antígenos, por la acción de las enzimas en la porción luminal de su membrana.
- expresan moléculas del sistema HLA de clase II de manera constitutiva, principalmente DR (Ia), y son capaces de actuar como células presentadoras de antígenos, en diferentes sistemas *in vitro*. Dicha actividad, puede ser inhibida por la adición de anticuerpos anti-DR (Ia) (49,50).

Las células linfoides que se encuentran dispersas en el intestino, pueden ser de dos tipos principales.

Unas se localizan entre las células que forman el epitelio intestinal y se conocen como **linfocitos intraepiteliales (IEL)**, en una proporción de 10 a 30 linfocitos por cada 100 células epiteliales. En su mayoría (80 a 90%), son linfocitos T cuyo fenotipo es supresor/citotóxico (Ts, CD8+); el resto de las células se cree que son células NK, células cebadas u otro tipo celular que no muestra ninguna relación con los marcadores de superficie con que se cuenta actualmente. Otra característica importante de los IEL, es que no se encuentran linfocitos B dentro de esta población (3, 52-54). Debido a su estrecha interacción con los enterocitos y a su proximidad con la luz del intestino, los IEL participan activamente en la respuesta inmune intestinal, además de regularla para evitar daños en la mucosa.

Las células linfoides que se localizan por debajo de la membrana basal, dentro del tejido conectivo que la sostiene, se conocen como **linfocitos de la lámina propia (LPL)** e incluye a linfocitos B (30%), linfocitos T (35%) y macrófagos.

La mayoría de los linfocitos B (35-50%) contienen IgA en su citoplasma (IgA<sub>1</sub> + IgA<sub>2</sub>), seguidos de linfocitos B IgM+(9%), IgG+(2%) y en menor proporción IgD+ o IgE+ (< 1%)(52-54).

La mayoría de los linfocitos T de la lámina propia (35%), presentan el marcador CD4+ (Th, cooperador/inductor), aunque también se encuentran células Ts-CD8+ (12 a 15%). La relación CD4+/CD8+ es de 4:1 (41, 52-55), lo que refleja la estrecha colaboración de las células Th en la maduración y diferenciación de los linfocitos B y aún con las células Ts.

El tejido linfoide que se encuentra en forma de agregados lo constituyen las **placas de Peyer (3,44,46,55)**; su número varía dependiendo de la especie (de 20 a 30 en el humano, y alrededor de 12 en el ratón) y son mas abundantes y mas grandes en la porción terminal del intestino (ileon). La mayoría de los estudios que se han realizado

sobre las funciones de las células del GALT, se han efectuado con células aisladas de las placas de Peyer.

Anatómicamente, cada placa de Peyer consiste de pequeños agregados de folículos linfoides, cada uno con un centro germinal constituido principalmente por linfocitos B IgA+ (40-70%). La zona interfolicular, particularmente la mas cercana a la luz intestinal, contiene linfocitos Th (CD4+), Ts (CD8+) y los llamados linfocitos "T contrasupresores" (Tcs), los cuales pueden potenciar la respuesta inmune contra antígenos en el tracto intestinal (2,3,44-46).

La superficie de las placas de Peyer está cubierta por un epitelio especializado que se conoce como "epitelio asociado al folículo" (FAE, por sus siglas en inglés). Este consiste en células epiteliales de forma cuboide (HLA-II+), muy pocas células caliciformes y una célula especializada en el transporte de antígenos, conocida como célula M (debido a que en su superficie apical presenta "micropliegues" en lugar de microvellosidades).

La célula M posee numerosas mitocondrias debajo de la porción apical de su membrana, así como numerosas vesículas con las cuales endocita y transporta moléculas y microorganismos, y contiene pocos lisosomas. Su núcleo se localiza en la porción basal y su citoplasma generalmente "rodea" a una o mas células que la "penetran", las cuales pueden ser linfocitos, linfoblastos, macrófagos, células plasmáticas y, menos frecuente, polimorfonucleares (57). Estas células no están dentro de la célula M, sino en el espacio intercelular que forma una "mella" en su citoplasma, formando lo que se conoce como "hoyo central".

La célula M es capaz de pinocitar antígenos solubles (ferritina, peroxidasa) y de fagocitar antígenos particulados (virus, bacterias) y transportarlos intactos a través del epitelio hacia el tejido linfoide del interior de la placa de Peyer. Debido a que la célula M no posee moléculas del HLA de clase II, ésta no participa en el procesamiento

antigénico, así como tampoco lo hace en el transporte de la IgAs por carecer de CS (55-58); sin embargo, la IgAs facilita la ingestión de antígenos por la célula M, tales como virus y bacterias (59-61). La célula M tampoco participa en la digestión o en la absorción de los nutrimentos en el intestino(57).

Los nódulos mesentéricos (NM), aunque están localizados "fuera" del ambiente intestinal, también participan en la generación de la respuesta inmune en el intestino, sobre todo en la maduración y diferenciación de las células T y B que fueron estimuladas en el GALT. Los NM consisten en una cadena de nódulos individuales unidos estrechamente por vasos linfáticos cortos, a través de los cuales se comunican. La disposición histológica de estos nódulos, es similar a la del resto del organismo. Se distinguen 3 áreas principales (de afuera hacia adentro): la corteza (córTEX), la zona adyacente a la corteza (paracórTEX) y la médula. La corteza es rica en células B, el paracórTEX contiene principalmente linfocitos T, mientras que en la médula la proporción de células B y T es similar, aunque el número de células es menor.

### **3. INDUCCION DE LA RESPUESTA INMUNE INTESTINAL.**

Como se mencionó previamente, la mayor carga antigénica que recibe el organismo viene del medio ambiente junto con los alimentos, el agua y el aire, por lo que el primer contacto que tienen es con la superficie de las mucosas intestinal y respiratoria.

Para que un antígeno pueda estimular a las células linfoides del MALT, primero debe conservar su antigenicidad o su viabilidad conforme atraviesa el tracto gastrointestinal, haciendo frente a las secreciones digestivas (HCl, proteasas, lipasas, etc.) y segundo, alcanzar la superficie de la mucosa en cuestión (intestinal o bronquial), atravesar el epitelio y ser ingerido y procesado por los macrófagos en la capa subepitelial, para posteriormente ser presentado a las células de la respuesta inmune.

En el caso de los antígenos que ingresan por vía oral, algunos residen temporalmente en el intestino y son eliminados posteriormente con las heces, mientras que otros, inducen la generación de una respuesta inmune local específica, debido a que son capaces de atravesar la barrera que representa la mucosa intestinal (49).

La principal vía de entrada hacia el GALT lo constituyen las placas de Peyer. La superficie de las placas de Peyer favorece la unión de la mayoría de los antígenos a nivel intestinal, debido a que su epitelio presenta vellosidades más cortas, así como una menor cantidad de glicocálix y de moco (esto último, debido al menor número de células caliciformes) (62). Después de su unión, el evento que inicia la respuesta inmune intestinal, es la ingestión de los antígenos por la célula M. Cabe mencionar que existen algunas condiciones que pueden alterar el transporte de los antígenos a nivel intestinal, como una deficiencia local de anticuerpos (particularmente IgAs), alteraciones en la barrera mucosa (inflamación, ulceración) o por factores dentro de la luz intestinal (aclorhidria, insuficiencia pancreática) (63).

Una vez ingeridos, los antígenos son endocitados y transportados en vesículas en el interior de la célula M, y son liberados en la porción basal de la célula, liberándolos para que entren en contacto con las células linfoides localizadas por debajo del epitelio (64). Durante su transporte intracelular, los antígenos no sufren ninguna modificación y son liberados en la misma forma en la que fueron ingeridos (46). Como se mencionó, la célula M no posee moléculas del HLA de clase II por lo que no son capaces de presentar antígenos, sino que esta función la realizan otro tipo de células, como los linfocitos B, los macrófagos o las células dendríticas, dentro de la placa de Peyer.

Los linfocitos B de la placa de Peyer normalmente expresan IgM en su membrana (mIgM+) aunque posteriormente expresan IgA de membrana (mIgA+); este cambio en isotipo está regulado por una población especial de linfocitos Th CD4+, conocidos como linfocitos T de "switch", los cuales inducen el rearrreglo genómico en los linfocitos B para cambiar el isotipo de inmunoglobulina en su superficie (1,65-67)

**Después de haber sido estimulados por el antígeno, los linfocitos T y B de la placa de Peyer empiezan a proliferar y migran desde el MALT hacia los nódulos mesentéricos a través de los vasos linfáticos eferentes, en donde la respuesta inmune se regula y amplifica (65). En el caso de los linfocitos B IgA+, estos terminan su diferenciación y secretan anticuerpos, mientras que los linfocitos T continúan su proliferación y diferenciación.**

**Después de abandonar los nódulos mesentéricos a través de los vasos linfáticos eferentes, los linfocitos T y B llegan al conducto torácico y de ahí, a la circulación general, de donde pueden diseminarse a todo el organismo.**

**Se ha demostrado que las células plasmáticas productoras de IgA que fueron estimuladas en el GALT regresan al sitio donde originalmente ocurrió su activación (fenómeno conocido como "homing"), además de que también se pueden dirigir hacia otros sitios asociados a mucosas, como el tracto respiratorio y el aparato genitourinario, y a diferentes órganos de secreción exócrina como las glándulas lagrimales, salivales y mamarias (2,3,44-46,68-72). De esta forma, existe una comunicación directa entre los diferentes tejidos asociados a mucosas ya que la inducción de una respuesta inmune específica en una mucosa, produce el mismo tipo de respuesta específica en otras.**

**Esta interacción, dió origen al concepto de la existencia de un SISTEMA INMUNE COMUN DE LAS MUCOSAS (1-3,40,44-46,68-72), el cual resulta altamente benéfico en situaciones en las que un mismo antígeno afecta dos sitios simultáneamente. Recientemente se ha dado un gran interés a la inducción de respuestas inmunitarias, principalmente mediadas por IgAs, para la elaboración de vacunas contra agentes infecciosos que se asientan en las mucosas, o bien, cuya vía de acceso es a través de ellas. Este es el caso de las vacunas para prevenir la caries dental, contra bacterias entéricas que producen diarrea o de enfermedades venéreas como la gonorrea (44,73-75).**

Los diferentes patrones de migración de los linfocitos originados en el GALT, no ocurren al azar sino que se deben a la presencia de moléculas en la superficie de los linfocitos, que las "guían" hacia el órgano donde finalmente van a alojarse. Estas moléculas se conocen como "receptores de alojamiento" ("homing receptors") y son específicos para el tipo de linfocito (es decir, son célula-específico) y para el tipo de órgano (tejido-específico)(76-79). De este modo, es posible comprender la predominancia de linfocitos B IgA+ en los tejidos asociados a mucosas y de linfocitos T en nódulos linfáticos periféricos. Estas moléculas se han detectado con el uso de anticuerpos monoclonales, tanto en humano (CDw44), la cual es reconocida por el anticuerpo monoclonal Hermes-3 (79), como en ratón (MEL-14). También son necesarias otras moléculas accesorias que participan en el reforzamiento de la adhesión del linfocito con el tejido. A la fecha, se ha descrito el "antígeno asociado a la función de linfocitos-1" (LFA-1), tanto en humanos como en ratón

El proceso de extravasación linfocítica hacia los diferentes tejidos linfoides, ocurre en vénulas postcapilares especializadas conocidas como "vénulas endoteliales altas" (HEV), presentes en todos los tejidos linfoides secundarios (nódulos linfáticos, placas de Peyer), con excepción del bazo. El endotelio de las HEV está constituido por células grandes de tipo columnar (de ahí su nombre de "altas"). La unión de los linfocitos con las células del HEV es el paso esencial para abandonar la circulación y penetrar a los diferentes órganos linfoides. Los receptores de "alojamiento" (homing receptors) en la superficie de los linfocitos, se unen específicamente a unas moléculas de superficie en las células del HEV, conocidas como "adresinas vasculares" ("vascular addressins") (76-79). En el ratón, se han detectado las adresinas reconocidas por los anticuerpos monoclonales MECA-367 y MECA-79, en las HEV de las placas de Peyer y de los nódulos linfáticos periféricos, respectivamente. En el hombre, se ha detectado la "molécula de adhesión intercelular-1" (ICAM-1) con el uso del monoclonal RR1/1, y se ha comprobado que es el ligando para el LFA-1 (77).

Por último, una vez que el linfocito (T o B) se unió al endotelio de las HEV, éste atraviesa la pared vascular y alcanza el órgano linfoide para establecer la respuesta inmune específica contra el antígeno que originó su activación y diferenciación. Al principio se creía que el linfocito cruzaba directamente a través de la célula endotelial a través de un sistema de transporte transcelular, pero más tarde se demostró que el linfocito lo hace entre las células mediante un sistema de transporte intercelular (76-79).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) ha sido objeto de múltiples investigaciones de tipo químico, toxicológico, bioquímico y nutricional, lo cual obedece a la gran cantidad de sustancias consideradas como "antinutricionales" y a que su consumo es muy elevado tanto en nuestro país, como en otros países en desarrollo.

Como se mencionó anteriormente, los tratamientos térmicos empleados en la cocción de las semillas de frijol, generalmente mejoran su digestibilidad y constituye el principal mecanismo para destruir a estos factores antinutricionales. Sin embargo existen algunas condiciones que limitan o interfieren con la inactivación térmica de dichos factores, tales como una disminución en el punto de ebullición del agua, el remojo previo de las semillas, la cocción conjunta con cereales (principalmente maíz) y la utilización de recipientes de barro, solo por mencionar algunas.

