

120/114
2EJ

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



ESTUDIO MORFOLOGICO Y FUNCIONAL DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR LECTINAS DE FRIJOL COMUN (Phaseolus vulgaris) SOBRE LA RESPUESTA INMUNE INTESTINAL EN RATAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO
B I O L O G O
P R E S E N T A :
VICTOR MANUEL ORTIZ ORTEGA

MEXICO, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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. ANTECEDENTES | 1 |
| 1. MECANISMOS DE DEFENSA INESPECIFICOS ASOCIADOS AL INTESTINO. | 1 |
| 1.1 Jugo Gástrico. | 1 |
| 1.2 Secreción Mucosa. | 1 |
| 1.3 Barrera Epitelial. | 2 |
| 2. SISTEMA INMUNE INTESTINAL. | 3 |
| 2.1 Tejido Linfoide Asociado al Intestino. | 3 |
| 2.1.1 Tejido Linfoide Disperso. | 3 |
| 2.1.2 Tejido Linfoide en Agregados. | 5 |
| 2.2 Epitelio Intestinal. | 9 |
| 2.3 Inducción de la respuesta inmune intestinal | 10 |
| 3. ASPECTOS GENERALES DE LAS LECTINAS. | 15 |
| 4. LECTINA DE FRIJOL COMUN | 21 |
| 4.1 Toxicidad de la PHA. | 24 |
| II. JUSTIFICACION | 29 |
| III. OBJETIVOS | 31 |
| IV. MATERIALES Y METODOS | 32 |
| 1. SELECCION DE LAS SEMILLAS DE FRIJOL | 32 |
| 2. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE FRIJOL | 32 |
| 3. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE FRIJOL | 33 |
| 3.1 Suspensión de eritrocitos | 33 |
| 3.2 Tratamiento de eritrocitos de vaca con tripsina | 33 |
| 3.3 Prueba de hemaglutinación | 34 |
| 4. INHIBICION DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE POR ADICION DE AZUCARES SENCILLOS | 34 |
| 5. ENSAYOS BIOLOGICOS | 36 |
| 6. DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-PHA, EN EL SUERO DE LAS RATAS | 37 |
| 7. MORFOLOGIA INTESTINAL Y LOCALIZACION DE LA PHA EN EL INTESTINO | 38 |
| 7.1 Método | 39 |
| 7.2 Observación morfológica por tinción con hematoxilina eosina | 39 |
| 7.3 Tinción de Inmunoperoxidasa | 40 |
| 7.4 Observaciones de los cortes teñidos por inmunoperoxidasa | 41 |
| 8. ANALISIS ESTADISTICO | 42 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSION | 43 |
| 1. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE FRIJOL | 43 |
| 2. INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION POR LA ADICION DE AZUCARES | 45 |
| 3. EFECTO DE LA LECTINA SOBRE EL ESTADO GENERAL DE LAS RATAS | 47 |
| 4. ANTICUERPOS ANTI-PHA EN SUERO | 50 |

| | |
|---|----|
| 5. MORFOLOGIA INTESTINAL | 55 |
| 6. LOCALIZACION DE LA LECTINA EN EL INTESTINO | 59 |
| VI. CONCLUSIONES | 70 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | 73 |
| VIII. ANEXOS | 80 |

INDICE DE FIGURAS

| No. | Página |
|---|---------------|
| 1. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LAS PLACAS DE PEYER | 6 |
| 2. TRANSPORTE DE ANTIGENOS POR LA CELULA M. | 12 |
| 3. MIGRACION CELULAR A TEJIDOS MUCOSOS. | 13 |
| 4. MODELO DEL TRANSPORTE EPITELIAL DE LA Iga DIMERICA | 14 |
| 5. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA AGLUTINACION Y DE LA INHIBICION DE LA AGLUTINACION | 19 |
| 6. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA ESTRUCTURA TETRAMERICA DE LOS 5 HIBRIDOS DE LA FITOHEMAGLUTININA | 22 |
| 7. MODELO DEL RECEPTOR PARA LA PHA | 35 |
| 8. ANTICUERPOS ANTI-PHA DE CLASE Igm | 52 |
| 9. ANTICUERPOS ANTI-PHA DE CLASE Igg | 53 |
| 10. PORCION PROXIMAL DE INTESTINO DELGADO (DUODENO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO PBS POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 14 DIAS (GRUPO TESTIGO). TINCION HEMATOXILINA-EOSINA | 56 |
| 11. PORCION PROXIMAL DE INTESTINO DELGADO (DUODENO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO EL EXTRACTO COCIDO DEL FRIJOL BAYO POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 14 DIAS. TINCION HEMATOXILINA-EOSINA | 57 |
| 12. PORCION PROXIMAL DE INTESTINO DELGADO (DUODENO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO EL EXTRACTO CRUDO DEL FRIJOL BAYO POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 14 DIAS. TINCION HEMATOXILINA-EOSINA | 58 |
| 13. PORCION PROXIMAL DE INTESTINO DELGADO (DUODENO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO PBS POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 14 DIAS (GRUPO TESTIGO). TINCION INMUNOPEROXIDASA | 61 |
| 14. PORCION PROXIMAL DE INTESTINO DELGADO (DUODENO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO EL EXTRACTO COCIDO DEL FRIJOL BAYO POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 14 DIAS. TINCION INMUNOPEROXIDASA | 62 |
| 15. PORCION PROXIMAL DE INTESTINO DELGADO (DUODENO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO EL EXTRACTO CRUDO DEL FRIJOL BAYO POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 3 DIAS. TINCION INMUNOPEROXIDASA | 63 |
| 16. PORCION MEDIAL DE INTESTINO DELGADO (YEYUNO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO EL EXTRACTO CRUDO DEL FRIJOL BAYO POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 3 DIAS. TINCION INMUNOPEROXIDASA | 65 |
| 17. PORCION PROXIMAL DE INTESTINO DELGADO (DUODENO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO EL EXTRACTO CRUDO DEL FRIJOL BAYO POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 14 DIAS. TINCION INMUNOPEROXIDASA | 67 |

INDICE DE CUADROS

| No. | Página |
|---|--------|
| 1. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE EXTRACTOS SALINOS DE FRIJOL BAYO | 43 |
| 2. INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION POR LA ADICION DE DIFERENTES AZUCARES | 46 |
| 3. VARIACION DE PESO DE LAS RATAS ALIMENTADAS CON LOS EXTRACTOS COCIDO Y CRUDO DEL FRIJOL BAYO | 48 |
| 4. CONCENTRACION DE ALBUMINA Y DE PROTEINAS TOTALES EN EL SUERO DE LAS RATAS ALIMENTADAS CON LOS EXTRACTOS SALINOS DE FRIJOL BAYO | 50 |
| 5. ANTICUERPOS ESPECIFICOS ANTI-PHA EN EL SUERO DE RATAS ALIMENTADAS CON EXTRACTO SALINO DE FRIJOL | 51 |
| 6. LOCALIZACION DE LA LECTINA (PHA) EN EL INTESTINO DELGADO DE RATAS ALIMENTADAS CON EL EXTRACTO CRUDO DEL FRIJOL BAYO | 64 |

I. ANTECEDENTES

1. MECANISMOS DE DEFENSA INESPECIFICOS ASOCIADOS AL INTESTINO.

La mucosa del intestino delgado se encuentra expuesta a un constante desafío de antígenos extraños los cuales son ingeridos junto con los alimentos (productos de hidrólisis de los alimentos, microorganismos y sus toxinas). No es sorprendente, por lo tanto, que el organismo contenga mecanismos que protegen el privilegiado medio ambiente de la lámina propia intestinal del desafío de esos antígenos. El HCl secretado por el estómago, las enzimas digestivas en el tracto gastrointestinal, la cubierta mucosa y la barrera intestinal, son algunos de los mecanismos naturales que contribuyen en la protección del organismo.

1.1 Jugo Gástrico.

Los principales constituyentes de la secreción exócrina de las glándulas gástricas son ácido clorhídrico, pepsinógenos de los cuales al menos siete variedades han sido identificadas en el jugo gástrico humano y el moco.

El jugo gástrico del estómago protege al intestino delgado de la invasión y de la posterior colonización de microorganismos patógenos ingeridos junto con los alimentos. Junto con esto, la hidrólisis de las proteínas de los alimentos por las pepsinas contribuyen a disminuir su potencial antigenicidad (1).

1.2 Secreción Mucosa.

Existen dos distintas formas físicas de moco: a) una capa delgada y estable de gel insoluble en agua, firmemente adherida a la superficie mucosa, y b) un componente mucoso soluble mezclado con jugo luminal que descansa sobre el gel. Ambos, el gel adherente y el moco soluble están compuestos de glicoproteínas mucosas (mucinas) que confieren a la secreción sus propiedades viscosas. Las mucinas son secretadas hacia el del tracto gastrointestinal por las células caliciformes (2).

Las células caliciformes proporcionan protección inmediata para la mucosa contra sustancias nocivas que llegan al lumen. De esta forma, las bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal y que han resistido al pH ácido del estómago son embebidas en el gel mucoso y separadas físicamente de la mucosa, limitando su potencial de causar daño tisular. Asimismo, el gel mucoso es permeable a solutos de bajo peso molecular, pero no a grandes macromoléculas, tales como proteínas (3).

El gel adherente, junto con el moco viscoso, también protegen al epitelio del posible daño mecánico generado por la fuerza motil y paso del alimento, así como de la acción de la pepsina (2, 3).

1.3 Barrera Epitelial.

Las principales funciones del epitelio intestinal es la de actuar como una barrera mecánica que, por un lado, impida la pérdida de metabolitos, iones y agua, así como limitar el ingreso de sustancias y microorganismos al organismo.

El epitelio proporciona un forro continuo al tracto gastrointestinal, en el cual las células están unidas en regiones especializadas de la membrana celular llamado complejo de unión, generalmente localizado en el extremo apical de la célula y que consta de tres elementos estructurales : 1) la "zona de ocludencia" o "unión estrecha", donde las membranas de las células adyacentes parecen fusionarse (la unión es tan estrecha que las moléculas grandes son incapaces de pasar entre ellas), 2) la "zona de adherencia" o "unión intermedia" que tiene un papel mecánico en unir a las células adyacentes y, 3) las "máculas de adherencia" o "desmosomas" estructuras en forma de discos que proporciona una fuerte unión mecánica entre células vecinas (4).

El complejo de unión es de gran importancia ya que proporciona un sello hermético que evita el ingreso de moléculas o microorganismos al interior del organismo.

2. SISTEMA INMUNE INTESTINAL.

Como se mencionó anteriormente, el tracto gastrointestinal interacciona con gran cantidad de sustancias extrañas al organismo. (antígenos dietarios, bacterianos y toxinas) y que a través de mecanismos naturales inespecíficos limita la acción de estos. Sin embargo, en ocasiones estas sustancias pueden evadir estos mecanismos por lo que es necesario un sistema de defensa más eficiente para lograr su eliminación. El sistema inmune del organismo es una mejor defensa en la prevención de que los antígenos crucen la mucosa y en la protección contra los efectos nocivos de los antígenos cuando ya han penetrado. Dicha respuesta debe ser eficaz y debe estar regulada apropiadamente, de tal forma que limite o elimine la acción de dichas sustancias pero sin dañar la integridad y funcionamiento del delicado tejido asociado a la mucosa.

2.1 Tejido Linfoide Asociado al Intestino.

La mucosa intestinal esta expuesta frecuentemente a antígenos, por lo que no es sorprendente que en el intestino se encuentre la mayor acumulación de tejidos linfoides del organismo. El Tejido Linfoide Asociado al Intestino (GALT, por sus siglas en inglés) incluye a la población linfoide dispersa que se encuentra en el epitelio y en la lámina propia, y a los agregados linfoides de las placas de Peyer.