Desde el punto de vista de la nutrición, el factor antifisiológico mas importante lo representa la lectina presente en estas semillas, la PHA, ya que junto con el inhibidor de la tripsina, es el más resistente a los tratamientos térmicos. Esto puede traer como consecuencia que la PHA no se inactive totalmente y produzca diferentes trastornos en el tubo digestivo como los que se describieron con anterioridad.

La alimentación de animales de laboratorio con dietas preparadas con semillas de leguminosas o de sus harinas, se realiza con el fin de evaluar la calidad nutricional de las semillas. Esta evaluación siempre se hace, alimentando de manera simultánea, a otros grupos de animales con una proteína que se utiliza como referencia, como la albúmina de huevo o la caseína de la leche. Esto representa una situación artificial, ya que ninguna dieta está compuesta por un solo tipo de proteína, sino que la constituye una mezcla de proteínas, tanto de origen vegetal como de origen animal.

A pesar de que las propiedades fisicoquímicas, biológicas, bioquímicas e inmunológicas de la PHA están bien determinadas, son muy escasos los estudios respecto a la interacción que "normalmente" ocurre entre esta lectina, que se ingiere en la dieta, y la respuesta inmune del tracto gastrointestinal. Además, la posibilidad de que la molécula intacta de la PHA pueda generar una respuesta inmune intestinal local, es muy elevada, ya que también es resistente a las diferentes secreciones digestivas del tracto gastrointestinal.

La administración por vía oral de la lectina de PHA a ratas, se plantea como un modelo para el estudio de la interacción que ocurre entre las proteínas de origen dietario, con la respuesta inmune asociada al intestino. Este estudio podría ayudar a comprender mejor el efecto que, sobre el sistema inmune intestinal de los mamíferos (incluyendo al hombre), ejercen algunas proteínas de origen dietario, en particular para el caso de la lectina del frijol.

### III. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto que ejercen las lectinas de dos variedades de frijol, sobre la respuesta inmune del tracto digestivo de la rata.

#### OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar las propiedades biológicas y las características fisicoquímicas *in vitro*, de las lectinas contenidas en extractos salinos obtenidos de las dos variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*), de mayor consumo en México (frijol Negro y frijol Bayo).

Describir la cinética de proliferación celular a nivel local y sistémico *in vivo*, de células mononucleares totales obtenidas de diferentes órganos linfoides, en ratas alimentadas con extractos salinos obtenidos de ambas variedades de frijol.

Determinar el efecto que el tratamiento térmico en autoclave, (121°C, 15 lb/in<sup>2</sup>, 30 min), tiene sobre estas actividades tanto *in vitro* como *in vivo*.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 1. SELECCION DE LAS SEMILLAS.

Se seleccionaron las variedades de frijol Negro y de frijol Bayo (*Phaseolus vulgaris*, L.), por ser éstas las de mayor consumo por la población nacional. Las semillas se obtuvieron de un mercado local.

### 2. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS SALINOS.

La obtención de los extractos se realizó de acuerdo al método descrito por Felsted (80): después de limpiar las semillas de piedras, ramas y de eliminar las semillas rotas ó deterioradas, éstas se molieron en un molino de laboratorio hasta tener un polvo fino. Se pesaron 100 g de las semillas molidas y sus componentes solubles se extrajeron con 400 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.1 M, pH 7.2, por agitación constante a 4°C durante toda la noche. La suspensión resultante se filtró a través de gasa para eliminar las partículas grandes y el filtrado se centrifugó a 16,000 x G durante 2 hs, para sedimentar las partículas finas. Se recuperó el sobrenadante claro y parte de éste se filtró en membranas Millipore de 0.22µm de poro, para obtener el **EXTRACTO SALINO CRUDO**. La otra parte del extracto se sometió a cocción en autoclave (121°C, 15 lb/in<sup>2</sup>, 30 min) y se centrifugó a 3,000 rpm por 15 min; el sobrenadante claro consistió en el **EXTRACTO SALINO COCIDO**.

Una vez obtenidos los extractos salinos, crudo y cocido de cada variedad de frijol, se determinó la concentración total de proteínas por el método de Lowry (81), usando la fracción V de albúmina sérica bovina (ASB-V, Sigma Chemical, Co.) como estándar. La concentración total de proteínas en todos los extractos se ajustó a 5 mg/ml.

Por otro lado, parte de las semillas enteras de cada variedad de frijol, se sometió a remojo previo durante 24 horas en agua destilada, con objeto de determinar el posible efecto de este tratamiento en la disminución del contenido total de lectinas en las semillas. Después de transcurridas las 24 hs, el agua de remojo se colectó para la

determinación de su contenido total de proteína por el método de Lowry (81) y de su actividad hemaglutinante (82). Las semillas se secaron a temperatura ambiente por 24 hs, colocándolas sobre papel absorbente para eliminar el exceso de agua y sus componentes solubles se extrajeron en la forma descrita anteriormente.

### **3. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE LAS DOS VARIETADES DE FRIJOL.**

#### **3.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE.**

La actividad hemaglutinante de los extractos salinos crudos y cocidos de cada variedad de frijol, con y sin remojo previo, y del agua de remojo, se realizó de acuerdo con el método descrito por Calderón y Córdova (82), en placas de microtitulación de 96 pozos con fondo en "U" (Dynatech Laboratories): se colocaron 100µl de cada extracto salino o del agua de remojo en la primera columna de la placa y se hicieron diluciones seriadas con PBS cada vez al doble, usando microdilutores Takatsy con capacidad de 50µl (Cooke Laboratory Products).

En cada pozo, se añadieron 10µl de una suspensión al 4% de los diferentes glóbulos rojos que se probaron: humanos (grupos A, B y O), conejo y vaca; los eritrocitos se prepararon lavándolos 3 veces con PBS. En el caso de los eritrocitos de vaca, éstos fueron previamente tratados con tripsina, de acuerdo al método descrito por Jaffé y Brucher (83): a 10 ml de una suspensión al 10% en PBS, se añadió 0.1 mg de tripsina de páncreas de bovino tipo III, (Sigma Chemical Co.) y se incubaron a 37°C por 30 min con agitación suave y continua. Los eritrocitos se lavaron 3 veces con PBS y se ajustaron al 4% para realizar las pruebas de hemaglutinación.

Después de 30 min a temperatura ambiente, se observó la reacción de hemaglutinación por la aparición de una "capa" uniforme de eritrocitos en el fondo de los pozos. Una reacción negativa de hemaglutinación se identificó por la formación de un "botón" de eritrocitos sedimentados en el fondo de los pozos.

El título de hemaglutinación de los extractos salinos de ambas variedades de frijol, se definió como la máxima dilución del extracto, capaz de producir aglutinación macroscópica de los eritrocitos, después de 30 min a temperatura ambiente.

### 3.2. ANALISIS ELECTROFORETICO EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Las proteínas contenidas en los extractos salinos crudos y cocidos de ambas variedades de frijol, se analizaron en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (geles nativos) de acuerdo con las técnicas descritas previamente en la literatura para la PHA (80,84). La obtención del peso molecular de la PHA se realizó en condiciones semi-desnaturizantes (con SDS, sin  $\beta$ -mercaptoetanol y sin calentamiento) de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (85-87). Para ambos tipos de electroforesis, la cantidad de proteína se ajustó a 20  $\mu$ g por carril, y se usó PHA comercial purificada como referencia (Sigma Chemical, Co.). La electroforesis se realizó en una cámara vertical Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories).

La electroforesis en condiciones no-desnaturizantes (geles nativos), se realizó en geles de poliacrilamida al 7.5%, con un voltaje de 100 V y una corriente de 3 mA durante 2 horas, invirtiendo la polaridad de la cámara, es decir, el ánodo se conectó a la parte superior de la cámara y el cátodo a la parte inferior, debido a las características del sistema. El amortiguador de corrida fue una solución de ácido acético y  $\beta$ -alanina, pH 4.5. Las muestras se aplicaron con una solución de verde de metilo al 0.1% en amortiguador de corrida, como marcador del "frente".

La electroforesis de los extractos salinos de frijol en condiciones semi-desnaturizantes, se hizo en un gradiente de poliacrilamida del 5 al 12.5%, con las mismas condiciones que la anterior (100 V, 3 mA, 2 hs), con una solución de TRIS-glicina, pH 8.3 y SDS al 0.037%, como amortiguador de corrida y azul de bromofenol al 0.1% como marcador del "frente".

Después de la electroforesis, las diferentes bandas se tñieron con azul brillante de Coomassie R-250 (Sigma Chemical Co.), con las técnicas descritas en la literatura (87).

### 3.3. ANALISIS POR "WESTERN BLOT".

Después de la separación electroforética, las diferentes proteínas contenidas en los extractos se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (NC), con objeto de determinar la banda correspondiente a la PHA mediante la técnica de "Western Blot", la cual se hizo con el sistema de doble anticuerpo, usando peroxidasa como revelador (88-90).

Después de la electroforesis no-desnaturalizante (nativa), las proteínas se transfirieron a membranas de NC de 0.45 $\mu$ m de poro (Bio-Rad Laboratories) con ácido acético al 0.7% como amortiguador de transferencia (88,89). La transferencia se realizó con un voltaje de 100 V y una corriente de 33 mA durante 1 h, a 4°C y con agitación magnética para evitar el calentamiento.

Para el caso de la electroforesis de las proteínas en condiciones semi-desnaturalizantes, se usó TRIS-glicina-SDS, pH 8.3 (TRIS 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.037% v/v) con metanol al 20%, como amortiguador para la transferencia (88-89); ésta se realizó a membranas de NC de 0.45  $\mu$ m de poro (Bio-Rad Laboratories) aplicando un voltaje de 34 V y una corriente de 151 mA por 1 hora, a 4°C y con agitación magnética constante.

Después de la transferencia, en ambos casos el resto de las membranas de NC se bloqueó con solución TBS-ASB durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación continua; ésta solución se preparó con NaCl 500 mM, TRIS-base 20 mM (Sigma Chemical Co.) y ASB-V al 3%. Después de la incubación, la membrana se lavó 3 veces con TBS.

Para la detección de la PHA en los extractos salinos, las membranas de NC se incubaron con el anticuerpo primario, anti-PHA preparado en conejo (rabbit anti-Phaseolus vulgaris' lectin, Sigma Chemical Co.), diluido 1:5000 en TBS-Tween (TBS

con Tween 20 al 0.05%), durante toda la noche a 4°C y con agitación constante. La membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween y se adicionó el segundo anticuerpo marcado con la enzima: anti-conejo preparado en cabra, conjugado con peroxidasa (goat anti-rabbit-HRP conjugate, Kappel Laboratories) diluido 1:1000 en TBS-Tween y se incubó durante 2 hs a temperatura ambiente con agitación constante. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween.

Para revelar el sitio donde se localizaba la PHA, por la formación de los complejos antígeno-anticuerpo, se empleó una solución de 4-cloro-1-naftol como revelador (Sigma Chemical Co.): ésta solución se preparó con 15 mg de 4-cloro-1-naftol en 5 ml de metanol frío, mezclados con 15µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en 25 ml de TBS. La reacción se dejó transcurrir a temperatura ambiente hasta la aparición de las bandas (de 5 a 10 min). La reacción se detuvo lavando con TBS. Las membranas de NC se secaron a temperatura ambiente y se guardaron en bolsas de plástico selladas para su conservación.

#### **4. CARACTERIZACION BIOLOGICA DE LA DIETA COMERCIAL PARA ROEDORES "Purina".**

Previamente a la realización de los ensayos biológicos *in vivo* con los extractos salinos obtenidos de las dos variedades de frijol, se evaluó la posibilidad de utilizar la dieta comercial que los animales consumen en el bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición, para este tipo de ensayos de estimulación intestinal (alimento granulado para roedores marca "Purina"). Esto fué necesario ya que de acuerdo con el fabricante, el alimento contiene residuos de alfalfa (*Medicago sativa*), la cual es una leguminosa (anexo 1). A pesar de que existen reportes en la literatura de que esta leguminosa no posee ninguna actividad hemaglutinante o mitogénica (17,18), se decidió investigar estas actividades.

#### 4.1. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE.

Se obtuvo un extracto salino del alimento para roedores "Purina" en las mismas condiciones que las empleadas para el caso de las semillas de frijol: se pesaron 100 g del alimento comercial previamente molido y sus componentes solubles se extrajeron con 400 ml de PBS, con agitación continua durante toda la noche a 4°C. La suspensión resultante se filtró en gasa y se centrifugó a 16,000 x G durante 2 hs. La concentración total de proteína se determinó por el método de Lowry (81).

También se obtuvo un extracto salino de las heces de ratas alimentadas con ésta dieta, con objeto de evaluar si la degradación enzimática de la dieta (por efecto de los procesos digestivos normales) presentaba actividad hemaglutinante. El extracto de las heces se realizó de la misma forma a la descrita anteriormente.

La actividad hemaglutinante de los extractos salinos del alimento comercial y de las heces, se realizó de acuerdo al método previamente descrito (82), empleando los mismos tipos de glóbulos rojos (humanos, conejo y vaca).

#### 4.2. ACTIVIDAD MITOGENICA.

La actividad mitogénica del extracto salino de la dieta comercial "Purina", se evaluó mediante la incorporación *in vitro* de timidina tritiada (tim-H<sup>3</sup>) por linfocitos aislados del bazo, obtenidos de ratas normales, en cultivos de 3 días.

Los esplenocitos de rata se obtuvieron con solución salina balanceada de Hank, sin Ca<sup>++</sup> ni Mg<sup>++</sup> (HBSS-CMF), por maceración del bazo a través de una malla de alambre, filtración en gasa y estratificación sobre el gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque descrito por Böyum (91). La suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm durante 30 min y se colectó la interfase, rica en células mononucleares (linfocitos y monocitos); las células se lavaron 3 veces con HBSS-CMF y se determinó su viabilidad por exclusión del colorante azul Tripán al 0.4% y su concentración se ajustó a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI-1640 (GIBCO Laboratories), suplementado

con 10% de suero fetal de ternera inactivado (SFT), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomomicina y 2 mM de L-glutamina (todos de Sigma Chemical Co.)