2.1.1 Tejido Linfoide Disperso.

La mucosa del intestino delgado en humanos y en animales contiene un gran número de linfocitos. Estos están agrupados en dos poblaciones principales y constituyen el tejido linfoide disperso de la mucosa intestinal.

Los linfocitos intraepiteliales (IEL, por sus siglas en inglés) se localizan intercalados entre las células epiteliales que forman las vellosidades.

Con el uso de técnicas inmunohistoquímicas se ha demostrado que los IEL son predominantemente linfocitos T (CD 3⁺) (>90%) y que en su mayoría (>80%) expresan el fenotipo supresor/citotóxico (CD 8⁺) (5-8).

En condiciones normales existe una población de 6 a 40 linfocitos IEL por cada 100 células epiteliales, aunque durante algunas enfermedades intestinales, se observa un incremento en su número lo cual refleja que éstos juegan un papel importante en la respuesta inmune local del intestino. Algunos reportes (9) indican que en el sistema murino, los IEL exhiben actividad de linfocitos T citotóxicos y pueden regular respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) en la mucosa. Sin embargo, la naturaleza precisa del papel que desempeñan ha sido difícil de determinar debido a que los IEL no responden (o tienen una baja respuesta) a la estimulación por diferentes mitógenos *in vitro*. Esto ha llevado a la hipótesis de que los IEL no proliferan *in vitro* debido a que ellos ya han sido previamente activados *in situ* (10).

Los estudios realizados en ratón han demostrado que los IEL expresan exclusivamente el receptor de célula T (TCR) compuesto por las subunidades γ/δ y no el convencional TCR compuesto por las subunidades α/β ; lo que sugiere que los IEL exhiben actividad citotóxica (11, 12). Por otro lado, se ha demostrado que la mayoría de los IEL en humanos expresan las subunidades del TCR α/β , que junto con la expresión del marcador CD 45, sugiere que son principalmente células T de "memoria" (13, 14).

Los linfocitos de la lámina propia (LPL), constituyen en realidad una población mixta, en la cual se incluyen a linfocitos T, células plasmáticas, macrófagos, células NK y células cebadas que se encuentran localizados en los espacios del tejido conectivo o lámina propia de la mucosa del intestino delgado y del intestino grueso (7).

Con el uso de anticuerpos monoclonales se ha demostrado que la población predominante en los LPL la constituyen linfocitos B (células plasmáticas) (15). Aunque estas células se distribuyen de manera homogénea en toda la lámina propia de la mucosa intestinal, existe una tendencia a agruparse más densamente en el ápice de la vellosidad, justo debajo del epitelio, mientras que en la parte media y basal de la vellosidad, su número es menor (6).

Existe una clara predominancia de células plasmáticas que sintetizan IgA (80%), seguidas por IgM (15%) e IgG (5%) y en menor número IgD o IgE (<1%) (6).

La segunda población celular predominante en la lámina propia de la mucosa intestinal la constituyen los linfocitos T. A diferencia de los IEL, éstos expresan el fenotipo cooperador/inductor (CD 4⁺) (5-8, 16), y participan en la estimulación y proliferación de las células B, durante la inducción de la respuesta inmune local (7).

2.1.2 Tejido Linfoide en Agregados.

Las placas de Peyer constituyen el tejido linfoide en agregados y se localizan sobre la pared antimesentérica del intestino delgado. Cada una consiste en una colección de folículos linfoides subepiteliales.

Morfológicamente el tejido linfoide de las placas de Peyer consta de cuatro áreas: el folículo, que contiene un centro germinal, el "domo" sobre el folículo, un borde fino de células debajo del centro germinal y un área interfolicular (figura 1) (17).

La distribución celular en las placas de Peyer no es al azar. En el centro germinal predominan los linfocitos B (40-70%) y en menor proporción los linfocitos T (11-40%), los cuales se localizan principalmente en el "domo" y en las áreas interfoliculares. El

borde del folículo esta poblado principalmente por células "nulas". En el folículo también se encuentran algunos macrófagos y células dendríticas, los cuales funcionan como células presentadoras de antígeno (17).

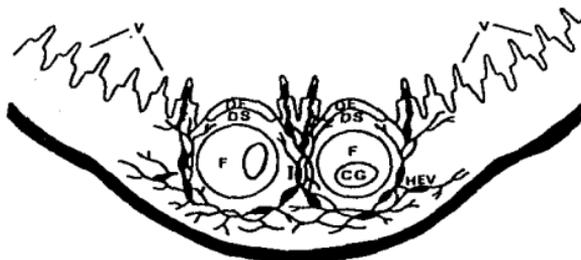


Figura 1. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LAS PLACAS DE PEYER. F:Foliculo, CG: Centro Germinal, I: Area Interfolicular, DE: Domo Epitelial, DS: Domo Subepitelial, HEV: Venula Endotelial "Alta", V: Vellosidades. (De Mole et. al. Advanced Immunology. Gowe Medical Publishing. 1987.)

Entre las células del epitelio que cubre a las placas de Peyer, se encuentran intercaladas células especializadas muy importantes en la iniciación de la respuesta inmune. Estas células han sido llamadas "células micropliegue" debido a que en lugar de presentar las características microvellosidades, presentan micropliegues en su superficie luminal, "células membranosas" debido a la formación de una membrana separando células linfoides del lumen y, más recientemente, simplemente "células M" (18).

Las células M se han identificado también en las amígdalas, el apéndice y los bronquios (18, 19), en diferentes especies como aves, conejos, cerdos, terneros, ratones, ratas, monos, hamsters y perros (17). Estas células son consideradas como el punto de entrada de los antígenos a la placa de Peyer (20).

Diferentes estudios ultraestructurales realizados hasta ahora, han establecido la naturaleza básica de la célula M. En tales estudios se ha demostrado que la célula M madura, se caracteriza por un estrecho citoplasma en su porción apical, abundantes vesículas pinocíticas en el citoplasma y un núcleo localizado en la porción basal. El citoplasma rodea a una o a más células, las cuales usualmente son linfocitos, linfoblastos o macrófagos, pero ocasionalmente son células plasmáticas o raramente leucocitos polimorfonucleares. Estas células no están en el citoplasma de la célula M, sino que están en el espacio intercelular que mella el citoplasma de la célula M, formando un "hueco central" (17, 20).

El proceso de renovación celular en el epitelio de las placas de Peyer es similar a aquel de las vellosidades intestinales: la migración de células maduras al domo epitelial, ocurre desde las criptas que rodean al epitelio de la placa de Peyer (17, 21).

Estudios realizados con peroxidasa de rábano sobre la función de las células M, han demostrado que ésta macromolécula se une inicialmente a la superficie luminal de la célula M, entonces es captada en vesículas pinocíticas y es transportada hacia la superficie basal de la célula, donde es liberada en el espacio extracelular junto con el contenido vesicular (22). También se ha demostrado que una gran cantidad de materiales, incluyendo moléculas solubles (como ferritina y algunas lectinas) y moléculas particuladas (bacterias y virus) (18, 23), se unen preferencialmente a la membrana de la célula M después de entrar al tracto gastrointestinal y son transportados a través de la célula

M de la misma manera como la descrita para la peroxidasa de rábano (20).

Estos estudios han demostrado que la célula M tiene la función de transportar una gran variedad de macromoléculas incluyendo virus y bacterias desde la luz intestinal hasta el tejido linfoide subyacente (20, 23).

Debido a que las células M realizan transporte macromolecular bidireccional y a que su superficie basolateral esta en contacto estrecho con linfocitos B, se ha sugerido que las células M pueden transportar IgA hacia el lumen intestinal tal como lo hacen las células absortivas; sin embargo, la ausencia de componente secretor (CS) en las células M y en todas las células del epitelio que cubre a la placa de Peyer, confirma que las células M no participan en el transporte de IgA hacia la luz intestinal (21).

Hasta la fecha no esta bien establecido el mecanismo por el cual los antígenos se adhieren a la célula M. Se ha sugerido que las características estructurales de la célula M (escasas microvellosidades y poco glicocálix) la hacen más accesible para la unión de los antígenos.

También se ha sugerido que la IgA de la luz intestinal puede afectar la unión y transporte de antígenos por la célula M, ya que se ha demostrado que ciertos complejos antígeno-IgA pueden adherirse selectivamente a la membrana de la célula mientras que el antígeno solo, no lo hace (23).

Estos datos sugieren que la unión eficiente y el transporte de complejos antígeno-IgA por la célula M debe servir para realzar o sostener la respuesta inmune mucosa una vez que ésta ha sido iniciada.

Debido a que las células M no expresan las moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (DR) (31), es poco probable que funcione como célula presentadora de antígeno. Sin embargo, lo que sí es claro es que las células M pueden modular respuestas inmunes mucosas determinando la dosis o concentración del antígeno transportado.

2.2 Epitelio Intestinal.

Durante años el epitelio del intestino delgado fue visto únicamente como una barrera física que impedía la entrada de antígenos extraños al organismo y cuya única función fisiológica era su participación en la digestión y la absorción de los nutrimentos.

Fue hasta 1978 (24), que se descubrió que el epitelio del intestino delgado expresa moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) (HLA en humanos, H-2 en ratón). Esta observación llevó a la hipótesis de que el epitelio podía participar en la presentación selectiva de antígenos así como en el control de la respuesta inmune.

En condiciones normales, las células epiteliales del intestino delgado expresan las moléculas -DR y en menor grado moléculas -DP mientras que las de clase -DQ, no se expresan (25).

Las células epiteliales que cubren a las placas de Peyer, también expresan moléculas de clase II (26, 27), mientras que las células en las criptas de Lieberkühn, las células caliciformes y el epitelio del intestino grueso, normalmente no expresan estas moléculas de clase II (5, 26-31).

En algunos epitelios, la expresión de estas moléculas queda reprimida, como ocurre con el epitelio ductal de la glándula mamaria y el epitelio del intestino grueso. Su expresión es

inducida por las influencias fisiológicas o inmunológicas, de lactación e inflamación, respectivamente (28).

Existe el concepto de que el epitelio gastrointestinal es una barrera impermeable e impenetrable a la captación y transporte de macromoléculas lumenales. Sin embargo existen evidencias abrumadoras de que al menos algunas proteínas que escapan a la digestión intraluminal son transportadas intactas por las células epiteliales en cantidad suficiente para iniciar una respuesta inmune específica (32-34).

Esta observación, junto con la característica de las células epiteliales de expresar constitutivamente moléculas de clase II del HLA, despertaron el interés en determinar si la célula epitelial podía funcionar como célula presentadora de antígeno teniendo, de esta forma, una participación directa en la inducción de respuestas inmunes en las mucosas.

Se ha demostrado (30) que las células epiteliales aisladas del intestino delgado de ratas inmunizadas con ovoalbúmina o r-globulina humana, pueden presentar estos antígenos proteicos solubles a linfocitos T *in vitro* de manera específica. Esta actividad fue inhibida por la adición de anticuerpos anti-clase II (anti-I-A) durante el cultivo de inducción.

Al parecer la presentación de antígenos proteicos solubles por las células epiteliales parece causar activación de linfocitos T con el fenotipo supresor/citotóxico (35).

2.3 Inducción de la respuesta inmune intestinal.

La superficie mucosa representa una enorme área a través de la cual antígenos y microorganismos del medio ambiente interaccionan con el sistema inmune del organismo (36). Se ha demostrado que dependiendo de la clase de antígeno, la dosis y la frecuencia de administración, la respuesta inmune puede diferir entre un estado

de tolerancia y un estado de reactividad celular o humoral (37). Una respuesta inmune humoral asociada a la mucosa lleva a la producción de IgA secretoria (IgAs), el isotipo predominante en secreciones externas (36, 37).