Los cultivos se realizaron por cuadruplicado en placas de plástico estériles de 96 pozos con "fondo plano" (Falcon Products, Becton-Dickinson). En cada pozo se colocaron 100µl del extracto de la dieta comercial "Purina", haciendo diluciones seriadas, cada vez al doble, en medio RPMI completo y se añadieron 100µl de la suspensión celular (equivalente a  $2 \times 10^5$  células/pozo). Los cultivos que se usaron como controles, sólo recibieron RPMI completo. Se incluyó un cultivo de esplenocitos que recibió 2.5 µg de PHA comercial purificada (Sigma Chemical, Co.) como referencia. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 37°C durante 3 días, en una estufa con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (NAPCO 4200) y humedad relativa del 98%.

Veinticuatro horas antes de ser cosechadas, las células recibieron un pulso de 0.5 µCi de timidina tritiada (tim-H<sup>3</sup>) (actividad específica 6.7 Ci/mmol, 247.9 GBq/mmol, New England Nuclear). Las células se colectaron con un cosechador automático (Titertek Cell Harvester, Flow Laboratories), en filtros de fibra de vidrio malla II (MA Bioproducts) y se lavaron con agua destilada; los filtros que contenían las células se secaron a temperatura ambiente por 24 hs y se transfirieron a viales de centelleo. La cantidad de tim-H<sup>3</sup> incorporada por las células se determinó en un contador de centelleo líquido para emisiones β (Packard Tri-Carb 3255). La solución de centelleo se preparó con 19.6 g de PPO (2,3-difeniloxazol) y 0.4 g de POPOP (p-bis-2-(5-feniloxazolil)-benceno) en 3.5 litros de tolueno.

## **5. ENSAYOS BIOLÓGICOS *in vivo* CON LOS EXTRACTOS SALINOS DE LAS DOS VARIETADES DE FRIJOL.**

Los ensayos biológicos con los extractos salinos de las dos variedades de frijol, se realizaron con ratas hembras Wistar de 2 a 3 meses de edad (240-280 g), mantenidas en jaulas metabólicas individuales, con períodos de luz-oscuridad de 12 hs, una

temperatura de  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ , alimentadas con la dieta comercial del bioterio ("Purina") del Instituto Nacional de la Nutrición y agua destilada *ad libitum*.

Los animales recibieron los diferentes extractos por intubación gástrica (sin anestesia), entre las 8:30 y 10:00 hs todos los días en un volumen total de 1 ml con una cánula de acero inoxidable con "punta de globo", especialmente diseñada para este estudio. Se realizaron los siguientes grupos:

- GRUPO 1: ratas que recibieron PBS durante 30 días; fué el grupo CONTROL.
- GRUPO 2: ratas que recibieron el extracto cocido de frijol Bayo (5 mg prot/ml) durante 30 días.
- GRUPO 3: ratas que recibieron el extracto cocido de frijol Negro (5 mg prot/ml) durante 30 días.
- GRUPO 4: ratas que recibieron el extracto crudo de frijol Bayo (5 mg prot/ml) durante 3, 7, 14 y 30 días.
- GRUPO 5: ratas que recibieron el extracto crudo de frijol Negro (5 mg prot/ml) durante 3, 7, 14 y 30 días.
- GRUPO 6: ratas que recibieron PHA comercial purificada (0.15 mg/ml) empleando como vehículo PBS, durante 14 días.
- GRUPO 7: ratas que recibieron PHA comercial purificada (0.15 mg/ml) empleando como vehículo extracto cocido de frijol Bayo, durante 14 días.

La concentración de proteína se ajustó a 5 mg/ml, debido a que la concentración inicial de los extractos crudos fué de 16-18 mg/ml y ésta disminuyó a 5-6 mg/ml después del tratamiento térmico.

Para el caso de los grupos 6 y 7, la concentración de PHA se ajustó a 0.15 mg/ml que corresponde al 3% del total de proteína en los extractos. Esto se hizo así, ya que existen reportes en la literatura en donde se menciona que el contenido total de lectinas

en las leguminosas, varía del 1.5 al 3% del total de proteína (6-8,11,13), por lo que se decidió emplear el porcentaje mas alto.

Al final de cada tiempo de administración de los diferentes estímulos, las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical, previa anestesia con éter, y se evaluó la proliferación de las células mononucleares totales (CMNT) del intestino (I), de los nódulos mesentéricos (NM), de las placas de Peyer (PP) y del bazo (B), en cultivos *in vitro*, para determinar su ACTIVIDAD BASAL y su ACTIVIDAD ESTIMULADA.

La ACTIVIDAD BASAL de las CMNT de cada uno de los órganos linfoides, refleja su grado de activación *in vivo*. Esta se determinó por la capacidad de las CMNT de incorporar tim-H<sup>3</sup> en cultivos de 3 días, sin la adición exógena de PHA comercial purificada.

Por el otro lado, la ACTIVIDAD ESTIMULADA de las mismas células, refleja su respuesta máxima al estímulo inducido por la PHA. Esta se determinó por la incorporación de tim-H<sup>3</sup> en cultivos de 3 días, por la adición exógena de 2.5 µg de PHA comercial purificada.

Esto se hizo con el fin de valorar el efecto *in vivo* de la lectina presente en los extractos salinos de ambas variedades de frijol, sobre la respuesta inmune celular, tanto a nivel local como a nivel sistémico.

## 5.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS CELULAS MONONUCLEARES TOTALES DE LOS DIFERENTES ORGANOS LINFOIDES.

### 5.1.1 INTESTINO.

Las células mononucleares totales del intestino (I), las cuales incluían a los linfocitos intraepiteliales (IEP) y a los linfocitos de la lámina propia (LP), se obtuvieron por digestión con EDTA-colagenasa y purificación con gradientes de densidad (52,67,92-

95). El intestino se lavó con 20 ml de solución HBSS-CMF fría para eliminar restos de comida y moco. Las placas de Peyer (PP) se separaron del intestino con tijeras y se colocaron en una caja Petri con solución de citratos-fosfatos fría para su procesamiento posterior. El intestino, libre de PP, se abrió longitudinalmente y se cortó en fragmentos pequeños (de 2 a 3 cm); los fragmentos se transfirieron a un matraz Erlenmeyer con 25 ml de HBSS-CMF que tenía EDTA (25 mM) y colagenasa tipo II de *Clostridium histolyticum* (1250 U/ml, Sigma Chemical Co.), se incubaron 30 min a 37°C con agitación ocasional y se colectó el sobrenadante de la digestión (esta digestión se realizó 3 veces, hasta que se obtuvo un sobrenadante claro). Los sobrenadantes de las digestiones se mezclaron y se filtraron a través de gasa para eliminar las partículas grandes. El filtrado se estratificó sobre Ficoll-Hypaque y se centrifugó a 1500 rpm por 30 min. Se colectó la interfase rica en CMNT y se lavaron 3 veces con medio RPMI completo.

#### 5.1.2 CELULAS DE LAS PLACAS DE PEYER.

Las células de las placas de Peyer (PP), se obtuvieron con solución de citratos-fosfatos, pH 7.2, por maceración del órgano a través de una malla de alambre. La solución de citratos-fosfatos se preparó con citrato de sodio 50 mM, NaCl 96 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  8 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5.6 mM y KCl 1.5 mM. La suspensión celular resultante se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente y se filtró a través de una columna de lana de vidrio, para eliminar el moco que se produce por la maceración de las placas de Peyer (92,93,95). Las células se lavaron 3 veces con medio RPMI completo.

#### 5.1.3 NODULOS MESENTERICOS.

Los nódulos mesentéricos (NM) se disecaron en condiciones asépticas y las células se obtuvieron con solución de HBSS-CMF por maceración a través de una malla de alambre. La suspensión celular se filtró a través de gasa y las células se lavaron 3 veces con medio RPMI completo.

#### **5.1.4 BAZO.**

Las células del bazo (B) se obtuvieron con solución de HBSS-CMF por maceración del órgano en una malla de alambre, filtración en gasa y estratificación sobre el gradiente de Ficoll-Hypaque, en la forma descrita anteriormente. Las células se colectaron y se lavaron 3 veces con medio RPMI completo.

Una vez obtenidas las células mononucleares totales (CMNT) de cada uno de los diferentes órganos linfoides, es decir del intestino (I), las placas de Peyer (PP), los nódulos mesentéricos (NM) y el bazo (B), se determinó su viabilidad con azul Tripán y se ajustaron a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml, en medio RPMI suplementado con suero y antibióticos.

Las células se cultivaron por cuadruplicado en placas de plástico estériles de 96 pozos con "fondo plano" (Falcon Products, Becton-Dickinson). Se colocaron 100  $\mu$ l de cada una de las suspensiones celulares ( $2 \times 10^5$  células/pozo) y se incubaron a una temperatura de 37°C durante 3 días, en una estufa con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (NAPCO 4200) y humedad relativa del 98%.

#### **6. ANALISIS ESTADISTICO.**

Los promedios de las actividades basal y estimulada de cada población celular, dentro de un mismo grupo, fueron comparadas mediante la prueba de t-pareada, con un nivel de significancia del 5%.

Los promedios de las actividades basal y estimulada de cada una de las poblaciones celulares, fueron comparadas entre cada grupo por análisis de varianza (ANDEVA), con un nivel de significancia del 5%.

## V. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 1. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE.

En el cuadro 1 se muestran los resultados de la actividad hemaglutinante de los extractos salinos crudos y cocidos de las dos variedades de frijol, sobre los glóbulos rojos humanos (grupos A, B y O), y sobre los eritrocitos de conejo y de vaca sensibilizados con tripsina. Se incluyó un control con eritrocitos de vaca sin tripsinizar.

CUADRO 1

#### ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS SALINOS CRUDOS Y COCIDOS DE LAS DOS VARIEDADES DE FRIJOL

		ERITROCITOS			
		HUMANOS (A,B,O)	CONEJO	VACA TRIPSINIZADOS	VACA SIN TRIPSINIZAR
B A Y O	CRUDO	1:512 (10)	1:2048 (2.5)	1:2048 (2.5)	neg
	COCIDO	neg	neg	neg	neg
	CRUDO	1:256 (20)	1:512 (10)	1:2048 (2.5)	neg
N E G R O	COCIDO	neg	neg	neg	neg

Se informa la máxima dilución del extracto que produjo aglutinación macroscópica de los eritrocitos después de 30 minutos a temperatura ambiente. El número entre paréntesis, indica la concentración de proteínas totales (en  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) que corresponde a esa dilución, a partir de una concentración inicial de 5 mg/ml.

Los extractos salinos crudos de ambas variedades de frijol, aglutinaron los diferentes eritrocitos probados con diferente potencia, mientras que los extractos salinos cocidos de ambas variedades no produjeron aglutinación de ninguno de los diferentes

tipos de glóbulos rojos, lo que indica que el tratamiento térmico empleado (autoclave 121°C, 15 lb/in<sup>2</sup>, 30 min), fué efectivo para destruir esta actividad biológica de la lectina.

El título hemaglutinante del extracto crudo del frijol Bayo fué de 1:512, 1:2048 y 1:2048 sobre los eritrocitos humanos, de conejo y de vaca tripsinizados, respectivamente, mientras que el título hemaglutinante del extracto crudo del frijol Negro fué de 1:256, 1:512 y 1:2048, para los mismos tipos de eritrocitos.

De acuerdo con la clasificación propuesta por Jaffé para la actividad hemaglutinante de las semillas del género *Phaseolus* (8), las lectinas presentes en ambas variedades de frijol estudiadas, corresponden al grupo I de lectinas no-específicas o "Panaglutininas" ya que aglutinaron todos los tipos de eritrocitos probados y, para el caso de los glóbulos rojos humanos, sin especificidad de grupo sanguíneo. El tratamiento con tripsina de los glóbulos rojos de vaca, es necesario para la detección de la actividad hemaglutinante de las lectinas de frijol, ya que aún los extractos crudos de ambas variedades, no aglutinaron a este tipo de eritrocitos sin el tratamiento enzimático (83).

Jaffé y Brucher (83) demostraron que las lectinas de frijol que dan una reacción positiva con eritrocitos de vaca tratados con tripsina, son mucho más tóxicas por su administración intraperitoneal en ratones, que las que sólo reaccionan con eritrocitos de conejo. Considerando lo anterior, se puede sugerir, que dada la potencia con que ambos extractos crudos de frijol aglutinaron los glóbulos rojos de vaca tratados con tripsina (2.5 µg/ml), estas serían de las variedades más tóxicas de frijol por su administración intraperitoneal en ratones o mediante su administración oral a ratas en forma de dietas preparadas con estas semillas (96).

En el cuadro 2 se muestran los resultados de la actividad hemaglutinante de los extractos crudos de ambas variedades de frijol, con y sin remojo previo de las semillas, y del agua de remojo, sobre los mismos tipos de eritrocitos.

CUADRO 2

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE FRIJOL,  
CON Y SIN REMOJO PREVIO, Y DEL AGUA DE REMOJO

		ERITROCITOS		
		HUMANOS (A,B,O)	CONEJO	VACA TRIPSINIZADOS
BAYO CRUDO	CON REMOJO	1:512	1:2048	1:2048
	SIN REMOJO	1:512	1:2048	1:2048
	AGUA DEL REMOJO*	1:1	neg	neg
NEGRO CRUDO	CON REMOJO	1:256	1:512	1:2048
	SIN REMOJO	1:256	1:512	1:2048
	AGUA DEL REMOJO*	1:1	neg	neg

Se informa la máxima dilución del extracto que produjo aglutinación macroscópica de los eritrocitos, después de 30 minutos a temperatura ambiente.