Con objeto de iniciar la respuesta inmune local que proteja al organismo, el antígeno primero debe penetrar la barrera mucosa; la célula M es el camino más probable por el que la mayoría de los antígenos cruzan el epitelio intestinal.

El antígeno se une a receptores en la superficie de la célula M y es transportado en vesículas por pinocitosis hasta áreas donde interacciona con macrófagos y linfocitos de la placa de Peyer (figura 2) (22).

Los linfocitos B activados cambian el isotipo de inmunoglobulina que expresan en su superficie: al principio expresan IgM de membrana (mIgM⁺) y después expresan IgA de membrana (mIgA⁺) (14, 38).

Con el uso de técnicas de clonación, se ha demostrado que este cambio es regulado por subclases de linfocitos T específicos llamados linfocitos de "switch", presentes en la placa de Peyer (38).

Estos linfocitos T de "switch" portan el marcador de superficie CD 4⁺ característico de linfocitos T con función cooperador/inductor (39). Gracias a los avances recientes en la tecnología de DNA recombinante, los genes que codifican para las moléculas de inmunoglobulinas han sido identificados y su estructura analizada. En el ratón, el orden de los genes que codifican para la región constante de las cadenas pesadas (C_H) de los diferentes isotipos es μ (IgM), δ (IgD), τ (IgG), ϵ (IgE) y α (IgA). En el humano existen pequeñas diferencias en el orden de genes. El gene para C_H expresado inicialmente al principio del

desarrollo del linfocito B es el primero en la secuencia, es decir, μ . Para que los otros isotipos sean expresados, debe ocurrir un rearrreglo del DNA de tal forma que los otros genes de C_H sean suprimidos. Así, el cambio en el isotipo de IgM a IgA requiere la supresión de todos los genes C_H excepto α , el último de la secuencia (39).

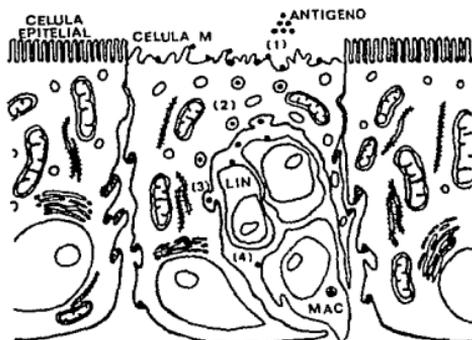


Figura 2. TRANSPORTE DE ANTIGENOS POR LA CELULA M. (1) El antígeno se une a la superficie de la célula M, (2) es transportado en vesículas pinocíticas, (3) liberado al espacio extracelular para finalmente, (4) activar células linfoides (De Owen R L. 1977) (22).

El mecanismo exacto por el cual los linfocitos T son capaces de inducir el rearrreglo de genes C_H en los linfocitos B, es aún desconocido.

Una vez activados los linfocitos, éstos abandonan la placa de Peyer, vía los conductos linfáticos eferentes y migran hacia los nódulos linfáticos mesentéricos, para pasar posteriormente al conducto torácico y de ahí, a la circulación sanguínea. La etapa final envuelve la migración al bazo y su retorno o "homíng" a la

lámina propia del intestino, así como a otras mucosas en órganos como el pulmón, el tracto genito-urinario, y las glándulas mamarias, lagrimales y salivales (figura 3). Esta observación ha llevado al concepto de la existencia de un "sistema inmune común de las mucosas" (14,38).

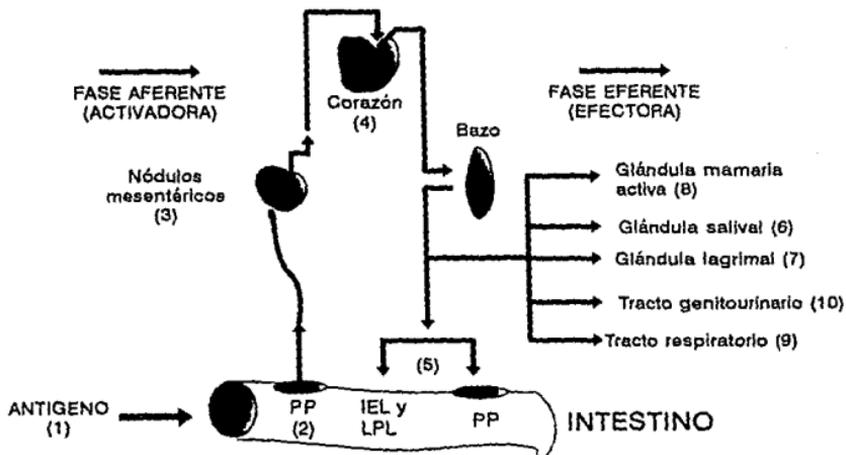


Figura 3. MIGRACION CELULAR A TEJIDOS MUCOSOS.

(1) Entrada del antígeno por vía oral. (2) Activación de linfocitos en placa de Peyer. (3) Migración de linfocitos activados a Nódulos Linfáticos Mesentéricos. (4) Entrada a circulación sanguínea a través del conducto torácico. (5) Retorno al sitio de origen y/o migración a otros sitios mucosos tales como (6) Glándula salival, (7) Glándula lagrimal, (8) Glándula mamaria, (9) Pulmón y, (10) Tracto Genitourinario. (Modificado de Jones 1984) (38).

La lámina propia es el sitio donde ocurre la diferenciación final de los linfocitos B mIgA⁺ a célula plasmática productora de IgA (38).

Todas las superficies mucosas procesan a la IgA recién sintetizada, en la misma forma como lo hace la mucosa intestinal: los monómeros de IgA son enlazados entre sí dentro de la célula plasmática por una glicoproteína llamada cadena J (15 Kd) (38).

La IgA dimerica sintetizada puede alcanzar la luz intestinal por dos rutas. En la primera, la IgA dimerica se une a su receptor, el componente secretor (CS) (70 Kd) sobre la superficie basal de las células epiteliales intestinales y es endocitado y transportado a través de éstas células para ser liberado a la luz intestinal (figura 4) (40).

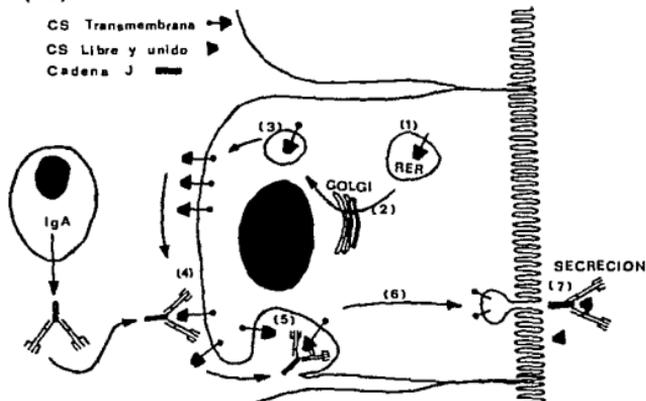


Figura 4. MODELO DEL TRANSPORTE EPITELIAL DE LA IgA DIMERICA. (1) Síntesis y glicosilación del CS en el retículo endoplásmico rugoso (RER). (2) Glicosilación final (.) en el aparato de Golgi. (3) Expresión del CS en la superficie basolateral de la célula epitelial. (4) Unión del CS con IgA dimerica. (5) Endocitosis del complejo IgA-CS y de CS libre. (6) Transporte de vesículas a través de la célula. (7) Liberación de IgAs y de CS libre. (De Brandtzaeg 1989) (14).

El CS estabiliza el dímero de IgA y le confiere resistencia frente a la degradación por las secreciones del tracto gastrointestinal (38).

En la segunda ruta, la IgA dimérica entra a la circulación y se une con el CS en la membrana de los hepatocitos (en roedores) o sobre las células epiteliales del ducto biliar (en humanos) y es transportada activa y selectivamente en vesículas y secretada en la bilis. Se ha propuesto que la IgA liberada al intestino por la ruta hepatobiliar sirve para aumentar la cantidad de IgAs en el intestino y así amplificar el sistema de defensa local contra la carga diaria de antígenos recién introducidos (40, 41).

3. ASPECTOS GENERALES DE LAS LECTINAS.

Las semillas de las plantas de la familia *Leguminosae*, particularmente las del género *Phaseolus*, constituyen una fuente importante de proteína y de energía para gran parte de la población mexicana. A pesar de su notable papel en la dieta humana, se sabe que tienen, al mismo tiempo, una gran variedad de sustancias que pueden ser consideradas "tóxicas" para el organismo.

Afortunadamente, la mayoría de estas sustancias son termolábiles y mediante un adecuado proceso de cocción pueden ser eliminadas.

Existe evidencia arqueológica de que los primeros habitantes de América consumían el frijol ancestral *Phaseolus aborigineus*, como base de su alimentación, ya que éste ha sido encontrado en gran parte del continente Americano, desde Argentina hasta México (42).

Es difícil imaginar cómo aprendió el hombre primitivo a utilizar el fuego para preparar alimentos comestibles de éstas semillas de frijol ancestral, ya que se ha demostrado que éstas

contenían los mismos constituyentes tóxicos termolábiles que las semillas de los cultivos modernos de frijol.

Entre los constituyentes tóxicos presentes en el frijol se encuentran inhibidores de enzimas (tripsina, quimotripsina y α -amilasa), factores productores de bocio, fitatos, saponinas y las lectinas o hemaglutininas (42, 43).

La primera descripción de lo que hoy se conoce como lectina fue hecha por Stillmark en 1889 quien, estudiando la toxicidad de las semillas de ricino (*Ricinus communis*) encontró que éstas semillas contenían una proteína altamente tóxica que él nombró RICINA, la cual era capaz de aglutinar glóbulos rojos humanos y de diferentes especies animales (42, 44, 45). Poco después, Hellin descubrió la segunda lectina de que se tuvo conocimiento, la ABRINA, una proteína contenida en las semillas de *Abrus precatorius*.

La ricina y la abrina, inmediatamente atrajeron la atención de Paul Ehrlich, quién trabajando con éstas dos proteínas descubrió algunos de los principios más fundamentales de inmunología. En 1891, reportó que los ratones se hacían inmunes a una dosis letal de ricina mediante inyecciones subcutáneas repetidas de pequeñas cantidades de la proteína. El también demostró que el suero de un ratón inmune podía neutralizar la toxicidad de ricina y, además, que esta acción era específica, ya que la "anti-abrina", que desarrolló en el suero de un animal inmunizado con abrina, no podía neutralizar los efectos tóxicos de ricina, ni "anti-ricina" podía neutralizar a la abrina (44).

En 1897, Elfstrand sugirió el nombre de "aglutininas" para denotar a estas proteínas contenidas en las semillas de las plantas capaces de aglutinar glóbulos rojos. Sin embargo, posteriormente se observó que otros organismos diferentes a las plantas también contenían proteínas capaces de aglutinar células, por lo que el

término "lectinas" propuesto por Boyd y Shapleigh en 1954, pareció más apropiado (42).

El término lectina proviene de la palabra latina *legere* que significa, "elegir" o "escoger", haciendo referencia a la especificidad con que reaccionan las lectinas con los azúcares (42, 44).

Las lectinas, son proteínas o glicoproteínas que tienen afinidad específica hacia ciertos azúcares o residuos de ellos (42).

Aunque difieren en sus especificidades a azúcares poseen algunas características y propiedades fisicoquímicas en común. Todas las lectinas son proteínas, aunque algunas llevan azúcares unidos covalentemente y pueden así ser clasificadas como glicoproteínas (42). Generalmente consisten de 2 ó 4 subunidades (25-30 kd), cada una con un sitio de unión a azúcares. La interacción con los azúcares requiere la presencia de iones Ca^{2+} y Mn^{2+} (u otro metal de transición). Las secuencias primarias de más de 15 lectinas de leguminosas se han determinado por medio de técnicas químicas o de biología molecular y se ha demostrado que existe un número significativo de residuos de aminoácidos constante, los cuales participan en la unión con el metal (46).