\* La concentración de proteínas en el agua del remojo fué de 1.6 mg/ml para el frijol Bayo y de 1.8 mg/ml para el frijol Negro.

El remojo previo de las semillas en agua destilada por 24 horas, no tuvo ningún efecto en la reducción de la actividad hemaglutinante de los extractos crudos de ambas variedades de frijol, pues aunque en el agua de remojo se detectó dicha actividad, ésta únicamente ocurrió sobre los eritrocitos humanos (1:1) y no disminuyó el título hemaglutinante original de los extractos.

Este mismo resultado se obtuvo en un estudio efectuado en Chile en 1974 (97), en el cual el remojo con agua destilada no tuvo ningún efecto en la reducción de la actividad hemaglutinante de los extractos que se investigaron. Jaffé y Flores (13) sometieron a remojo previo tres variedades locales de frijoles en Venezuela, usando diferentes medios de remojo, que incluían agua destilada, ácido acético al 0.1% y bicarbonato de sodio al 0.1%, encontrando que la cocción a 85°C con cualquiera de estos tratamientos, resultaba en una mejor digestibilidad y capacidad de las dietas preparadas

con las semillas, de inducir crecimiento en animales de laboratorio, comparados con testigos alimentados con caseína.

Además, ambos grupos de investigadores (13,97) probaron diferentes temperaturas y tiempos de cocción en sus experimentos: en algunos casos, la semilla se sometió a cocción a 100°C por 1 hora a presión atmosférica y en otros, en olla de presión a 121°C por 30 min, demostrando que este último tratamiento era mejor que el primero, independientemente del medio de remojo empleado.

Considerando lo anterior, resulta evidente que es más importante el tiempo y la temperatura de cocción, que el remojo previo de las semillas, para lograr la inactivación total de las lectinas del frijol.

En la mayoría de los hogares mexicanos, los frijoles son remojados durante 8 a 12 horas con objeto de hidratar a las semillas y facilitar su cocción, ya que existe una mejor transferencia de calor hacia su interior lo que aumenta la inactivación de estos factores y disminuye el tiempo empleado en la cocción, con el consecuente ahorro de combustible (8,13,96). También es importante recordar que en la mayoría de las ocasiones, el medio de remojo es eliminado y cambiado por agua fresca para efectuar la cocción de las semillas. A este respecto, sería conveniente investigar la presencia de lectinas en los caldos de cocción y no únicamente en el medio de remojo, en situaciones en las cuales se sospecha que la inactivación térmica de estos factores antifisiológicos no ha sido completa.

Aunque la aplicación de esta observación cae fuera de los objetivos de la presente investigación, este puede ser un campo de notable aplicación en el área de la nutrición, sobre todo en el caso de la alimentación infantil. Entre la población con menores ingresos económicos, es muy común la práctica de dar a los niños el caldo de cocción de los frijoles como sustitutos de la leche y de los atoles (aunque estos últimos, representan el

sustituto de la leche), debido al bajo poder adquisitivo para conseguir estos productos y a que existe la creencia, ampliamente difundida, de que "en el caldo está lo mejor".

Sin embargo, dada la notable resistencia a la inactivación térmica de las lectinas y del inhibidor de tripsina, y a las condiciones en las que se somete a cocción a los frijoles, esta práctica no solo parece inadecuada, sino que puede llegar a ser peligrosa. La ingestión de dietas crónicamente insuficientes en proteína y energía, aunado a la presencia de estos factores antifisiológicos, pueden favorecer el establecimiento de condiciones de mala absorción y, a largo plazo, de desnutrición.

## **2. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LOS EXTRACTOS SALINOS.**

### **2.1 GELES DE POLIACRILAMIDA.**

El patrón electroforético de los extractos salinos de ambas variedades de frijol, realizado con el sistema no desnaturalizante (nativo), se muestra en la figura 1.

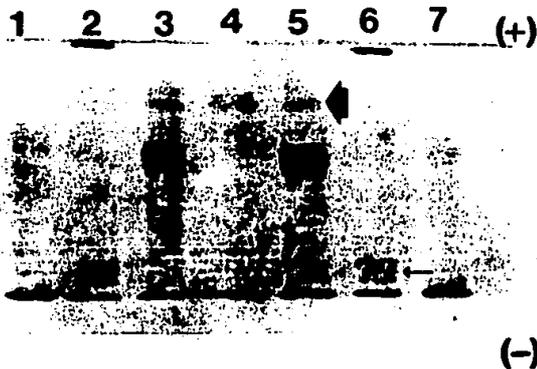
En el carril 4, se observa una banda, que corresponde a la PHA comercial purificada; en los carriles contiguos (3 y 5), que corresponden a los extractos crudos de frijol Bayo y Negro, respectivamente, se observan una serie de bandas con diferente intensidad, de las cuales destaca una muy tenue (flecha grande), con igual corrimiento electroforético al de la PHA pura, por lo que se trata de la misma proteína. Con este tipo de electroforesis en condiciones ácidas, es posible la separación de las 5 isolectinas de la PHA (98), aunque en este caso no se tuvo una buena resolución de ellas. Sin embargo, el fin de realizar la electroforesis con estas condiciones, sólo fué para determinar el efecto de la cocción sobre las propiedades fisicoquímicas de la PHA.

En los extractos cocidos de ambas variedades de frijol (carriles 2 y 6), esta banda ya no se aprecia, lo que parece indicar que el tratamiento térmico destruyó por completo a la proteína. En estos mismos extractos, en la parte inferior del gel cercana al "frente" se aprecian unas bandas (flecha pequeña), las cuales se pueden tratar de péptidos

pequeños producidos al momento de la cocción, por la degradación de la(s) proteína(s) contenidas en los extractos. Si es éste el caso, existe la posibilidad de que estos fragmentos conserven algunas de las características inmunológicas de la proteína original; esta posibilidad se discute mas adelante, al analizar los resultados de la transferencia a membranas de nitrocelulosa (Western blot).

**FIGURA 1**  
**PATRON ELECTROFORETICO DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE LAS DOS**  
**VARIETADES DE FRIJOL, EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES**  
**(CONDICIONES NATIVAS)**

---

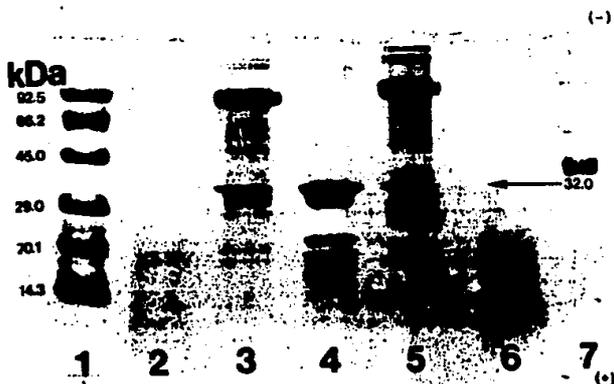


Gel de poliacrilamida al 7.5%. Se aplicaron las siguientes muestras: carriles 1 y 7, marcadores de bajo y alto peso molecular. Carril 2: extracto cocido de frijol Bayo. Carril 3: extracto crudo de frijol Bayo. Carril 4: PHA comercial purificada. Carril 5: extracto crudo de frijol Negro. Carril 6: extracto cocido de frijol Negro. La concentración de proteína se ajustó a 20 µg/carril. La electroforesis se realizó en condiciones ácidas (pH 4.5), con 100 V, 3 mA durante 2 horas. Tinción con Azul Brillante de Coomassie R-250.

En los carriles donde se colocaron los marcadores de peso molecular (1 y 7), la resolución de las bandas no fué satisfactoria. Esto se debió a que estos marcadores sólo se usan en sistemas desnaturalizantes o semi-desnaturalizantes (con SDS) y en condiciones básicas (pH 8.3 a 8.6).

En la figura 2, se muestra el patrón electroforético de los extractos salinos crudos y cocidos de ambas variedades de frijol, en condiciones semi-desnaturalizantes.

FIGURA 2  
PATRON ELECTROFORETICO DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE LAS DOS  
VARIIDADES DE FRIJOL, EN CONDICIONES SEMI-DES NATURALIZANTES



Gel en gradiente de poliacrilamida del 5 al 12.5%. Se aplicaron las siguientes muestras: carriles 1 y 7, marcadores de bajo y alto peso molecular; carril 2: extracto cocido de frijol Bayo; carril 3: extracto crudo de frijol Bayo; carril 4: PHA comercial purificada; carril 5: extracto crudo de frijol Negro; carril 6: extracto cocido de frijol Negro. La concentración de proteína se ajustó a 20 µg por carril. La electroforesis se realizó a pH 8.3, en condiciones con SDS (sin β-mercaptoetanol ni calentamiento) con 100 V, 3 mA durante 2 horas. Tinción con Azul Brillante de Coomassie R-250.

En el carril 4 que corresponde a la PHA comercial purificada, se aprecian una serie de bandas, en la que destaca una con un peso molecular de 32.0 kDa (flecha). En la misma localización, se encuentra una banda en los extractos crudos de ambas variedades de frijol (carriles 3 y 5), mientras que en los extractos cocidos (carriles 2 y 6), esta banda ya no se observa.

El peso molecular de la PHA reportado en la literatura, varía de 128 a 136 kDa (98). Se trata de una proteína oligomérica compuesta por 4 subunidades, la cual se puede presentar en 5 formas híbridas (isolectinas), debido a la combinación no covalente de las 2 subunidades básicas que la componen: una llamada R (ó E) y otra llamada L, por su afinidad hacia eritrocitos y leucocitos, respectivamente. Aunque ambas subunidades también difieren ligeramente en su secuencia de aminoácidos, se ha calculado un peso molecular aproximado de 32 a 36 kDa para cada una (98).

Bajo condiciones suaves de desnaturalización (únicamente con SDS), la PHA se disocia en las subunidades que la componen y éstas migran juntas como si se tratara de una sola proteína. El peso molecular calculado para la proteína intacta a partir de éste análisis, sería de 128 kDa, similar al reportado en la literatura (99).

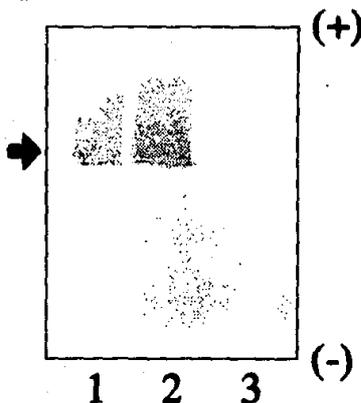
Por otro lado y de manera similar a lo encontrado en la electroforesis en condiciones nativas, en los extractos cocidos (carriles 2 y 6), no se aprecia ninguna banda que corresponda con la PHA pura, lo que indica que la proteína se desnaturalizó totalmente por el tratamiento térmico empleado.

## 2.2 ANALISIS POR "WESTERN BLOT".

En la figura 3 se muestra el "Western Blot" después de la separación electroforética de las proteínas con el sistema en condiciones no desnaturalizantes (nativas). En este caso, solo se aplicaron los extractos crudo y cocido del frijol Bayo, debido a que no existían diferencias entre las dos variedades de frijol estudiadas.

**FIGURA 3**  
**"WESTERN BLOT" DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE FRIJOL BAYO, DESPUES DE SU SEPARACION ELECTROFORETICA EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES (CONDICIONES NATIVAS).**

---



"Western Blot" de las proteínas contenidas en los extractos salinos crudo (carril 1) y cocido (carril 3) de frijol Bayo; el carril 2 corresponde a la PHA comercial purificada. Después de su separación en condiciones no desnaturizantes (nativas), las proteínas se transfirieron a membranas de NC (0.45  $\mu$  de poro) con ácido acético al 0.7% (100 V, 33 mA, 1 hora). El anticuerpo primario (anti-PHA preparado en conejo) se añadió a una dilución 1:5000 en TBS-Tween. El anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-conejo preparado en cabra) se añadió a una dilución 1:1000 en TBS-Tween. Se usó 4-cloro-1-naftol como revelador.

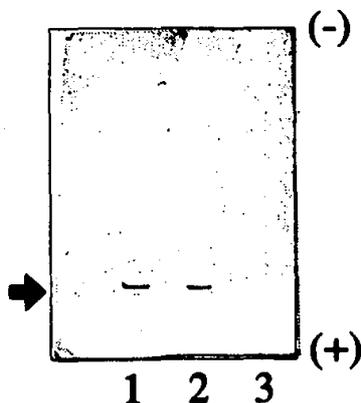
En el carril que corresponde a la PHA comercial pura, se observa una sola banda difusa (flecha), la cual sólo se observa en el extracto crudo. En el caso del extracto cocido, esta banda no se observa, lo que indica que la lectina contenida originalmente en el extracto crudo, se desnaturizó por efecto de la cocción.

Respecto a los péptidos que se observan cerca del "frente" de corrida en la placa de electroforesis en condiciones nativas (fig. 1), éstas tampoco se observan, lo que indica

que si hubieran sido el resultado de la desnaturalización térmica de la lectina (o de otras proteínas), no conservan ninguno de las características inmunológicas (epítopes) de la proteína intacta, ya que no reaccionaron con el anticuerpo primario (anti-PHA), que se utilizó.

La figura 4 muestra el "Western Blot" de las proteínas contenidas en los extractos crudo y cocido del frijol Bayo y de la PHA comercial, después de la electroforesis en condiciones semi-desnaturalizantes.

FIGURA 4  
"WESTERN BLOT" DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE FRIJOL BAYO, DESPUES DE SU SEPARACION ELECTROFORETICA EN CONDICIONES SEMI-DES NATURALIZANTES.