Las lectinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza desde mohos de pantanos, setas, líquenes, plantas con flor, membranas de bacterias, crustáceos, moluscos, suero de peces, huevos de anfibios y aún, en tejidos de mamíferos. Sin embargo, la principal fuente la constituyen las plantas pertenecientes a la familia *Leguminosae* (42, 44, 47), en las cuales el contenido de lectinas varía del 1.5 al 3 % del total de proteína (48).

En la mayoría de las plantas superiores, las lectinas se localizan en sus semillas, aunque también se han detectado en la savia, las hojas, los tallos y la corteza (42, 44, 47).

El papel biológico de las lectinas en la naturaleza -en plantas o en otros organismos- es un misterio.

Se ha sugerido que las lectinas promueven la nodulación de las raíces de plantas por bacterias fijadoras de nitrógeno, principalmente del género *Rhizobium*, o que actúan como anticuerpos destinados a contrarrestar bacterias del suelo y para proteger a las plantas contra el ataque de hongos inhibiendo polisacarasas fungales. También se ha propuesto que las lectinas participan en el transporte y almacén de azúcares, y en la unión de enzimas en sistemas multienzimáticos organizados. En vista de las propiedades mitogénicas de las lectinas se ha sugerido que su función sea controlar la división celular y germinación en plantas (42, 44, 47).

Las lectinas poseen múltiples sitios de unión, mediante los cuales pueden combinarse con residuos de azúcares que sobresalen de la membrana celular (de los glicolípidos y glicoproteínas que la constituyen), e interconectar varias células adyacentes entre sí, ocasionando la formación de redes intercelulares y la aglutinación de éstas. La reacción de hemaglutinación (usando eritrocitos como modelo celular), es el efecto más fácilmente observable de esta unión y solo ocurre si la molécula de lectina posee, al menos, dos grupos reactivos (figura 5 a). La aglutinación celular puede ser inhibida por la adición de azúcares sencillos por los cuales la lectina es afín, bloqueando así sus receptores (figura 5 b) (42).

El receptor en la superficie celular debe estar expuesto para reaccionar con la lectina específica. La "activación" o "sensibilización" de eritrocitos, por su digestión con papaína o

tripsina, favorece la exposición de los receptores haciéndolos accesibles a las lectinas.

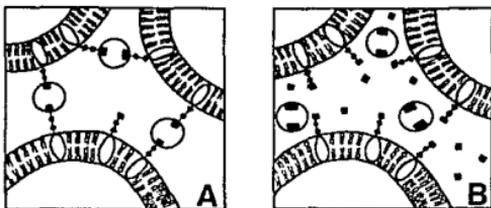


Figura 5. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA AGLUTINACION Y DE LA INHIBICION DE LA AGLUTINACION.

a) aglutinación de eritrocitos por la unión de la lectina a los residuos de azúcares sobre la membrana, b) inhibición de la aglutinación por la adición de azúcares sencillos, los cuales bloquean los receptores de la lectina.

Las lectinas poseen una gran cantidad de actividades biológicas, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Entre sus actividades *in vitro* se encuentran:

- la aglutinación de eritrocitos, en ocasiones, con muy alta especificidad por lo que son usadas en la tipificación de sangre humana y en el estudio de la estructura de sustancias de grupo sanguíneo (43, 44, 48)
- la interacción con oligosacáridos sobre la superficie de las células, que puede ser inhibida específicamente por la adición

de azúcares simples, por lo que proporcionan una valiosa herramienta para la caracterización bioquímica y molecular de la arquitectura de superficies celulares (49-52)

- la inducción de la mitosis de linfocitos de sangre periférica y de diferentes órganos linfoides. Esta actividad ha sido aplicada en el campo clínico en el estudio de la constitución cromosomal de las células y la detección de anomalías cromosómicas, y en el campo de la Inmunología en el desarrollo de técnicas de cultivo y proliferación de células linfoides (44, 53)
- la capacidad de agregar inmunoglobulinas, por la unión de los residuos de azúcares que las constituyen (54)
- inhibir la fagocitosis por macrófagos (55)
- activar la vía alterna del complemento (56)
- inducir la liberación de histamina de los basófilos y células cebadas (57)
- inducir la producción de interferón-gamma (IFN- γ), IL-1, IL-2, IL-3, IL-5 e IL-6 por linfocitos (58)

Entre sus actividades *in vivo*, se encuentran:

- suprimir la respuesta inmune humoral y celular en animales de laboratorio, al ser administradas subcutánea o intraperitonealmente (59)
- administradas por vía nasal, pueden ocasionar reacciones que varían desde rinitis severa con estornudos, rinorrea y sinusitis durante todo el día hasta un suave pero notable incremento de secreción de moco durante aproximadamente 1 hora (60)
- algunas lectinas tienen la propiedad de resistir la degradación proteolítica durante su paso a través del tracto gastrointestinal (61-65)
- administradas por vía oral, las lectinas pueden ocasionar una gran variedad de efectos patológicos a nivel gastrointestinal todos ellos debido, en gran parte, a su

capacidad de unirse a las células absortivas del intestino (54, 65)

4. LECTINA DE FRIJOL COMUN.

La lectina de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) se denomina fitohemaglutinina (PHA). Es una glicoproteína con un peso molecular aproximado de 128 Kd, contiene un 8.9% de residuos de azúcares constituidos principalmente por N-acetil-D-galactosamina (42, 48).

La PHA posee actividades hemaglutinante, leucoaglutinante y mitogénica. La PHA es una proteína oligomérica compuesta por 4 subunidades de tamaño similar, cuyo peso molecular es aproximadamente de 32 Kd, unidas por enlaces no covalentes. La componen dos subunidades básicas: una llamada R y otra L, las cuales varían ligeramente en su secuencia de aminoácidos y en su afinidad por eritrocitos o linfocitos (42, 48).

La subunidad R posee un sitio de unión con una alta afinidad por los determinantes glicoproteicos presentes en la membrana de los eritrocitos, mientras que la subunidad L posee un sitio de unión que reacciona fuertemente con las glicoproteínas de la membrana de los linfocitos. La combinación de las dos subunidades básicas (R y L) da como resultado 5 formas híbridas de la PHA (figura 6).

El híbrido compuesto de 4 subunidades L tiene potente actividad leucoaglutinante y se designa como L-PHA. Los híbridos compuestos por dos o más subunidades R (2R2L, 3R1L y 4R) exhiben potente actividad hemaglutinante y escasa o nula actividad leucoaglutinante y se designan como H-PHA o E-PHA.

El híbrido 1R3L exhibe poca actividad leucoaglutinante y nula actividad hemaglutinante posiblemente debido a que es monovalente en su interacción con eritrocitos.

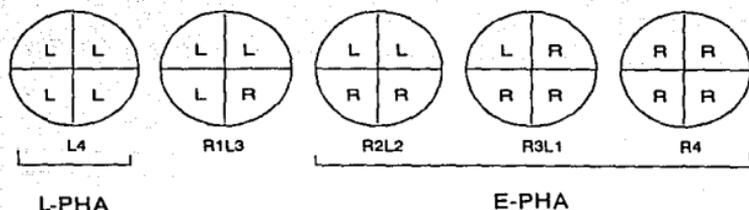


Figura 6. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA ESTRUCTURA TETRAMERICA DE LOS 5 HIBRIDOS DE LA FITOHEMAGLUTININA.

Cada uno de los 5 híbridos de la PHA poseen propiedades biológicas y químicas particulares (66, 67): la molécula 4L (L-PHA) presenta cargas negativas que le confieren una movilidad electroforética hacia el ánodo, mientras que la molécula más catódica de los híbridos H-PHA es la compuesta por 4 unidades R (4R). Las otras moléculas de lectina (3R1L, 2R2L y 1R3L) se distinguen por su creciente movilidad electroforética hacia el ánodo proporcional al aumento en el número de unidades L en la molécula.

Mediante la adsorción con eritrocitos humanos de cada uno de éstos híbridos, se demostró que la subunidad R es la responsable de la reacción de hemaglutinación y que la actividad mitogénica mostrada después de la adsorción de la molécula de PHA cruda, es debida al híbrido 4L o L-PHA.

Esto confirma que las actividades hemaglutinante y mitogénica observadas en preparaciones "crudas" obtenidas de las semillas de *Phaseolus vulgaris*, se localizan en diferentes subunidades de la molécula y su modo de acción es independiente uno respecto al otro (67-69).

La actividad hemaglutinante de los extractos crudos obtenidos de las semillas del género *Phaseolus*, se ha estudiado en más de 500 especies de plantas (70), debido a su diferente actividad sobre eritrocitos humanos y de diferentes especies animales.

Jaffé (42), clasificó a las lectinas del género *Phaseolus* en tres grupos, con base en su capacidad de aglutinar glóbulos rojos:

- Grupo I.- Está representado por las lectinas del frijol común *Phaseolus vulgaris*, en el cual se incluyen a lectinas inespecíficas que actúan sobre prácticamente todos los tipos de sangre animal y sobre todos los grupos sanguíneos humanos. Estas lectinas no son inhibidas por la adición de azúcares sencillos en el rango convencional de concentración. Estas lectinas también se denominan PANAGLUTININAS.

- Grupo II.- Está representado por las lectinas de *Phaseolus lunatus*, el cual contiene lectinas específicas de grupo sanguíneo, caracterizadas por una alta afinidad por el subgrupo sanguíneo A₁ humano.

- Grupo III.- Representado por aquellas lectinas del género *Phaseolus* que no muestran actividad hemaglutinante alguna, usando los métodos de extracción y hemaglutinación convencionales y su presencia se detecta por otros métodos diferentes a los empleados comúnmente.

Las lectinas del grupo de las Panaglutininas, se pueden clasificar de acuerdo con su capacidad de aglutinar glóbulos rojos de conejo y de vaca, estos últimos, previamente tratados con tripsina (42, 62).

Las lectinas que aglutinan ambos tipos de eritrocitos, se clasifican dentro del grupo A, las que solo reaccionan con eritrocitos de conejo corresponden al grupo B, mientras que los que solo reaccionan con eritrocitos de vaca tripsinizados corresponden al grupo C, por último, las lectinas que no reaccionan con ninguno de los dos tipos de eritrocitos, corresponden al grupo D.

Cuando los extractos de los diferentes tipos de frijol fueron probados por inyección en ratones o por alimentación de ratas con estas semillas se estableció que solo los frijoles de los grupos A y C fueron los más tóxicos mientras que aquellas variedades que aglutinaron solo sangre de conejo fueron las de menor toxicidad (62). Estos resultados enfatizan la importancia de determinar la actividad hemaglutinante de semillas contra eritrocitos de diferentes especies, antes de concluir que un frijol particular es tóxico. El uso de eritrocitos de vaca tripsinizados ofrece una importante herramienta para la detección *in vitro*, de variedades tóxicas de frijol.

4.1 Toxicidad de la PHA.

Existen algunos reportes en la literatura concernientes a los efectos tóxicos que acompañan a la ingestión de semillas crudas de *Phaseolus vulgaris*.

Se ha observado que la incorporación de semillas crudas de frijol a dietas para animales de experimentación, causa pérdida de peso y muerte de los animales; sin embargo cuando se utilizan las semillas cocidas, este efecto ya no se observa (42).

Luning y Bartels (1926) fueron probablemente los primeros en relacionar la acción tóxica de frijoles con el contenido de lectina.