"Western Blot" de las proteínas contenidas en los extractos salinos crudo (carril 1) y cocido (carril 3) de frijol Bayo; el carril 2 corresponde a la PHA comercial purificada. Después de su separación en condiciones semidesnaturalizantes, las proteínas se transfirieron a membranas de NC (0.45  $\mu$  de poro) con TRIS-glicina-SDS y metanol 20% (34 V, 151 mA, 1 hora). El anticuerpo primario (anti-PHA preparado en conejo) se añadió a una dilución 1:5000 en TBS-Tween. El anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-conejo preparado en cabra) se añadió a una dilución 1:1000 en TBS-Tween. Se usó 4-cloro-1-naftol como revelador.

Al igual que en caso anterior, la banda que corresponde a la PHA solo se observa en el extracto crudo, lo que indica que se trata de la misma proteína y que aunque ésta se disocia en sus subunidades, mantiene sus características antigénicas. Además, esto confirma que la lectina presente en el extracto crudo se desnaturaliza por efecto del tratamiento térmico, ya que tampoco se observa en el carril que corresponde al extracto cocido.

### 3. CARACTERIZACION BIOLOGICA DE LA DIETA COMERCIAL "Purina".

#### 3.1. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE.

En el cuadro 3, se muestra la actividad hemaglutinante de los extractos salinos obtenidos de la dieta comercial para roedores "Purina" y de las heces de ratas normales alimentadas con esta dieta, así como de la PHA comercial purificada.

CUADRO 3  
ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS SALINOS OBTENIDOS DE LA DIETA COMERCIAL "PURINA", DE LAS HECES DE RATAS ALIMENTADAS CON ELLA Y DE LA PHA COMERCIAL PURIFICADA

	PROT. (mg/ml)	ERITROCITOS		
		HUMANOS (A,B,O)	CONEJO	VACA TRIPSINIZADOS
Dieta "Purina"	14.1	neg	neg	neg
Extracto de heces	5.3	neg (lisis 1:1)*	neg (lisis 1:1)	neg (lisis1:1)
PHA comercial	1.0	1:64	1:64	1:2048

Se informa la máxima dilución del extracto que produjo aglutinación macroscópica de los eritrocitos, después de 30 minutos a temperatura ambiente.

\* Significa que hubo lisis de los eritrocitos, en la dilución indicada.

Ni el extracto de la dieta comercial, ni el de las heces de ratas alimentadas con ella, presentaron actividad hemaglutinante alguna sobre los glóbulos rojos probados.

Aunque los extractos salinos obtenidos de las heces de ratas normales no presentaron ninguna actividad hemaglutinante, es interesante señalar que el extracto concentrado (1:1), produjo lisis de todos los eritrocitos, lo que se puede atribuir a que el pH final de este extracto era ácido (pH de 3.2).

La actividad hemaglutinante de la PHA pura, fué la mas potente sobre los eritrocitos de vaca tripsinizados, ya que aún a la dilución mas alta (1:2048), todavía se presentó aglutinación de las células.

### 3.2. ACTIVIDAD MITOGENICA.

En el cuadro 4 se muestra el resultado de la actividad mitogénica del extracto salino obtenido de la dieta comercial "Purina" sobre esplenocitos de rata normal y la respuesta proliferativa de las células a diferentes dosis de la PHA comercial purificada.

CUADRO 4  
ACTIVIDAD MITOGENICA DEL EXTRACTO DE LA DIETA "Purina" Y DE LA PHA COMERCIAL, SOBRE ESPLENOCITOS DE RATA.

Dosis ( $\mu\text{g/pozo}$ )	Extracto dieta	PHA comercial
0.625	398 $\pm$ 115	344 $\pm$ 120
1.25	428 $\pm$ 110	1397 $\pm$ 345
2.5	415 $\pm$ 92	7616 $\pm$ 1324
5.0	478 $\pm$ 124	8715 $\pm$ 1228
10.0	339 $\pm$ 117	8338 $\pm$ 695
CONTROL	483 $\pm$ 107	423 $\pm$ 125

Los cultivos se hicieron por 3 días a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y 98% de humedad relativa. Las células, ( $2 \times 10^5$  células/pozo) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero y antibióticos; 24 horas antes de ser cosechadas, las células recibieron un pulso de 0.5  $\mu\text{Ci}$  de tim-H<sup>3</sup> (actividad específica 6.7 Ci/mmol). El cultivo control sólo recibió medio RPMI completo. \*Promedio  $\pm$  desviación estándar de las CPM, n= 4.

La adición del extracto obtenido de la dieta "Purina" a los cultivos, no produjo ningún aumento en la cantidad tim-H<sup>3</sup> incorporada por las células, respecto de los controles ( $p > 0.05$ ), lo que indica que esta dieta puede ser utilizada para ensayos de

estimulación linfocítica a nivel intestinal, ya que no induce proliferación de las células. Esta observación está apoyada por los resultados obtenidos de la actividad hemaglutinante (cuadro 4).

La adición de cantidades crecientes de PHA pura a los cultivos de esplenocitos, produjo un aumento en su actividad mitogénica, la cual fué máxima con 2.5 µg de PHA. Con base en esto, la determinación de la actividad estimulada de las CMNT aisladas de los diferentes órganos linfoides, después de la administración intragástrica de los extractos de frijol, se realizó utilizando esta concentración de PHA.

No se realizó el análisis de la posible actividad mitogénica de los extractos obtenidos de las heces de las ratas, debido a la gran cantidad de bacterias que se sabe están presentes en las heces (principalmente coliformes y mesófilas aerobias), ya que hubiera sido muy difícil conservar los cultivos estériles por espacio de 3 días. Sin embargo, dado que la dieta que consumen los animales no posee esta actividad, es muy remoto que las heces contengan alguna sustancia con tal actividad.

#### **4. ENSAYOS BIOLÓGICOS.**

##### **4.1 ACTIVIDAD MITOGENICA *in vivo* DE LOS EXTRACTOS SALINOS CRUDOS Y COCIDOS DE LAS DOS VARIEDADES DE FRIJOL.**

En la figura 5, se muestra el patrón de proliferación de las células mononucleares totales (CMNT) de las ratas del grupo control, las cuales recibieron 1 ml de PBS por intubación gástrica durante 30 días.

ACTIVACION DE LAS CMNT OBTENIDAS DE LAS RATAS QUE RECIBIERON PBS  
POR 30 DIAS (GRUPO CONTROL)

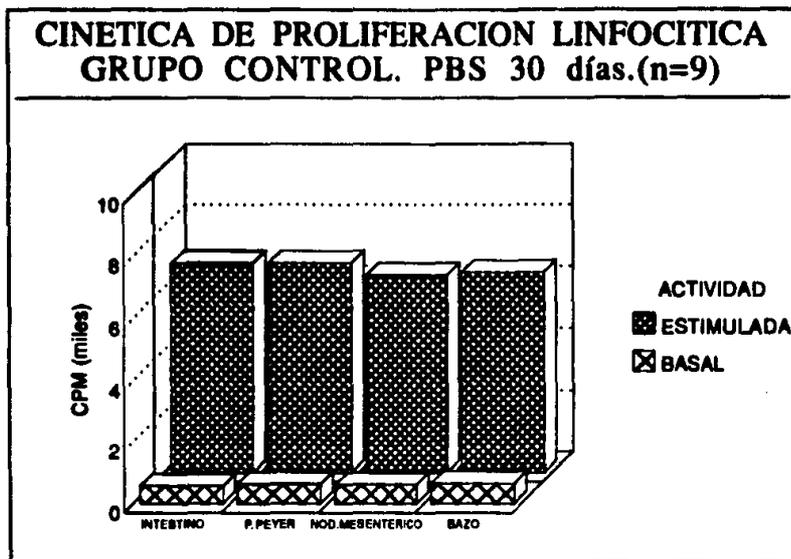


FIGURA 5.

La actividad basal de las CMNT, fué la misma en todos los órganos investigados (I, PP, NM y B). De la misma forma, la actividad estimulada de las células fué idéntica en todos los órganos, pero ésta fué mayor a la actividad basal ( $p < 0.001$ ).

Las figuras 6 y 7 muestran el patrón de proliferación de las CMNT obtenidas de las ratas que recibieron los extractos cocidos de frijol Negro y de frijol Bayo, respectivamente, durante 30 días.

ACTIVACION DE LAS CMNT OBTENIDAS DE LAS RATAS QUE RECIBIERON EL  
EXTRACTO COCIDO DE FRIJOL BAYO POR 30 DIAS.

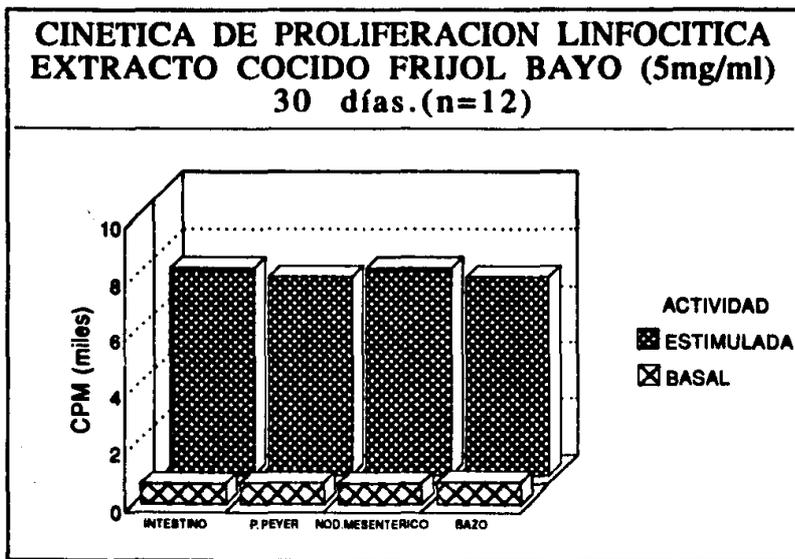


FIGURA 6.

El patrón de proliferación linfocítica es idéntico en ambos grupos, así como respecto al grupo control. Por un lado, la actividad basal de las CMNT fué la misma en todos los órganos de las ratas alimentadas con los extractos cocidos de las dos variedades de frijol, y lo mismo ocurrió en el caso de su actividad estimulada la cual, al igual de lo observado en el grupo control, también fué mayor que la primera ( $p < 0.001$ ).

ACTIVACION DE LAS CMNT OBTENIDAS DE LAS RATAS QUE RECIBIERON EL  
EXTRACTO COCIDO DE FRIJOL NEGRO POR 30 DIAS.

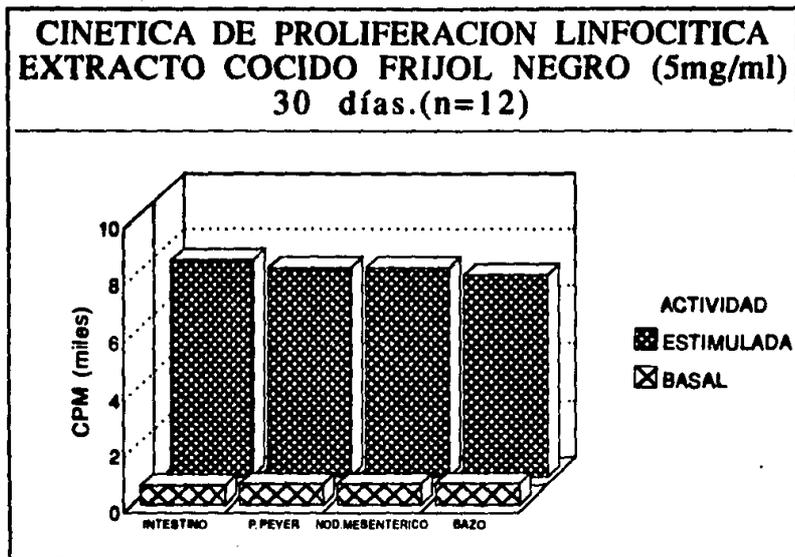


FIGURA 7.

Con base en estos resultados, se puede concluir que el tratamiento térmico empleado para la cocción de los extractos obtenidos de ambas variedades de frijol (autoclave, 121°C, 121 lb/in<sup>2</sup>, 30 min), fué suficiente para destruir su actividad mitogénica *in vivo*, ya que ninguno de los extractos cocidos indujo proliferación de las células, en ninguno de los órganos en que se estudió esta actividad, así como tampoco modificó la capacidad de las células a proliferar *in vitro*, en respuesta a la PHA adicionada exógenamente.

Las figuras 8 y 9 corresponden a la actividad basal (8a y 9a) y a la actividad estimulada (8b y 9b), de las CMNT obtenidas de las ratas que recibieron el extracto crudo de frijol Bayo y el extracto crudo de frijol Negro respectivamente, después de 3, 7, 14 y 30 días de su administración por intubación gástrica.

ACTIVACION DE LAS CMNT OBTENIDAS DE LAS RATAS QUE RECIBIERON EL  
EXTRACTO CRUDO DE FRIJOL BAYO POR 3, 7, 14 Y 30 DIAS.

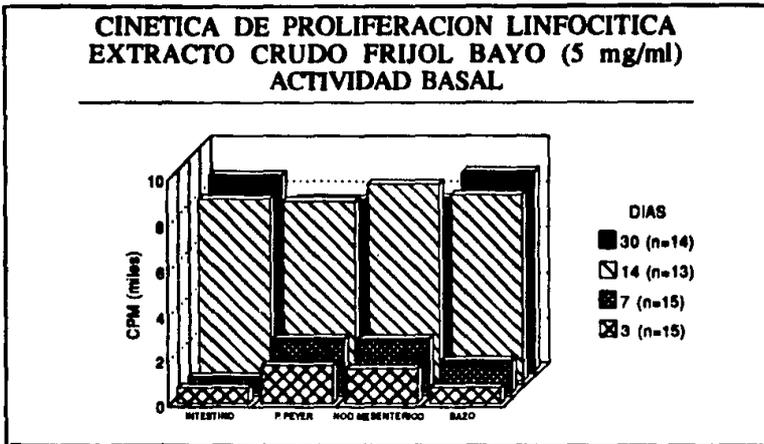


FIGURA 8a.



FIGURA 8b.

Para las dos variedades de frijol, la actividad basal de las células de las placas de Peyer (PP) y de los nódulos mesentéricos (NM), al tercer día de la administración de los extractos crudos, es mayor que la que la del bazo (B) y que la del intestino (I) ( $p < 0.01$ ). Esta actividad en las células de las PP y de los NM, es mayor que la encontrada en el grupo control y en los grupos de ratas que recibieron los extractos cocidos de ambas variedades de frijol ( $p < 0.01$ ). Por su parte, la actividad estimulada en todos los órganos (figuras 8b y 9b), es idéntica a la del grupo control y a la de los grupos alimentados con los extractos cocidos de frijol, y es mayor que la actividad estimulada de cualquiera de los órganos ( $p < 0.001$ ).

ACTIVACION DE LAS CMNT OBTENIDAS DE LAS RATAS QUE RECIBIERON EL EXTRACTO CRUDO DE FRIJOL NEGRO POR 3, 7, 14 Y 30 DIAS.

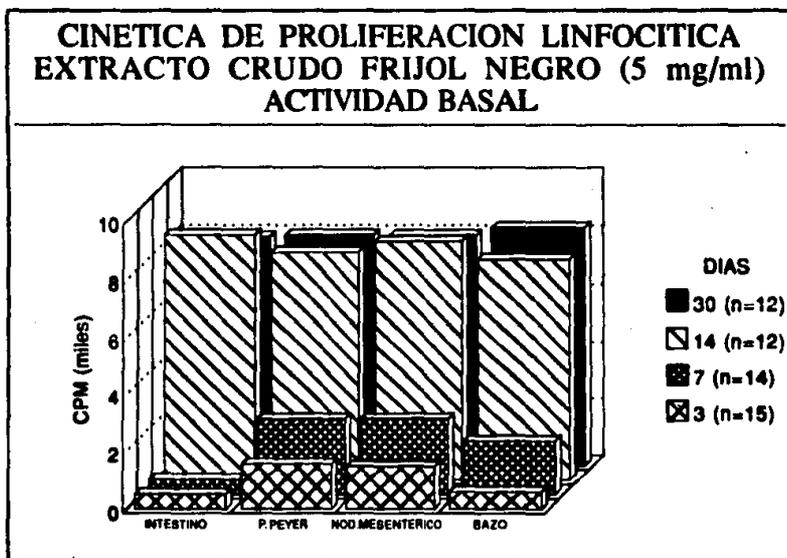
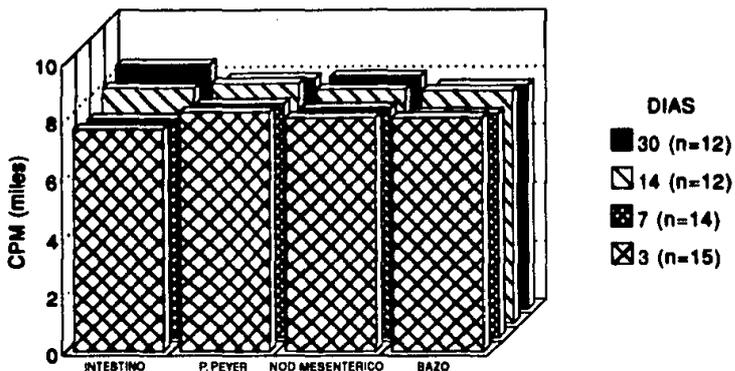


FIGURA 9a.

## CINETICA DE PROLIFERACION LINFOCITICA EXTRACTO CRUDO FRIJOL NEGRO (5 mg/ml) ACTIVIDAD ESTIMULADA



**FIGURA 9b.**

A los 7 días, la actividad basal de las células de las PP y de los NM sigue aumentando, ya que esta actividad fué mayor que la encontrada a los 3 días ( $p < 0.01$ ), así como también comienza a haber estimulación en el bazo ( $p < 0.01$ , respecto al tercer día), sin que esto se observe todavía en el caso de las células del intestino. En este tiempo, la actividad estimulada sigue siendo mayor que la actividad basal, para todos los órganos ( $p < 0.01$ ).

A los 14 días de la administración de los extractos crudos, la actividad basal de las CMNT es la misma en todos los órganos (figuras 8a y 9a), y es idéntica a la actividad estimulada encontrada en cada órgano ( $p > 0.05$ ). Esto significa que la adición exógena de PHA, no produce ningún aumento en la capacidad de proliferar de las células.

Es importante destacar que la actividad basal de las CMNT a los 30 días, ya no es mayor a la encontrada a los 14 días, lo que sugiere que la estimulación intestinal crónica, produce un tráfico celular constante hacia los diferentes órganos linfoides estudiados.

La cinética de activación de las CMNT por la administración crónica de los extractos crudos de ambas variedades de frijol, sugiere una ruta de activación como sigue: el antígeno después de ser administrado intragástricamente, alcanza el intestino y al 3er día estimula las células linfoides en las placas de Peyer, las cuales migran vía los nódulos mesentéricos (también en el 3er día) hacia el conducto torácico para de ahí alcanzar la circulación sistémica (representada aquí por el bazo) al séptimo día y regresar al sitio donde originalmente fueron estimuladas, es decir, al intestino (al 14o día).

Esta ruta de tráfico celular se ha descrito en la literatura (68-70,100,101), y es la parte fundamental del llamado "sistema inmune común de las mucosas", en el cual se incluyen a las mucosas intestinal, lagrimal, salival, mamaria, bronquial y genitourinaria. Dentro de esta ruta se distinguen 2 fases: una "eferente" o de activación y otra "aferente" o efectora (67,69,72,94,101). En este modelo, la fase eferente está representada por las CMNT de las placas de Peyer y los nódulos mesentéricos, las cuales se encuentran respondiendo al estímulo producido por la PHA contenida en los extractos crudos de las dos variedades de frijol, mientras que la fase aferente está representada por las CMNT del bazo y del intestino. Además de estos órganos, sería probable encontrar células linfoides activadas en otros sitios asociados a mucosas, diferentes al sitio donde fueron estimuladas originalmente, como células T y linfocitos B IgA+.

Después de obtener la cinética de proliferación de las CMNT obtenidas de las ratas alimentadas con los extractos crudos de las dos variedades de frijol, se decidió realizar otros cultivos (que corresponden a los grupos 6 y 7), con objeto de determinar si la PHA presente en el extracto crudo de cualquier variedad de frijol, era la responsable de la activación linfocítica *in vivo*, o si se debía a otra(s) proteína(s).

Las figuras 10 y 11 muestran el patrón de proliferación celular de las CMNT de ratas alimentadas con PHA comercial purificada (0.15 mg/ml), empleando como vehículo PBS y el extracto cocido del frijol Bayo respectivamente, después de su administración intragástrica por 14 días. Sólo se probó a este tiempo, debido a que en él se tuvo el máximo de estimulación de todos los órganos estudiados.

ACTIVACION DE LAS CMNT OBTENIDAS DE LAS RATAS QUE RECIBIERON PHA (0.15 mg/ml) EN PBS POR 14 DIAS.

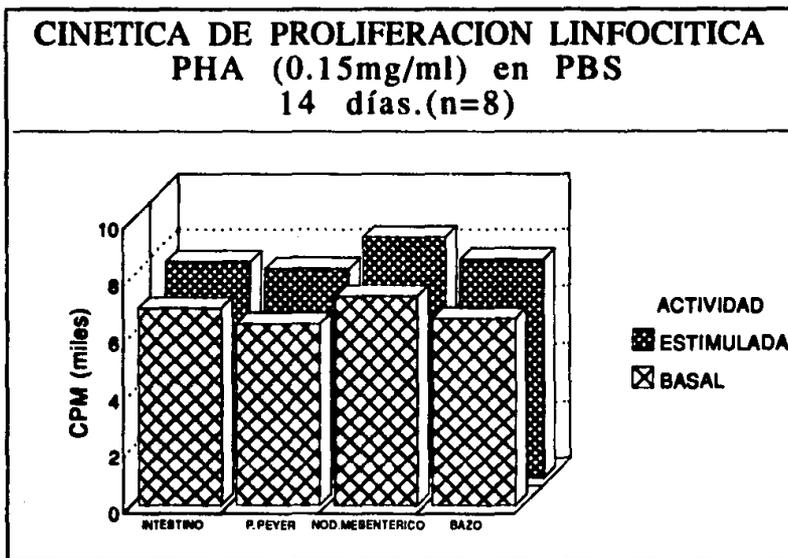


FIGURA 10

La actividad basal de las CMNT de las ratas que recibieron la PHA en PBS, o la PHA en el extracto cocido del frijol Bayo, es igual a la actividad estimulada en todos los órganos. Este perfil de proliferación celular es idéntico al que se encontró en las ratas que recibieron los extractos crudos de las dos variedades de frijol a los 14 días (figuras

8a y 9a), lo que confirma que la PHA es la responsable de la activación de las células *in vivo*.

ACTIVACION DE LAS CMNT OBTENIDAS DE LAS RATAS QUE RECIBIERON PHA (0.15 mg/ml) EN EL EXTRACTO COCIDO DE FRIJOL BAYO POR 14 DIAS.

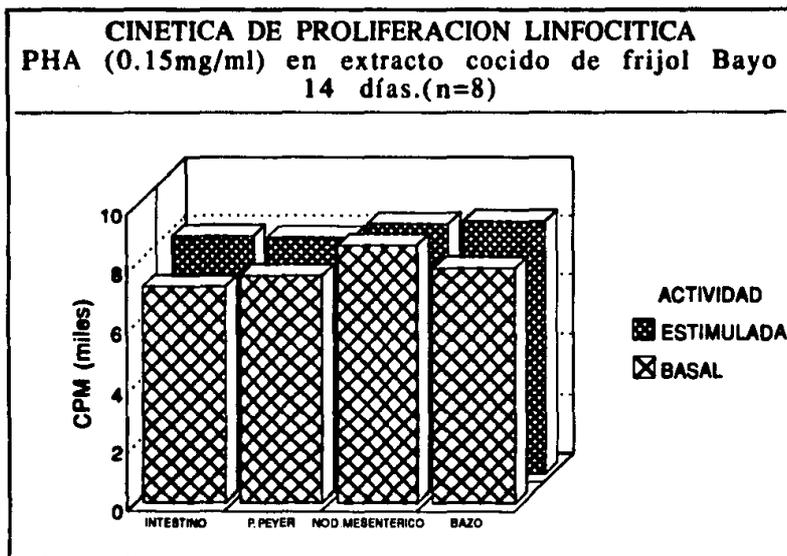


FIGURA 11

En un estudio que se realizó simultáneamente con éste, se demostró que la PHA es resistente a las diferentes secreciones del tracto gastrointestinal, así como su capacidad de aumentar el tamaño y el peso del intestino. Mediante técnicas de inmunohistoquímica, se localizó a la PHA contenida en los extractos crudos (pero no en los extractos cocidos), únicamente en la porción inicial del intestino (duodeno y parte proximal del yeyuno) (102).

Además, la lectina fué capaz de producir una respuesta inmune humoral sistémica de manera tiempo-dependiente, caracterizada por la aparición de anticuerpos anti-PHA de clase IgM al tercer día, y de clase IgG desde el séptimo día (102).

Estos resultados concuerdan con la cinética de proliferación linfocítica encontrada en el presente estudio: estimulación de las CMNT de las placas de Peyer y de los nódulos mesentéricos al tercer día, y la estimulación de las CMNT del bazo a partir del séptimo día que significa la inducción de una respuesta inmune específica a nivel sistémico.

Se ha demostrado que la población de células linfoides que se localizan en el ambiente intestinal, expresan los productos de genes asociados con la activación celular: por un lado, los linfocitos T (tanto CD4+ como CD8+) aislados de la lámina propia, expresan el receptor para IL-2 (IL-2R+) de manera constitutiva en ausencia de un estímulo aparente, así como de su ARN mensajero (ARNm IL-2R), los cuales no se han detectado en otras poblaciones linfoides de ningún otro sitio. Además, en respuesta al estímulo por concanavalina A (Con A), los linfocitos de la lámina propia producen IL-2 en mayor cantidad, junto con su ARNm (ARNm IL-2), que los linfocitos T de sangre periférica (103).

Algunos autores han reportado que los linfocitos T intraepiteliales, no responden al estímulo producido por mitógenos como la PHA en sistemas *in vitro* (41-43,41,94), lo cual puede explicarse por varios motivos. Por un lado, la PHA estimula a los linfocitos a través del receptor de células T (TCR) (99,104,105), el cual es un dímero compuesto por las subunidades  $\alpha/\beta$ ; sin embargo, en el ambiente intestinal, los linfocitos intraepiteliales expresan principalmente el TCR compuesto por las subunidades  $\tau/\delta$  (3,106,107), del cual todavía no se conocen perfectamente sus funciones.

Por otro lado, la estimulación con PHA de los linfocitos aislados del intestino, no es un evento sencillo, sino que por el contrario se trata de un fenómeno complejo que

requiere de una gran variedad de factores: algunos autores han demostrado que se requiere de interleucina 6 (IL-6) (108), de IL-2 adicionada exógenamente y de una célula "accesoria" presente en el bazo (o del sobrenadante del cultivo de esta célula), para lograr el máximo de estimulación linfocítica (94), mientras que otros han mostrado que parte de la estimulación inducida por la PHA, ocurre a través del receptor para eritrocitos de carnero (SRBC), es decir mediante la molécula CD2 (43,109,110).