Jaffé (1949), por otra parte, observó la acción tóxica de frijoles crudos y demostró que ésta no puede ser explicada por mala digestibilidad o por la presencia de inhibidores de tripsina, debido a que la incorporación de caseína digerida enzimáticamente en la dieta tóxica no mejora el estado de los animales de experimentación. Nuevos experimentos por Jaffé (1960) y Honovar (1962) establecieron que las lectinas son las responsables más probables de esta toxicidad. Ambos grupos de investigadores encontraron que cuando las lectinas aisladas del frijol fueron

incorporadas a las dietas de ratas a niveles tan bajos como 0.5%, se observó un retardo en el crecimiento.

Los síntomas de toxicidad que se presentan en animales y seres humanos cuando ingieren semillas crudas (o mal cocidas) de diferentes leguminosas, depende de la resistencia de las lectinas a la hidrólisis por las secreciones del tracto digestivo.

Se ha demostrado que la PHA es resistente a la degradación proteolítica durante su paso a través del tracto gastrointestinal ya que se ha recuperado intacta en las heces de ratas que han sido alimentadas con semillas crudas de frijol o con la PHA purificada (64).

En el hombre, las manifestaciones más obvias de toxicidad debido al consumo de frijol crudo o mal cocido son náusea, vómito y diarrea (71).

En animales de laboratorio la inclusión de frijol crudo o sus harinas en la dieta ocasiona pérdida de peso, deterioro en el crecimiento, diarrea y en ocasiones la muerte (72).

Asimismo, se ha comprobado que la administración de frijol crudo o de lectinas a ratas ocasiona múltiples cambios morfológicos a nivel de las células absortivas intestinales, como lo demuestra la extensa destrucción de microvellosidades, la fragmentación y vesiculación del contorno del retículo endoplásmico y el incremento en estructuras parecidas a lisosomas (73).

Del mismo modo se observa una disminución en la actividad de algunas enzimas intestinales como maltasa, sacarasa, lactasa y fosfatasa alcalina (64,74).

La absorción de algunos nutrimentos tales como la glucosa, los lípidos (triglicéridos y ácidos grasos), nitrógeno (proteico y no proteico) y la vitamina B₁₂, también se ve disminuída (64, 75).

Se ha propuesto que todas éstas alteraciones morfológicas y metabólicas anteriormente enlistadas son debidas únicamente a la propiedad que tienen las lectinas de unirse a la superficie luminal de las células intestinales, ocasionando una interferencia inespecífica en la absorción de nutrimentos.

La inclusión de frijol crudo o de lectina en la dieta de ratas puede ocasionar una disminución en la absorción de nitrógeno proteico, aumento en el catabolismo tisular y por lo tanto un aumento en la excreción de nitrógeno en heces y en orina, lo cual genera un balance negativo de nitrógeno en los animales.

La PHA también ocasiona un aumento en la colonización bacteriana y protozoaria sobre la superficie mucosa del intestino delgado en ratas. Este cambio posiblemente es debido a que la PHA sirve como una "adhesina", facilitando la adherencia bacteriana o a la alteración de la superficie de las microvellosidades debida a la unión de la lectina lo que permite acceso de bacterias a superficies mucosas desprotegidas (76, 77).

También, aparecen cambios significativos en el peso de algunos órganos internos cuando se incorpora frijol crudo o lectinas en dietas para ratas. Se observa una disminución de peso en el timo y en el bazo mientras que el páncreas, los riñones y el intestino delgado aumentan de peso. En el intestino delgado se observa además, un aumento en su longitud (78).

La composición tisular del intestino delgado también es afectada: el contenido de proteína aumenta sugiriendo un incremento en secreción de glicoproteínas (mucina). El contenido de DNA incrementa, indicando también hiperplasia mucosa (78, 79).

Además se observan cambios en contenido de minerales en suero y en orina probablemente como un resultado de disturbios en el metabolismo general (78).

La destrucción de lectinas (y de otros factores tóxicos presentes en el frijol) generalmente se lleva a cabo por los métodos tradicionales de cocción. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, no siempre es posible llevar a cabo la destrucción completa de estos factores. Por ejemplo, una reducción del punto de ebullición del agua en regiones montañosas, puede resultar en la eliminación incompleta de toxicidad.

La resistencia de lectinas a inactivación por calor seco merece especial énfasis, ya que se ha reportado que la cocción con calor seco (horneado) no destruye completamente la actividad hemaglutinante de la lectina (54, 80).

En la mayoría de los casos, cuando el calentamiento produce un efecto positivo sobre la toxicidad de las lectinas, parece haber poca diferencia si las leguminosas son cocidas en agua, o tostadas. Sin embargo, las semillas de *Phaseolus vulgaris* son una de las excepciones ya que al parecer requiere remojo preliminar antes del cocimiento para eliminar completamente la toxicidad del frijol crudo (43, 80).

Comparando diferentes tipos de remojo, que incluían agua destilada, ácido acético al 0.1% y bicarbonato de sodio al 0.1%, antes del cocimiento de diferentes variedades de frijol, Jaffé y Flores reportaron que ninguno proporciona una mayor eliminación de la toxicidad de las lectinas comparado con los otros. (42, 62).

Asimismo observaron que las lectinas de frijol más tóxicas son a la vez las más resistentes al calor; después de 30 minutos de cocción ellas no son completamente destruidas (42).

No existen reportes que describan cuales son las mejores condiciones para lograr una total, o por lo menos, una apreciable reducción de la actividad de las lectinas. En general, el grado de destrucción de las lectinas efectuado por tratamiento térmico depende de la temperatura, tiempo de cocción, y de la toxicidad de la lectina.

II. JUSTIFICACION

El consumo del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es muy elevado tanto en México como en otros países en desarrollo, ya que constituye una fuente importante de proteína y de energía para gran parte de la población. Sin embargo, se sabe que contiene una gran variedad de sustancias consideradas como "antinutricionales".

Esto ha conducido a realizar múltiples investigaciones de tipo químico, biológico, toxicológico y nutricional para eliminar parcial o completamente éstas sustancias y así mejorar la calidad nutricional del frijol.

Como se mencionó en los antecedentes, los tratamientos térmicos empleados en la cocción de las semillas de frijol, generalmente mejora su digestibilidad y constituye el principal mecanismo para destruir a estos factores antinutricionales. Sin embargo, una disminución en el punto de ebullición del agua, el remojo previo de las semillas y la utilización de recipientes de barro, entre otros factores, pueden interferir en la inactivación de dichos factores.

Desde el punto de vista de la nutrición, el principal factor antinutricional lo representa la lectina (PHA) debido a su resistencia a los tratamientos térmicos y a que posee una gran cantidad de actividades biológicas tanto *in vitro* como *in vivo*.

A pesar del conocimiento de la actividad mitogénica que posee la PHA *in vitro* así como de las múltiples alteraciones que ocasiona a nivel del tracto gastrointestinal, son muy escasos los estudios respecto a la interacción que "normalmente" ocurre entre esta lectina, cuando se ingiere en la dieta, y la respuesta inmune. Además, la posibilidad de que la molécula intacta de la PHA pueda generar una respuesta inmune, es muy elevada, ya que también

resiste a las diferentes secreciones digestivas del tracto gastrointestinal.

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, aunque siempre se hace de manera conjunta con una proteína que se utiliza como referencia (la albúmina de huevo o la caseína de la leche). Sin embargo, esto representa una situación artificial ya que ninguna dieta está compuesta por un solo tipo de proteína, sino que está constituida por la mezcla de proteínas, tanto de origen vegetal como de origen animal.

La administración por vía oral de la lectina 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. Este estudio podría ayudar a comprender mejor el efecto que ejercen algunas proteínas de origen dietario (en particular, la PHA) sobre el sistema inmune de los mamíferos (incluyendo al hombre).

III. OBJETIVOS

- General:

Determinar los efectos que produce la fitohemaglutinina (PHA) en la morfología y en la respuesta inmune en ratas alimentadas con extractos salinos de una variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

- Particulares:

- 1.- Determinar el efecto de la PHA sobre el estado general en ratas alimentadas con extracto salino de frijol.
- 2.- Detectar la posible presencia de anticuerpos específicos contra la lectina, y su cinética de aparición en el suero de ratas alimentadas con extracto salino crudo de frijol.
- 3.- Determinar los posibles cambios morfológicos en el intestino de ratas alimentadas con extracto salino crudo de la variedad de frijol seleccionada.
- 4.- Determinar la localización histológica de la lectina a lo largo del intestino delgado.
- 5.- Determinar el efecto de un tratamiento térmico (cocción en autoclave, 121°C, 15 lb/in², 30 minutos) sobre éstas actividades de la lectina.

IV. MATERIALES Y METODOS

1. SELECCION DE LAS SEMILLAS DE FRIJOL.

Se seleccionó la variedad de frijol Bayo (*Phaseolus vulgaris*, L., variedad Bayo) por ser una de las de mayor consumo en México.

2. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE FRIJOL.

La obtención del extracto salino crudo de frijol se realizó de acuerdo al método de Felsted (81) el cual consiste en extraer los componentes solubles de 100 gramos de semilla finamente molida con 500 ml de amortiguador de fosfatos salinos (PBS, 0.1 M, pH=7.4) por agitación magnética a 4°C durante 18-24 horas. La suspensión resultante se filtró a través de una malla de gasa para eliminar las partículas grandes y se centrifugó a 16,000 rpm durante 2 horas con el fin de que sedimentaran las partículas insolubles. El sobrenadante se recuperó a través de gasa para eliminar la fina capa de partículas insolubles que se forma en la superficie.

Al extracto salino obtenido se le agregó Timerosal (Grado reactivo, SIGMA de México, S.A.) a una concentración de 0.1% para evitar contaminación bacteriana y se conservó en congelación (-4°C) hasta su utilización. Debido a que hasta este punto, no se aplicó ningún tratamiento térmico, éste fue el extracto salino crudo del frijol Bayo.

El extracto salino cocido del frijol Bayo, se obtuvo sometiendo una parte del extracto salino crudo a cocción en autoclave a 121°C, 15 lb/in² durante 30 minutos. La cocción se realizó de esta forma ya que en "olla express", que es actualmente el método de cocción casero más común, es difícil tener control sobre la temperatura y sobre la presión. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 4,000 rpm durante 30 minutos para eliminar la proteína coagulada por el calentamiento. El sobrenadante se

recuperó en frascos viales estériles y se guardó en congelación (-4°C).

La concentración total de proteínas en cada uno de los extractos salinos, se determinó por el método de Lowry (82) (ANEXO 1). La concentración de proteína en ambos extractos se ajustó a 5 mg/ml.

3. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE FRIJOL.

La actividad hemaglutinante de los extractos salinos crudo y cocido, se determinó usando eritrocitos de conejo, de vaca y de humano (grupos A, B y O).

3.1 Suspensión de eritrocitos.

La sangre de conejo, de vaca y de humano de los grupos sanguíneos A, B y O, se obtuvo utilizando 10 U/ml de heparina (HEPAR th, 20 th Century Chemical de México) como anticoagulante.

Los eritrocitos de cada especie se lavaron 3 veces con solución salina isotónica (SSI, NaCl 0.89%) y se prepararon suspensiones al 4% de cada uno en SSI.

Una porción del paquete de eritrocitos de vaca fue tratado con tripsina como se describe a continuación.

3.2 Tratamiento de eritrocitos de vaca con tripsina.

La sensibilización de los eritrocitos de vaca se realizó de acuerdo al método descrito por Jaffé y Brücher (62): a 10 ml de una suspensión de eritrocitos al 10 % se agregó 0.1 ml de una solución de tripsina al 0.1 % (Tripsina de pancreas bovino, cristalizada, Tipo I, SIGMA Chem. Co.) y se dejó por 30 minutos a 37°C con agitación suave y continua. Los eritrocitos se lavaron 3 veces con

SSI y se ajustó su concentración al 4% para las pruebas de hemaglutinación.

3.3 Prueba de hemaglutinación.

La actividad hemaglutinante de los extractos salinos "crudo" y "cocido" de frijol, se determinó de acuerdo al método de Calderón y Córdoba (59), utilizando placas de microtitulación de poliestireno de 96 pozos con fondo en "U" (Dynatech Immulon, U.S.A.) de la siguiente manera: se colocaron 100 μ l de cada extracto salino en los pozos de la primera columna vertical de la placa usando una pipeta automática multicanal (Organon Teknika) y se diluyó en forma seriada con 50 μ l de SSI. Se añadieron 10 μ l de la suspensión de eritrocitos al 4% de cada especie y se dejó reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente.

Una reacción positiva de aglutinación se identificó por la formación de una capa uniforme de eritrocitos en el fondo de los pozos. Una reacción negativa se identificó por la formación de un "botón" de eritrocitos sedimentados en el fondo de los pozos.

El título de hemaglutinación se definió como la máxima dilución del extracto salino que todavía era capaz de producir aglutinación visible de los eritrocitos, después de 30 minutos a temperatura ambiente.

4. INHIBICION DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE POR ADICION DE AZUCARES SENCILLOS.

Se seleccionaron diferentes azúcares sencillos para determinar la inhibición de la actividad hemaglutinante. Los azúcares seleccionados fueron: Fucosa, Manosa, Xilosa, Galactosa, Lactosa y N-acetil-D-glucosamina ya que cada uno de estos azúcares forman parte del modelo propuesto del oligosacárido específico para la fitohemaglutinina (PHA) (47) (figura 7).

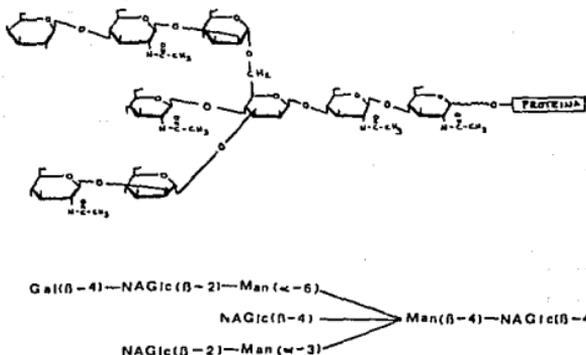


Figura 7. MODELO DEL RECEPTOR PARA LA PHA.
(De Lis & Sharon (47)).

Se prepararon soluciones al 1% en SSI de cada uno de los diferentes azúcares seleccionados. Con estas soluciones se prepararon suspensiones al 4% de cada uno de los eritrocitos (de conejo, de vaca y de humano) en cada una de estas soluciones.

La prueba de inhibición de la hemaglutinación se realizó de la misma forma que la prueba de hemaglutinación anteriormente descrita. Se colocaron 100 μl de cada extracto salino en los pozos de la primera columna de la placa de microtitulación, se diluyó en forma seriada con 50 μl de SSI. Se añadieron 10 μl de las suspensiones de eritrocitos al 4%. Los resultados se observaron después de 30 minutos a temperatura ambiente, haciendo las mismas consideraciones anteriormente descritas.

5. ENSAYOS BIOLÓGICOS.

Se obtuvo un lote de 46 ratas hembra Wistar-Lewis de 2-3 meses de edad con un peso aproximado de 250 gramos, en el bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición las cuales se colocaron en jaulas individuales de acero inoxidable, en un cuarto a temperatura constante, con periodos de luz-oscuridad de 12 horas.

Las ratas fueron alimentadas con la dieta habitual del bioterio (alimento para roedores marca "Purina") y agua destilada "ad libitum".

Las ratas se repartieron al azar en los siguientes grupos:

- Grupo I: 10 ratas a las cuales se les administró 1 ml de PBS durante 14 días (GRUPO TESTIGO)
- Grupo II: 15 ratas a las cuales se les administró 1 ml del extracto salino crudo de frijol (5 ratas durante 3 días, otras 5 durante 7 días y 5 ratas durante 14 días).
- Grupo III: 15 ratas a las cuales se les administró 1 ml del extracto salino cocido de frijol (5 ratas durante 3 días, otras 5 durante 7 días y 5 ratas durante 14 días).

La administración de los extractos (crudo y cocido) y del PBS se realizó por intubación gástrica sin anestesia, entre las 8:00 y las 10:00 horas todos los días (ANEXO 2) (83) durante el tiempo apropiado.

Diariamente se registró el peso de cada una de las ratas, antes de la administración del extracto o del PBS.

Dos grupos adicionales de 3 ratas cada uno se utilizaron para determinar la localización de la unión de la lectina a lo largo del intestino 2 horas y 1 día después de una sola administración. En estas ratas no se estudiaron los demás efectos de la lectina debido a la corta duración de la exposición.

Una vez completado el esquema de administración de los extractos salinos de frijol, se obtuvo una muestra de sangre (3 a 5 ml) por punción cardiaca (83) (ANEXO 3), previa anestesia con éter. Posteriormente las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical y se extrajo el intestino delgado en condiciones asépticas.

Se separó el suero de la sangre y éste se almacenó en congelación para la determinación de proteínas totales, albúmina y anticuerpos anti-PHA.

La concentración de proteínas totales en el suero de las ratas se determinó por la técnica de Biuret (84) (ANEXO 4) y la determinación de albúmina se realizó por el método de enlace a colorantes (verde de bromocresol) (85) (ANEXO 5).

6. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PHA, EN EL SUERO DE LAS RATAS.

La detección de anticuerpos IgG e IgM anti-PHA en el suero de las ratas se realizó mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA indirecto).

El método indirecto de ELISA es un sistema usado para la detección y medición de anticuerpos (ver diagrama ANEXO 6) (86). La preparación de todos los reactivos se describe en el ANEXO 7.

Las placas se sensibilizaron con 100 μ l de una solución de PHA (10 μ g/ml) en amortiguador de recubrimiento (carbonato-bicarbonato, 0.1M, pH=9.6) y se incubaron a 4°C durante 18-24 horas con el objeto de adsorber la PHA a la fase sólida. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween dejando reaccionar 3 minutos en cada lavado y se secaron sacudiéndolas sobre una gasa.

Se añadieron 100 μ l de la solución de carbonatos-ASB sin r-globulinas al 0.2% en cada pozo y las placas se incubaron durante

1 hora a 37°C con el fin de bloquear los sitios libres donde no se adsorbió la PHA. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween, en la forma descrita anteriormente.

Se colocaron 100 µl de los sueros diluidos 1:5 en PBS-Tween y se incubaron a 37°C durante 1 hora. En esta etapa, todo anticuerpo específico anti-PHA presente en el suero de las ratas se une a la PHA. Completado el tiempo de incubación, las placas se lavaron nuevamente 3 veces con PBS-Tween.

En seguida, se les adicionó 100 µl del conjugado correspondiente, anti-IgG de rata conjugado con peroxidasa, preparado en cabra (Peroxidase labeled. Affinity purified antibody to rat IgG (τ) goat) o anti-IgM de rata conjugado con peroxidasa, preparado en cabra (Peroxidase labeled. Affinity purified antibody to rat IgM (μ) goat) diluidos 1:40,000 en PBS-Tween. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora y se lavaron 3 veces con PBS-Tween.

Finalmente, se adicionaron 100 µl de la solución sustrato OPD en amortiguador citrato-fosfato y se dejó reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. La reacción se detuvo adicionando 50 µl de una solución de H₂SO₄ 2.5 M y se leyó la absorbencia a 492 nm utilizando un lector de placas de ELISA MR 600 (Dynatech Laboratories, Inc.).

7. MORFOLOGIA INTESTINAL Y LOCALIZACION DE LA PHA EN EL INTESTINO.

La observación de la morfología intestinal se realizó a través de una tinción con hematoxilina-eosina y la localización de la PHA en el intestino delgado se realizó mediante una técnica de tinción inmunohistoquímica.

La preparación de todos los reactivos se describe en el ANEXO 8.

7.1 Método.

Una vez completado el esquema de administración del extracto salino, las ratas anestesiadas fueron sacrificadas por dislocación cervical. El intestino delgado se extrajo y se lavó inyectando suavemente PBS (0.1M, pH=7.4) para eliminar restos de alimento.

Con el objeto de observar la morfología intestinal y detectar el patrón de unión de la lectina a lo largo del intestino delgado se obtuvieron muestras de las regiones proximal (duodeno), medial (yeyuno) y distal (íleon) del intestino.

El duodeno se obtuvo de los primeros 3 cm después del píloro, el yeyuno se obtuvo aproximadamente a la mitad de la longitud total del intestino y el íleon de los últimos 3 cm antes del ciego.

De cada uno de estos segmentos se cortaron trozos de tejido de 1 a 1.5 cm de largo e inmediatamente se fijaron en formol al 10% en PBS. Posteriormente fueron deshidratados, clarificados e incluidos en bloques de parafina (ANEXO 9) (87, 88).

Se realizaron series de cortes transversales de 7 μ de grosor (Microtomo marca American Optical). Una sección seriada de los cortes fue teñida por hematoxilina-eosina para ver la morfología intestinal y otra sección fue teñida por inmunoperoxidasa para detectar la presencia de lectina unida al intestino.

7.2 Observación morfológica por tinción con hematoxilina eosina.

Los cortes de tejido se desparafinizaron a través de dos baños en xilol durante 5 minutos cada uno y se transfirieron a soluciones de etanol, en orden decreciente de concentración, es decir, de 100%, 96%, 80% y 70% (5 minutos en cada uno) después de lo cual se enjuagaron con agua destilada.

Se agregó el colorante de hematoxilina y se dejó reaccionar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se enjuagaron con agua corriente hasta que viró el color de naranja-rojizo a azul-violeta. Se agregó el segundo colorante, eosina, dejando reaccionar 5 minutos a temperatura ambiente y se transfirieron rápidamente (menos de 1 minuto en cada uno) a recipientes de etanol en orden creciente de concentración de 80%, 96% y 100%. Finalmente, se transfirieron a xilol dejándolos 10 minutos y se sellaron con un cubreobjetos utilizando resina sintética como conservador.

7.3 Tinción de Inmunoperoxidasa.

Los cortes de tejido se desparafinizaron en xilol durante 10 minutos y se transfirieron a un recipiente con Metanol-H₂O₂ al 30% donde se dejaron durante 45 minutos para inactivar la peroxidasa endógena del tejido.

Los cortes de tejido se transfirieron a un recipiente con acetona, se dejaron durante 5 minutos y se enjuagaron con PBS durante 5 minutos con agitación suave.

Se agregó el primer anticuerpo, anti-PHA desarrollado en conejo 1:1000 en PBS (Anti-Phaseolus vulgaris lectin. Antibody developed in rabbit, Sigma Chemical Company), y se incubó a 37°C durante 45 minutos. Se lavó en PBS con agitación suave durante 10 minutos y se agregó el segundo anticuerpo; anti-IgG de conejo desarrollado en cabra conjugado con peroxidasa 1:1000 en PBS (Peroxidase labeled. Affinity purified antibody to rabbit IgG (H+L) goat, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (kpl)), y se incubó durante 45 minutos a 37°C. Se lavó con PBS durante 10 minutos y se agregó la solución sustrato-revelador (3,3'-diaminobenzidina y H₂O₂ en Tris-HCl). La reacción ocurrió durante 20 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz. Se lavó con PBS durante 10 minutos con agitación suave y se enjuagó con agua destilada.

Se hizo una tinción de contraste agregando hematoxilina diluida (4 gotas en 2 ml de agua destilada) y se dejó reaccionar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de colorante con agua corriente hasta observar vire de color de naranja-rojizo a azul-violeta.

Los cortes se transfirieron a baños rápidos de etanol (menos de 1 minuto en cada uno) en orden creciente de concentración, es decir, de 70%, 80%, 96% y 100%, y finalmente a xilol, donde se dejaron 10 minutos. Los cortes se sellaron con cubreobjetos utilizando resina sintética como conservador.