De acuerdo con los resultados del presente trabajo, fué posible detectar la activación *in vivo* de las CMNT del intestino por la administración crónica de PHA, aunque de acuerdo con lo anteriormente expuesto, parecería poco probable que se trate de los linfocitos intraepiteliales (IEL) quienes están respondiendo al estímulo inducido por la PHA, sino que se trata entonces, de los linfocitos T de la lámina propia (LPL). Debido a que el método de obtención y purificación de los linfocitos del intestino no incluyó la separación de estas dos poblaciones, no es posible asegurar que se trate exclusivamente de los LPL. Sería conveniente realizar otros estudios en los que se investigue por separado la activación *in vivo* de ambas poblaciones celulares, con objeto de definir cuál es la población que está siendo "activada" dentro del ambiente intestinal.

Por último, cabe mencionar que las lectinas presentes en una gran cantidad de alimentos de origen vegetal, continúan siendo objeto de múltiples investigaciones principalmente en el área de la nutrición humana: debido a sus propiedades de reconocer específicamente diferentes residuos de azúcares, también se han empleado como herramientas para la descripción de la estructura tridimensional de diferentes polisacáridos en la superficie del epitelio intestinal, así como por su participación como "señales moleculares" que modifican dichos polisacáridos, para la prevención de enfermedades entéricas producidas por bacterias patógenas (111).

## **VI. CONCLUSIONES.**

### **1. PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y FÍSICOQUÍMICAS DE LAS LECTINAS CONTENIDAS EN LOS EXTRACTOS SALINOS DE LAS DOS VARIEDADES DE FRIJOL.**

Respecto a la actividad hemaglutinante de las lectinas (PHA) contenidas en los extractos crudos obtenidos de las dos variedades de frijol estudiadas (frijol Bayo y frijol Negro), éstas pertenecen al grupo de las hemaglutininas no específicas o "Panaglutininas", ya que aglutinaron todos los tipos de glóbulos rojos empleados: humanos (grupos A,B y O), eritrocitos de conejo y eritrocitos de vaca tripsinizados. Además, en el caso de los eritrocitos humanos, esta reacción ocurrió sin especificidad de grupo sanguíneo.

De acuerdo con la potencia con que la PHA contenida en los extractos crudos de ambas variedades de frijol, aglutinó los eritrocitos de vaca "sensibilizados" con tripsina, se puede afirmar que éstas semillas de frijol en su forma cruda, serían de las variedades más tóxicas por su administración a animales de experimentación, ya sea en forma intraperitoneal o por su adición a dietas en forma de harinas.

El remojo de las semillas por 24 horas, no produjo ninguna reducción significativa en la actividad hemaglutinante de los extractos salinos, ni en la cantidad de la PHA en las semillas.

El tratamiento térmico empleado (autoclave 121°C, 15 lb/in<sup>2</sup>, 30 min), fué efectivo para destruir la actividad hemaglutinante de la PHA en las dos variedades de frijol. Esto se confirmó por el análisis electroforético en geles de poli(acrilamida) (en diferentes condiciones), así como por el "Western blot" de cada uno de ellos.

Mediante el análisis electroforético de la PHA contenida en los extractos crudos de ambas variedades de frijol, se confirmó que la PHA en condiciones ácidas (pH 4.5), reveló que se trata de una proteína básica, con un corrimiento electroforético ( $R_f=0.36$ ) idéntico al reportado en la literatura para la PHA pura.

La electroforesis en geles de poliacrilamida de los extractos crudos de las dos variedades de frijol, reveló que la PHA se disocia en sus subunidades bajo condiciones suaves de desnaturalización, pero conserva sus propiedades inmunológicas ("Western Blot"). Se calculó un peso molecular de 32 kDa para las subunidades, similar al reportado en la literatura, por lo que el peso molecular de la proteína tetramérica es de 128 kDa.

## **2. ACTIVIDAD MITOGENICA *in vivo* DE LA PHA CONTENIDA EN LOS EXTRACTOS SALINOS OBTENIDOS DE LAS DOS VARIEDADES DE FRIJOL.**

Previo a la realización de los ensayos biológicos *in vivo* con los extractos salinos obtenidos de las dos variedades de frijol, se evaluó la posibilidad de utilizar la dieta que normalmente consumen los animales (Dieta para Roedores marca "Purina"), en el bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición, para este tipo de estudios de estimulación intestinal.

Las pruebas de hemaglutinación y de estimulación *in vitro* de esplenocitos de rata, realizados con extractos salinos obtenidos de la dieta comercial, confirmaron que esta dieta puede ser empleada en este tipo de estudios, con la ventaja adicional de que se puede evaluar el efecto de una proteína sobre la respuesta inmune intestinal, sin necesidad de contar con dietas basadas exclusivamente en un solo tipo de proteína, como ocurre en el caso de la albúmina de huevo y de la caseína, y a un menor costo.

La administración intragástrica de los extractos cocidos de las dos variedades de frijol, no produjo ninguna estimulación de las células mononucleares totales (CMNT) del

**intestino, de las placas de Peyer, de los nódulos mesentéricos, o del bazo. Esto confirma que la cocción en autoclave fué efectiva para destruir la actividad mitogénica de la PHA contenida en los extractos de las dos variedades de frijol.**

**Por el otro lado, los extractos crudos de ambas variedades de frijol, produjeron una respuesta inmune celular específica, tanto a nivel intestinal como a nivel sistémico.**

**La cinética de proliferación de esta respuesta fué la siguiente: se encontró activación de las CMNT al tercer día en las placas de Peyer y en los nódulos mesentéricos, así como en el bazo al séptimo día. A partir del día 14 y hasta el día 30, las CMNT de todos los órganos, incluyendo a las del intestino, se encontraron activadas, sin que hubieran diferencias entre las dos variedades de frijol estudiadas.**

**La administración de PHA pura, empleando como vehículos PBS y el extracto cocido de frijol Bayo durante 14 días, confirmaron que la PHA es la responsable de la activación de las CMNT *in vivo*.**

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- Elson CO, Kagnoff MF, Fiocchi C, Befus AD & Targan S. Intestinal immunity and inflammation: recent progress. *Gastroenterology*. 1986; 91: 746-768.
- 2.- Doe WF. The intestinal immune system. *Gut*. 1989; 30: 1679-1685.
- 3.- Brandtzaeg P, Halstensen TS, Kett K, Krajci K, Kvale D, Rognum TO, Scott H & Sollid LM. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*. 1989; 97: 1562-1584.
- 4.- Farrel MK. Food allergy, in "Manual of Allergy and Immunology". Second edition. Lawlor GJ and Fisher TJ. Little Brown and Co. Boston, 1988. pp 272-283.
- 5.- Corman LC. Efecto de nutrientes específicos sobre la respuesta inmunitaria. *Clin Med N Am*. 1985; 4: 799-832.
- 6.- Liener IE. Toxic factors in edible legumes and their elimination. *Am J Clin Nutr*. 1962; 11: 281-298.
- 7.- Liener IE. Seed hemagglutinins. *Econ Bot*. 1964; 18: 27-33.
- 8.- Jaffé WG. Hemagglutinins, in "Toxic constituents of plant foodstuffs". Second edition. Liener IE (editor). Academic Press. 1980. pp73-102.
- 9.- Sharon N & Lis H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*. 1972; 177: 949-959.
- 10.- Sharon N & Lis H. Legume lectins- A large family of homologous proteins. *FASEB J*. 1990; 4: 3198-3208.
- 11.- Liener IE. Protease inhibitors and lectins. *Int Rev Biochem*. 1979; 27: 97-123.
- 12.- Jaffé WG. Factores tóxicos en leguminosas. *Arch Latinoamer Nutr*. 1977 (supl. 2); 27: 85-96.
- 13.- Jaffé WG & Flores ME. La cocción de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). *Arch Latinoamer Nutr*. 1975; 25: 79-90.
- 14.- Pusztai A, Clarke EM & King TP. The nutritional toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. *Proc Nutr Soc*. 1979;38: 115-120.
- 15.- Jaffé WG & Vega-Lette CL. Heat-labile growth-inhibiting factors in beans (*Phaseolus vulgaris*). *J Nutr*. 1968; 94: 203-209.
- 16.- Elíaz LG & Bressani R. Métodos biológicos para la evaluación de leguminosas de grano. *Arch Latinoamer Nutr*. 1977 (supl. 2); 27: 139-151.
- 17.- Boyd WC & Reguera RM. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. *J Immunol*. 1949; 62: 333-339.
- 18.- Nachbar MS & Oppenheim JD. Lectins in the United States' diet: a survey of lectins in commonly consumed food and a review of the literature. *Am J Clin Nutr*. 1980; 33: 2338-2345.
- 19.- Nachbar MS, Oppenheim JD & Thomas JO. Lectins in the US diet: isolation and characterization of a lectin from the tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Biol Chem*. 1980; 255: 2056-2061.
- 20.- Noah NH, Bender AE, Reaidi GB & Gilbert RJ. Food poisoning from raw kidney beans. *Br Med J*. 1980; 281: 236-237.

- 21.- Lorenzsonn V & Olsen WA. In vivo responses of rat intestinal epithelium to intraluminal dietary lectins. *Gastroenterology* 1982; 82: 838-848.
- 22.- Brady PG, Vannier AM & Banwell JG. Identification of the dietary lectin, wheat germ agglutinin in human intestinal contents. *Gastroenterology*. 1978; 75: 236-239.
- 23.- Banwell JG, Howard RW, Ceri H & Fang K. Dose response effects of phytohemagglutinin lectin on rat small intestine, in "Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry. Volume 6". Bog-Hansen TC & Freed DLJ (editors). Sigma Library. St. Louis Mo. 1988. pp 133-136.
- 24.- Sotelo A, González A, González-Garza MT, Velasco E y Feria-Velasco A. Ultrastructural changes of epithelial intestinal cells induced by the ingestion of raw *Phaseolus acutifolius*. *Nutr Rep Int*. 1983; 27:329-337.
- 25.- de Oliveira JTA, Puzstai A & Grant G. Changes in organs and tissues induced by feeding of purified kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectins. *Nutr Res*. 1988; 8: 943-947.
- 26.- Puzstai A, de Oliveira JTA, Bardocz S, Grant G & Wallace HM. Dietary kidney bean lectin-induced hyperplasia and increase in polyamine content of the small intestine, in "Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry. Volume 6". Bog-Hansen TC & Freed DLJ (editors). Sigma Library. St. Louis Mo. 1988. pp 117-120.
- 27.- Rouanet JM, Lafont J, Chalet M, Creppy A & Bensancom P. Effects of dietary kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectins in growing rats. *Nutr Rep Int*. 1985; 31: 237-241.
- 28.- Banwell JG, Boldt DH, Meyers J, Weber FL, Miller B & Howard R. Phytohemagglutinin derived from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*): a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial overgrowth in the rat. *Gastroenterology*. 1983; 84: 506-515.
- 29.- Nakata S & Kimura T. Effect of ingested toxic bean lectins on the gastrointestinal tract in the rat. *J Nutr*. 1985; 115: 1621-1629.
- 30.- Freed DL & Buckley JP. Mucottractive effect of lectin. *Lancet*. 1978; 18: 585-586.
- 31.- Grant G, de Oliveira JTA, Dorward PM, Annand MG, Waldrom M & Puzstai A. Metabolic and hormonal changes in rats resulting from the consumption of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) or soya bean (*Glycine max*). *Nutr Rep Int*. 1987; 36: 763-772.
- 32.- Donatucci DA, Liener IE & Gross CJ. Binding of navy beans (*Phaseolus vulgaris*) lectin to the intestinal cells of the rat and its effect on the absorption of glucose. *J Nutr*. 1987; 117: 2154-2160.
- 33.- Puzstai AJ, Ewen SWB, Grant G, Peumans WJ, vanDamme EJM, Rubio L & Bardocz S. The relationship between survival and binding of plant lectins during small intestine passage and their effectiveness as growth factors. *Digestion*. 1990; 46 (suppl. 2): 308-316.
- 34.- Puzstai AJ. Plant and food lectins as metabolic signals for the gut. Rowett Research Institue. Annual Report 1990. pp 18-29.
- 35.- Greer F, Brewer AC & Puzstai A. Effect of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) toxin on tissue weight and composition and some metabolic functions of rats. *Br J Nutr*. 1985; 54: 95-103.