Una sección seriada fue teñida en la ausencia del primer anticuerpo, la cual sirvió como control.

7.4 Observaciones de los cortes teñidos por inmunoperoxidasa.

Las observaciones que se realizaron en los cortes teñidos por inmunoperoxidasa para determinar el patrón de unión de la lectina en el intestino delgado fueron el sitio, la distribución y la intensidad de la tinción.

- a) Sitio: comprendió la región del intestino delgado donde se unió la lectina, es decir, el duodeno, el yeyuno y/o el ileon.
- b) Distribución: patrón de unión de la lectina en el intestino, es decir, si comprendía a la(s) vellosidad(es) intestinal (es) completa(s) incluyendo la región de la cripta, la mitad superior o inferior de la vellosidad, el epitelio y/o la lámina propia de la vellosidad, etc.
- c) Intensidad: cantidad de lectina unida al intestino de acuerdo a la siguiente escala: fuerte (+++), moderada (++), débil (+) y ausente (-).

8. ANALISIS ESTADISTICO.

Todos los resultados fueron expresados como el promedio \pm desviación estandar (D.E.) y se analizaron con la prueba t de Student para grupos independientes comparando el grupo de extracto cocido con el grupo testigo y, el grupo extracto crudo con el grupo extracto cocido.

Solo en el caso de la variación de peso, los resultados se analizaron por la prueba t de Student para grupos pareados comparando el peso inicial con el peso final para cada grupo de ratas.

Para determinar si había diferencia significativa entre los pesos de los grupos al inicio del estudio, se compararon los pesos iniciales de cada grupo con el grupo testigo y, el grupo extracto crudo con el grupo extracto cocido por medio de la prueba t de Student para grupos independientes.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

1. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS SALINOS DE FRIJOL.

Los resultados de la actividad hemaglutinante de los extractos salinos crudo y cocido del frijol Bayo sobre eritrocitos de conejo, de vaca y de humano de diferente grupo sanguíneo, se muestran en el cuadro 1.

CUADRO 1

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE EXTRACTOS SALINOS DE FRIJOL BAYO

| EXTRACTO | E R I T R O C I T O S | | | |
|----------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------|
| | HUMANOS (A, B Y O) | CONEJO | VACA TRIPSINIZADOS | VACA SIN TRIPSINIZAR |
| CRUDO | * 1:512 ** (9.5) | 1:2048 (2.125) | 1:2048 (2.125) | NEGATIVO |
| COCIDO | 1:4 (1250) | 1:4 (1250) | 1:4 (1250) | NEGATIVO |

* Máxima dilución capaz de producir aglutinación macroscópica después de 30 minutos a temperatura ambiente.

** Cantidad de proteína ($\mu\text{g/ml}$) en la dilución señalada.

El extracto salino crudo de frijol Bayo aglutinó todos los eritrocitos probados con diferente potencia, y en el caso de los eritrocitos humanos, sin especificidad de grupo sanguíneo.

En el caso del extracto cocido de frijol Bayo, éste aglutinó los glóbulos rojos pero, a diferencia del extracto crudo, con menor potencia, ya que el título hemaglutinante fue de 1:4 con todos los eritrocitos probados, lo que significa una reducción de la actividad hemaglutinante de aproximadamente 600 veces. Con base en esto, se puede decir que el tratamiento térmico fue suficiente para reducir significativamente (casi 600 veces) la actividad

hemaglutinante de la lectina contenida en el extracto crudo del frijol Bayo, y que es necesario forzar las condiciones experimentales aumentando el tiempo de cocción a la misma temperatura si se quiere eliminar por completo la actividad hemaglutinante de la lectina.

Es importante destacar que ninguno de los extractos salinos reaccionaron con los eritrocitos de vaca que no fueron sensibilizados con tripsina. El tratamiento enzimático de los glóbulos rojos de vaca es necesario para la detección de la actividad hemaglutinante en extractos obtenidos de diferentes semillas de leguminosas (62).

De acuerdo a la clasificación hecha por Jaffé (42), de las lectinas de las semillas del género *Phaseolus*, respecto a su actividad hemaglutinante, la lectina presente en el extracto salino crudo del frijol Bayo pertenece al grupo de las Panaglutininas o lectinas inespecíficas, ya que mostró actividad hemaglutinante sobre todos los eritrocitos humanos de los diferentes grupos sanguíneos (A, B y O) y sobre los eritrocitos de conejo y de vaca.

Se ha demostrado que la capacidad de las lectinas de aglutinar eritrocitos de diferentes especies animales está correlacionada con su toxicidad. Con base en la clasificación de Jaffé y Brucher (62), respecto a la actividad hemaglutinante de las lectinas sobre glóbulos rojos de vaca sensibilizados con tripsina, se puede sugerir que el frijol Bayo crudo sería tóxico por su administración oral a ratas e intraperitoneal en ratones.

Estos resultados concuerdan con otros obtenidos previamente (69) de la caracterización de las lectinas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) de las variedades mexicanas Bayo y Negro.

Es importante hacer notar que muchos investigadores someten a remojo previo las semillas cuya actividad hemaglutinante va a ser

estudiada (42, 62), ya que al parecer el remojo permite una transferencia de calor más homogénea entre la superficie y el interior de la semilla, aumentando la inactivación de las propiedades hemaglutinantes de las lectinas, además de disminuir el tiempo necesario para su cocción.

Las semillas estudiadas no fueron sometidas a remojo previo a la extracción de sus componentes solubles, sin embargo, esto no influye en estos resultados ya que se trabajó con el extracto salino de las semillas y no con las semillas directamente.

2. INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION POR LA ADICION DE AZUCARES.

En el cuadro 2 se muestran los resultados de la inhibición de la actividad hemaglutinante por la adición de azúcares sencillos.

La actividad hemaglutinante del extracto salino crudo obtenido de las semillas de frijol Bayo, no fue inhibida por ninguno de los azúcares sencillos que se probaron: fucosa, manosa, xilosa, galactosa, lactosa y N-acetil-D-glucosamina.

En cada caso el título hemaglutinante fue idéntico al control (sin azúcar), el cual fue de 1:256 para eritrocitos humanos de los tres grupos sanguíneos A, B y O y de 1:2048 para eritrocitos de conejo y de vaca tripsinizados.

Los estudios previos (44, 48) reportaron que el azúcar específico de la PHA era el monosacárido N-acetil-D-glucosamina. Sin embargo, actualmente se ha demostrado que es un oligosacárido tri- o tetra-antenario que contiene unidades de N-acetil-D-glucosamina (figura 7) (47). Esta misma estructura tri- o tetra-antenaria del azúcar específico de la PHA se ha reportado también para otras lectinas como la de *Ricinus communis* (RCA) y la de *Erythrina cristagalli* (ECA) (46, 89).

CUADRO 2
INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION POR LA ADICION DE DIFERENTES
AZUCARES*

| A Z U C A R** | E R I T R O C I T O S | | |
|----------------------------|-----------------------|--------|-----------------------|
| | HUMANOS (A, B y O) | CONEJO | VACA TRIPSINIZADOS |
| NINGUNO | 1:256 | 1:2048 | 1:2048 |
| FUCOSA | 1:256 | 1:2048 | 1:2048 |
| MANOSA | 1:256 | 1:2048 | 1:2048 |
| XILOSA | 1:256 | 1:2048 | 1:2048 |
| GALACTOSA | 1:256 | 1:2048 | 1:2048 |
| LACTOSA | 1:256 | 1:2048 | 1:2048 |
| N-ACETIL-D- GLUCOSAMINA | 1:256 | 1:2048 | 1:2048 |

* Se reporta la máxima dilución capaz de producir aglutinación macroscópica después de 30 minutos a temperatura ambiente.

** La concentración del azúcar en cada pozo fue de 100 µg.

Los resultados obtenidos en este estudio, indican que la adición individual de los diferentes azúcares que forman parte del oligosacárido específico para la PHA, no inhibe la reacción de hemaglutinación y que es necesaria la forma compleja del azúcar para bloquear completamente el sitio de acción de la PHA.

Asimismo, las actividades hemaglutinante y mitogénica y el método de purificación de la PHA a partir de extractos salinos de frijol (81), demuestran que éste oligosacárido está presente en la membrana de los glóbulos rojos, de los glóbulos blancos y en la tiroglobulina de diferentes especies animales.

3. EFECTO DE LA LECTINA SOBRE EL ESTADO GENERAL DE LAS RATAS.

El efecto de la administración intragástrica de la lectina sobre el estado general de las ratas se determinó, con la ganancia o pérdida de peso diario y con la determinación de la concentración en suero de las proteínas totales y de la albúmina.

En el cuadro 3 se muestra el cambio de peso promedio de las ratas en cada grupo, durante el tiempo de administración de los extractos crudo y cocido del frijol Bayo, y de las ratas que recibieron PBS.

Los pesos promedio de cada grupo al inicio del estudio fueron similares. Las ratas a las cuales se les administró PBS por intubación gástrica (grupo testigo) aumentaron 1.59 g/día a lo largo del estudio. En cambio, el grupo de ratas que recibió extracto cocido y el que recibió el extracto crudo del frijol Bayo, perdieron peso a lo largo del estudio y ésta pérdida fue dependiente del tiempo de administración.

Los estudios previos (64, 74, 90) han demostrado que la incorporación de semillas crudas de leguminosas en dietas para ratas ocasiona la pérdida de peso en estos animales, en cambio cuando se incorporan semillas cocidas no se observa éste efecto.

Dos posibles causas pueden explicar por qué en el presente estudio el grupo de ratas que recibieron el extracto cocido del frijol Bayo perdieron peso, casi en la misma magnitud que el grupo que recibió el extracto crudo.

La primera es que las ratas hayan quedado muy lastimadas después de la administración intragástrica del extracto, lo cual hubiera provocado una disminución en el consumo del alimento.

CUADRO 3

VARIACION DE PESO DE LAS RATAS ALIMENTADAS CON LOS EXTRACTOS
COCIDO Y CRUDO DEL FRIJOL BAYO ($\bar{x} \pm DE$).

| GRUPO | DIAS DE ADMINIS- TRACION | PESO INICIAL (g) | PESO FINAL (g) | CAMBIO DE PESO (g/día) |
|----------|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|
| TESTIGO | 14 | 243.1±18.9 | 265.4±25.6 ^a | +1.6±0.5 |
| EXTRACTO | 3 | 285.3±24.9 [*] | 278.7±24.6 ^b | -2.2±0.2 |
| | 7 | 265.3±45.8 [*] | 258.6±46.1 ^c | -0.9±0.2 |
| COCIDO | 14 | 258.9±50.9 [*] | 244.5±52.6 ^d | -1.0±0.1 |
| EXTRACTO | 3 | 280.8±10.5 [*] | 272.1±13.0 ^e | -2.9±1.1 |
| | 7 | 292.7±28.7 [*] | 279.0±26.0 ^f | -2.0±0.6 |
| CRUDO | 14 | 281.0±23.1 [*] | 255.2±23.5 ^g | -1.8±0.4 |

* no significativo (t-Student: ext. cocido vs testigo y ext. crudo vs ext. cocido). a, b, c, e y f: $p < 0.05$. d: $p < 0.01$. g: $p < 0.02$. (t-pareada).

La otra explicación es que la lectina no haya sido completamente destruida con el tratamiento térmico empleado para la cocción del extracto crudo del frijol Bayo.

Aunque la segunda hipótesis es más probable ya que está apoyada por los resultados obtenidos en la prueba de hemaglutinación, sería recomendable para estudios posteriores, ocupar grupos de ratas con alimentación pareada (pair-fed) para determinar si la pérdida de peso se debió a una disminución en el consumo de alimento o a los efectos generados por la lectina. El ensayo se realizaría de la siguiente forma: a un grupo de ratas se les administraría el extracto cocido del frijol Bayo y se registraría su consumo diario de alimento, y a otro grupo de ratas

no se les administraría el extracto cocido pero se les restringiría la cantidad de alimento de acuerdo al consumo del grupo anterior.