- 36.- Grant G, Watt WB, Stewart JC & Pusztai AJ. Local (intestinal) and systemic responses to dietary soyabean lectin, in "Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry. Volume 6". Bog-Hansen TC & Freed DLJ (editors). Sigma Library. St. Louis Mo. 1988. pp 121-124.
- 37.- Pusztai AJ, Grant G, Williams LM, Brown DS, Ewen SWB & Bardocz S. *Phaseolus vulgaris*' lectin induces growth and the uptake of polyamines by the rat small intestine *in vivo*. Med Sci Res. 1989; 17: 215-217.
- 38.- Bardocz S, Grant G, Brown DS & Pusztai AJ. Luminal and basolateral uptake by rat small intestine stimulated to grow by *Phaseolus vulgaris* lectin phytohemagglutinin *in vivo*. Biochim Biophys Acta. 1990; 1134: 46-52.
- 39.- Bardocz S, Grant G, Brown DS, Ewen SWB, Nevison I & Pusztai AJ. Polyamine metabolism and uptake during *Phaseolus vulgaris*' lectin, PHA-induced growth of rat small intestine. Digestion. 1990; 46 (suppl 2): 360-366.
- 40.- de Aizpurua HJ & Russell-Jones GJ. Oral vaccination: identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. J Exp Med. 1988; 167: 440-451.
- 41.- Greenwood JH, Austin LL & Dobbins WO. *In vitro* characterization of human intestinal intraepithelial lymphocytes. Gastroenterology. 1983; 85: 1023-1035.
- 42.- Ebert EC, Roberts AI, Brolin RE & Raska K. Examination of the low proliferative capacity of human jejunal intraepithelial lymphocytes. Clin Exp Immunol. 1986; 65: 148-157.
- 43.- Ebert EC. Proliferative responses of human intraepithelial lymphocytes to various T-cell stimuli. Gastroenterology. 1989; 97: 1372-1381.
- 44.- Bienenstock J & Befus AD. Mucosal immunology. Immunology. 1980; 41: 249-270.
- 45.- Allardyce RA & Bienenstock J. The mucosal immune system in health and disease, with an emphasis on parasitic infection. Bull WHO. 1984; 62: 7-25.
- 46.- Klein J. Systemic and regional immune responses. Chapter 16, in "Immunology", edited by Jan Klein. Blackwell Scientific Publications, Inc. Boston, USA. 1991, pp 369-385.
- 47.- Mayer L, Eisenhardt D, Salomon P, Bauer W, Plous R & Piccini L. Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Gastroenterology. 1991; 100: 3-12.
- 48.- Bland P. MHC class II expression by the gut epithelium. Immunol Today. 1988; 9: 174-178.
- 49.- Bland PW & Warren LG. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. I. Kinetics, antigen specificity and blocking by anti-Ia antisera. Immunology. 1986; 58: 1-7.
- 50.- Mayer L & Shlien R. Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. J Exp Med. 1987; 166: 1471-1483.
- 51.- Russell GJ & Harnatz PR. Major histocompatibility complex class II expression on enterocytes: to present or not to present. Gastroenterology. 1991; 100: 274-276.

- 52.- Lyscom N & Brueton MJ. Intraepithelial, lamina propria and Peyer's patch lymphocytes of the rat small intestine: isolation and characterization in terms of immunoglobulin markers and receptors for monoclonal antibodies. *Immunology*. 1982; 45: 775-783.
- 53.- Chiba M, Ohta H, Nagasaki A, Arakawa H & Masamune O. Lymphoid cell subsets in normal human small intestine. *Gastroenterol Jpn*. 1986; 21: 336-343.
- 54.- McDermott MR, Horsewood P, Clark DA & Bienenstock J. T lymphocytes in the intestinal epithelium and lamina propria of mice. *Immunology*. 1986; 57: 213-218.
- 55.- Bjerke K, Brandtzaeg P & Fausa O. T cell distribution is different in follicle-associated epithelium of human Peyer's patches and villous epithelium. *Clin Exp Immunol*. 1988; 74: 270-275.
- 56.- Scott H, Brandtzaeg P, Solheim BG & Thorsby E. Relation between HLA-DR-like antigens and secretory component (SC) in jejunal epithelium of patients with coeliac disease or dermatitis herpetiformis. *Clin Exp Immunol*. 1981; 44: 233-238.
- 57.- Wolf JL & Bye WA. The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Ann Rev Med*. 1984; 35: 95-112.
- 58.- Bjerke K & Brandtzaeg P. Lack of relation between expression of HLA-DR and secretory component (SC) in follicle-associated epithelium of human Peyer's patches. *Clin Exp Immunol*. 1988; 71: 502-507.
- 59.- Kato T. A study of secretory immunoglobulin A on membranous epithelial cells (M cells) and adjacent absorptive cells of rabbit Peyer's patches. *Gastroenterol Jpn*. 1990; 25: 15-23.
- 60.- Weltzin R, Lucia-Jandris P, Michetti P, Fields BN, Kraehenbuhl JP & Neutra MR. Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. *J Cell Biol*. 1989; 108: 1673-1685.
- 61.- Fujimura Y. Functional morphology of microfold cells (M cells) in Peyer's patches. Phagocytosis and transport of BCG by M cells into rabbit Peyer's patches. *Gastroenterol Jpn*. 1986; 21: 325-335.
- 62.- Wolf JL. Why antigens are attracted to the dome epithelium: another clue (editorial). *Gastroenterology*. 1988;95: 1419-1421.
- 63.- Walker WA & Ussekbaeger KJ. Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders. *Gastroenterology*. 1974; 67: 531-550.
- 64.- Neutra MR, Phillips TL, Mayer EL & Fishkind DJ. Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patches. *Cell Tissue Res*. 1987; 247: 537-546.
- 65.- Jones AL. The intestinal immune system: a time for the reaper. *Gastroenterology*. 1984; 87: 234-237.
- 66.- Kawanishi H, Saltzman L & Strober W. Mechanisms regulating IgA class-specific immunoglobulin production in gut-associated lymphoid tissues. I. T cells derived from Peyer's patches that switch sIgM B cells *in vitro*. *J Exp Med*. 1983; 157: 433-449.
- 67.- Dunkley ML & Husband AJ. The induction and migration of antigen-specific helper cells for IgA responses in the intestine. *Immunology*. 1986; 57: 379-385.

- 68.- Mestecky J, McGhee JR, Arnold RR, Michalek SM, Prince SJ & Babb JL. Selective induction of an immune response in human external secretions by ingestion of bacterial antigen. *J Clin Invest.* 1978; 61: 731-737.
- 69.- Bienenstock J & Befus AD. Some thoughts on the biological role of immunoglobulin A. *Gastroenterology.* 1983; 84: 178-185.
- 70.- Czerkinsky C, Prince SJ, Michalek SM, Jackson S, Russel MW, Moldoveanu Z, McGhee JR & Mestecky J. IgA antibody-producing cells in peripheral blood after antigen ingestion: evidence for a common mucosal immune system in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84: 2449-2453.
- 71.- Van der Heijden PJ, Bianchi ATJ, Bokhout BA, Dol M, Scholten JW & Stok W. Quantification of antigen-specific antibody-secreting cells in the small intestine and other lymphoid organs of mice after oral booster immunization. *Immunology.* 1989; 66: 404-409.
- 72.- Bjerke K & Brandtzaeg P. Terminally differentiated human intestinal B cells: IgA and IgG subclass-producing immunocytes in the distal ileum, including Peyer's patches, compared with lymph nodes and palatine tonsils. *Scand J Immunol.* 1990; 32: 61-67.
- 73.- McGhee JR & Mestecky J. In defense of mucosal surfaces: development of novel vaccines for IgA responses protective at the portals of entry of microbial pathogens. *Infect Dis Clin North Am.* 1990; 4: 315-341.
- 74.- Underdown BJ & Schiff JM. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Ann Rev Immunol.* 1986; 4: 389-417.
- 75.- World Health Organization. Report of a meeting on the immunity of mucous membranes. Geneva. *Scand J Immunol.* 1982; 15: 531-545.
- 76.- Lakey-Berg E, Goldstein LA, Jutila MA, Nakache M, Picker LJ, Streeter PR, Wu NW, Zhou D & Butcher EC. Homing receptors and vascular addressins: cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic. *Immunol Rev.* 1989; 108: 5-18.
- 77.- Duijvestijn A & Hamman A. Mechanisms and regulation of lymphocyte migration. *Immunol Today.* 1989; 10: 23-28.
- 78.- Hamman A & Thiele HG. Molecules and regulation in lymphocyte migration. *Immunol Rev.* 1989; 108: 19-43.
- 79.- Coombe DR & Rider CC. Lymphocyte homing receptors cloned: a role for anionic polysaccharides in lymphocyte adhesion. *Immunol Today.* 1989; 10: 289-291.
- 80.- Felsted RL, Leavitt RD & Bachur NR. Purification of the phytohemagglutinin family of proteins from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) by affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta.* 1975; 405: 72-81.
- 81.- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.
- 82.- Calderón RA & Córdova F. Immunosuppressive activity of *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus vulgaris* extracts in mice. *Eur J Immunol.* 1976; 6: 522-525.
- 83.- Jaffé WG y Brucher O. Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutinas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). *Arch Latinoamer Nutr.* 1972; 22: 267-281.
- 84.- Reisfeld RA, Lewis WJ & Williams DE. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrilamide gels. *Nature.* 1962; 195: 281-283.

- 85.- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.
- 86.- Weber K & Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*. 1969; 244: 4406-4412.
- 87.- Hames BD & Rickwood D. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. 4th Reprint. IRL Press, Oxford. 1985. page 1-86.
- 88.- Harlow E & Lane D. Immunoblotting, in "Antibodies: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1988. page 479-504.
- 89.- Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell. Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories. USA. 1987. page 1-11.
- 90.- Towbin H, Staehelin T & Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 4350-4354.
- 91.- Böyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol*. 1976; suppl.5: 9-15.
- 92.- Davies MDJ & Parrott DMV. Preparation and purification of lymphocytes from the epithelium and lamina propria of murine small intestine. *Gut*. 1981; 22: 481-488.
- 93.- Van der Heijden PJ & Stok W. Improved procedure for the isolation of functionally active lymphoid cells from the murine intestine. *J Immunol Meth*. 1987; 103: 161-167.
- 94.- Mowat AM, MacKenzie Sh, Baca M, Felstein MV & Parrott DMV. Functional characteristics of intraepithelial lymphocytes from mouse small intestine. *Immunology*. 1986; 58: 627-634.
- 95.- Dunkley ML & Husband AJ. Distribution and functional characteristics of antigen-specific helper T cells arising after Peyer's patch immunization. *Immunology*. 1987; 61: 475-482.
- 96.- Jaffé WG. Toxic factors in beans: their practical importance, in "Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods". Edited by Jaffé WG. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Caracas, Venezuela. 1973. págs 199-209.
- 97.- Contreras S y Tagle MA. Factores tóxicos de leguminosas cultivadas en Chile. III. Hemaglutininas. *Arch Latinoamer Nutr*. 1974; 32: 191-200.
- 98.- Yachnin S & Svenson RH. The immunological and physicochemical properties of lymphogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*. *Immunology*. 1972; 22: 871-873.
- 99.- Lis H & Sharon N. Lectins as molecules and as tools. *Ann Rev Biochem*. 1986; 55: 35-67.
- 100.- Forrest BD. Identification of an intestinal immune response using peripheral blood lymphocytes. *Lancet*. January 1988: 81-83.
- 101.- Michalek SM, McGhee JR, Kiyono H, Colwell DE, Eldridge JH, Wannemuelhler MJ & Koopman WJ. The IgA response: inductive aspects, regulatory cells and effector functions, in "The secretory immune system". Edited by McGhee JR & Mestecky J. *Ann NY Acad Sci*. 1983; 409: 48-71.

102. Ortiz, Víctor M. Estudio morfológico y funcional de los efectos producidos por lectinas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) sobre la respuesta inmune intestinal en ratas. Tesis. Facultad de Química, UNAM. 1992.
103. Zeitz M, Greene WC, Peffer NJ & James SP. Lymphocytes isolated from the intestinal lamina propria of normal nonhuman primates have increased expression of genes associated with T-cell activation. *Gastroenterology*. 1988; 94: 647-655.
104. Meuer S & Resch K. Cellular signalling in T lymphocytes. *Immunol Today*. 1989; 10 (suppl): S23-S27.
105. Hadden JW. Transmembrane signals in the activation of T lymphocytes by mitogenic antigens. *Immunol Today*. 1988; 9: 235-239.
106. Goodman T & Lafrancois L. Expression of the  $\alpha\delta$  T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. *Nature*. 1988; 333: 855-857.
107. Elson CO. Specialized receptors for antigens on gut epithelial T cells (summary). *Gastroenterology*. 1989; 97: 1341-1342.
108. Ceuppens JL, Baroja ML, Lorren K, vanDamme J & Billiau A. Human T cell activation with phytohemagglutinin: the function of IL-6 as an accessory signal. *J Immunol*. 1988; 141: 3868-3874.
109. O'Flynn K, Russul-Saib M, Ando I, Wallace DE, Beverly PCL, Boylston AW & Lynch DC. Different pathways of human T-cell activation revealed by PHA-P and PHA-M. *Immunology*. 1986; 57: 55-60.
110. Kabelitz D. Do CD2 and CD3-TCR T-cell activation pathways function independently?. *Immunol Today*. 1990; 11: 44-47.
111. James WPT. Future of nutritional science: challenges for the year 2000. Plenary Lecture at the Sixth European Nutrition Conference of the Federation of European Nutrition Societies. *Eur J Clin Nutr*. 1991; 45 (suppl 2): 2-7.

## VIII. ANEXOS.

### ANEXO 1

#### COMPOSICION DE LA DIETA PARA ROEDORES, MARCA "PURINA".

(Obtenida directamente del producto, de acuerdo con las especificaciones del fabricante)

Proteínas	min. 23 %
Grasa	min. 2.5 %
Fibra	max. 6.0 %
Cenizas	max. 8.0 %
Humedad	max. 12.0 %
ELN	min. 48.5 %
Calcio	max. 1.0 %
Fosforo	min. 0.6 %

#### FORMULA.

Cereales molidos, combinación de pastas de oleaginosas, harinas de origen animal (sangre, hueso, pescado), subproductos de cereales (cascarillas), subproductos de alimentos agrícolas e industriales, alfalfa deshidratada, melaza de caña de azúcar.

#### VITAMINAS.

Vitamina A, tiamina (B<sub>1</sub>), riboflavina (B<sub>2</sub>), cianocobalamina (B<sub>12</sub>), niacina, cloruro de colina, pantotenato de calcio, vitamina D, vitamina E y vitamina K.

#### MINERALES.

Carbonato de calcio, roca fosfórica, cloruro de sodio, fosfato de calcio, carbonato de cobre, óxido cúprico, óxido férrico, sulfato ferroso, óxido de manganeso, yoduro de potasio, óxido de zinc.