Algunos estudios previos (42, 62, 74, 90) han demostrado que la disminución de peso en los animales alimentados con lectinas purificadas o con dietas que contienen semillas crudas de leguminosas se debe, en gran parte, a la interferencia inespecífica con la absorción de nutrimentos ocasionada por la lectina al unirse a las células epiteliales del intestino, aunque no debe descartarse un efecto conjunto con el inhibidor de tripsina.

La disminución en la absorción de nutrimentos puede ser detectada indirectamente por métodos bioquímicos, tradicionalmente con la determinación de albúmina en suero.

El cuadro 4 muestra los valores séricos promedio de albúmina y de proteínas totales de cada grupo de ratas.

La concentración de proteínas totales y de albúmina en los sueros del grupo que recibió el extracto crudo y del grupo que recibió el extracto cocido del frijol Bayo, no muestran diferencia con respecto a los valores de las ratas del grupo testigo.

Probablemente, el corto período de experimentación fue un factor determinante por el cual no se encontraron diferencias en la concentración de las proteínas séricas, ya que el tiempo de vida media de la albúmina es de aproximadamente 3 semanas.

Con el fin de poder detectar algún cambio en la concentración de las proteínas séricas, sería recomendable en futuros experimentos, alargar el tiempo de exposición a la lectina o en su defecto, emplear otro indicador bioquímico cuya vida media sea menor, como por ejemplo prealbúmina o transferrina.

CUADRO 4

CONCENTRACION DE ALBUMINA Y DE PROTEINAS TOTALES EN EL SUERO DE LAS RATAS ALIMENTADAS CON LOS EXTRACTOS SALINOS DE FRIJOL BAYO

| GRUPO | n | DIAS DE ADMINIS- TRACION | PROTEINAS TOTALES (g/dl) | ALBUMINA (g/dl) | p* |
|----------|----|-----------------------------|--------------------------------|--------------------|----|
| TESTIGO | 10 | 14 | 8.57 ± 0.99 | 4.23 ± 0.55 | ns |
| EXTRACTO | 5 | 3 | 8.12 ± 0.81 | 3.88 ± 0.42 | ns |
| | 5 | 7 | 8.10 ± 1.19 | 3.89 ± 0.40 | ns |
| COCIDO | 5 | 14 | 8.64 ± 0.69 | 4.21 ± 0.26 | ns |
| EXTRACTO | 5 | 3 | 7.98 ± 0.50 | 3.92 ± 0.18 | ns |
| | 5 | 7 | 7.91 ± 0.54 | 4.26 ± 0.17 | ns |
| CRUDO | 5 | 14 | 8.16 ± 0.62 | 4.12 ± 0.27 | ns |

* t-Student. ns= no significativo.

4. ANTICUERPOS ANTI-PHA EN SUERO.

Los resultados obtenidos en la detección de anticuerpos anti-PHA de clase IgG e IgM en el suero de las ratas, se muestran en el cuadro 5.

Con el suero de las ratas del grupo testigo, se obtuvo el "fondo" del sistema para ambas clases de anticuerpos anti-PHA, IgG e IgM. Solo aquellos valores de absorbancia que fueron superiores al intervalo definido por el valor promedio de la absorbancia del suero de las ratas del grupo testigo, más una desviación estándar ($\bar{X} \pm 1$ DE) fueron considerados como positivos, es decir, presencia de anticuerpos anti-PHA.

CUADRO 5

ANTICUERPOS ESPECIFICOS ANTI-PHA EN EL SUERO DE RATAS ALIMENTADAS
CON EXTRACTO SALINO DE FRIJOL

| GRUPO | n | DIAS DE ADMINIS- TRACION | ANTICUERPOS ANTI-PHA | |
|----------|----|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | | IgG ($\bar{x} \pm DE$) | IgM ($\bar{x} \pm DE$) |
| TESTIGO | 10 | 14 | 0.209 \pm 0.073 | 0.262 \pm 0.041 |
| EXTRACTO | 5 | 3 | 0.167 \pm 0.056 | 0.273 \pm 0.044 |
| | 5 | 7 | 0.176 \pm 0.078 | 0.276 \pm 0.037 |
| COCIDO | 5 | 14 | 0.206 \pm 0.049 | 0.228 \pm 0.046 |
| EXTRACTO | 5 | 3 | 0.204 \pm 0.043 | 0.337 \pm 0.053 |
| | 5 | 7 | 0.891 \pm 0.301* | 0.401 \pm 0.102** |
| CRUDO | 5 | 14 | 0.928 \pm 0.062* | 0.342 \pm 0.086** |

Se reporta el valor promedio de absorbancia para cada grupo. * $p < 0.001$ (t-student). ** $P < 0.05$ (t-student).

No se detectaron anticuerpos anti-PHA de ninguna de las dos clases, a lo largo del estudio, en las ratas que recibieron el extracto cocido del frijol Bayo. Como se puede observar en el cuadro 5 y en las figuras 8 y 9, el valor promedio de absorbancia para cada tiempo de administración está dentro del intervalo del grupo testigo.

Por el contrario, las ratas que recibieron el extracto crudo del frijol Bayo produjeron anticuerpos anti-PHA de clase IgG e IgM de manera tiempo-dependiente.

La cinética de aparición de éstos anticuerpos fue la siguiente: para el caso de los anticuerpos anti-PHA de clase IgM,

éstos aparecieron al tercer día, alcanzaron su valor máximo en el día 7 y disminuyeron en el día 14 (figura 8).

Para el caso de los anticuerpos anti-PHA de clase IgG, éstos aparecieron al día 7, manteniéndose hasta el día 14 (figura 9).

La cinética de aparición de los anticuerpos anti-PHA en las ratas que recibieron el extracto crudo por intubación gástrica (vía oral), es similar a la que se ha reportado para el caso de proteínas que se administran por vía sistémica, es decir, una respuesta primaria caracterizada por la aparición de anticuerpos de clase IgM y una respuesta inmune secundaria, caracterizada por anticuerpos de clase IgG.

Anticuerpos anti-PHA de clase IgM

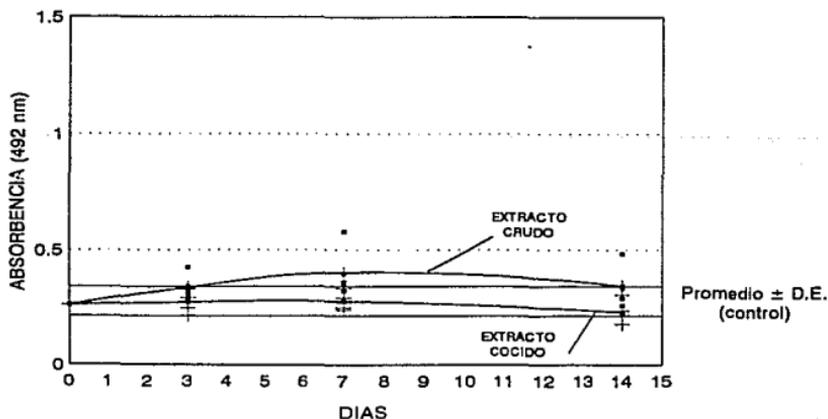


Figura 8. ANTICUERPOS ANTI-PHA DE CLASE IgM

Anticuerpos anti-PHA de clase IgG

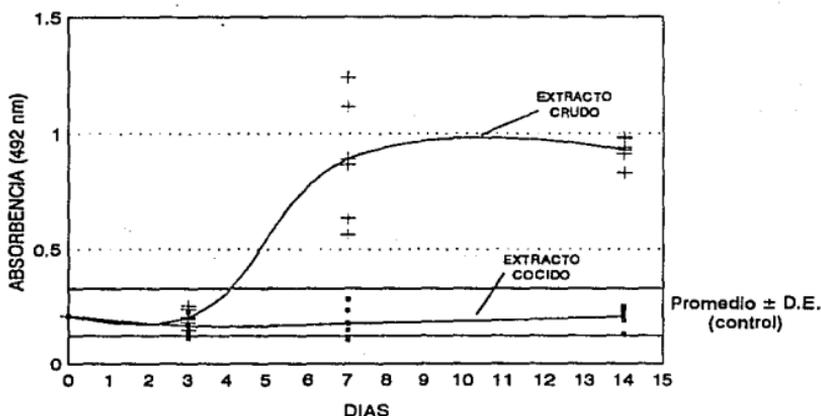


Figura 9. ANTICUERPOS ANTI-PHA DE CLASE IgG

La administración oral de un antígeno generalmente ocasiona la aparición de anticuerpos de tipo IgAs a nivel mucoso e inhibe la aparición de respuestas inmunes a nivel sistémico, fenómeno conocido como Tolerancia oral (91). Sin embargo, existen evidencias (92) de que ciertas proteínas que tienen la propiedad de unirse a las células de la mucosa intestinal (por ejemplo, pilis bacterianos y algunas lectinas) fueron capaces de inducir respuestas inmunes tanto a nivel mucoso como a nivel sistémico. Dicha respuesta fue de la misma magnitud a la obtenida cuando las mismas proteínas fueron administradas por vía intramuscular.

Los resultados del presente estudio demuestran que la administración oral de extracto crudo del frijol Bayo a ratas generó una respuesta inmune humoral a nivel sistémico, específico

para la PHA lo cual sugiere, a su vez, que la lectina de alguna forma atravesó la barrera epitelial y entró al torrente sanguíneo.

Existen dos posibles vías a través de las cuales la lectina pudo entrar a circulación sanguínea.

La primera es a través de la célula M de las placas de Peyer ya que como se mencionó en los antecedentes es la vía más común a través de la cual los antígenos logran cruzar la barrera epitelial del intestino. Sin embargo, esto no se comprobó en el presente estudio debido a las limitaciones de resolución de la microscopía óptica.

Otra posible vía de entrada de la lectina a torrente sanguíneo pudo ser a través de las células epiteliales de las vellosidades intestinales.

Como ya se mencionó, el sistema inmune mucoso previene la entrada de antígenos potencialmente nocivos a la circulación vía la mucosa (exclusión inmune y barrera epitelial) evitando que el sistema inmune sistémico se exponga a una inapropiada carga antigénica (93).

La unión de la lectina a las células epiteliales ocasiona alteraciones en la membrana de las microvellosidades y alteraciones en la permeabilidad vascular de la mucosa (73, 75, 94). Estas alteraciones pueden haber facilitado la entrada de la lectina a circulación sanguínea.

Pusztai y col. (95) demostraron en ratas que la PHA es transportada por las células epiteliales a torrente sanguíneo. Ellos detectaron más del 10% de una dosis intragástrica de PHA en la sangre y en órganos periféricos tres horas después de la administración.

Por otro lado, la ausencia de anticuerpos específicos contra la PHA en el suero de las ratas a las que se les administró extracto salino cocido de frijol, indica que el método de cocción utilizado destruyó efectivamente la antigenicidad de la lectina.

La inducción de la respuesta inmune sistémica contra la lectina debe ser a través de la activación de macrófagos y linfocitos a nivel de la placa de Peyer los cuales migran a otros sitios mucosos y a órganos como el bazo independientemente de que la PHA sea un mitógeno para linfocitos T (14,17,20).

5. MORFOLOGIA INTESTINAL.

La morfología del intestino del grupo de ratas que recibieron el PBS por 14 días (grupo testigo), se muestra en la figura 10.

En las figuras 11 y 12 se muestra la morfología del intestino de las ratas que recibieron el extracto cocido y crudo del frijol Bayo, respectivamente.

No se observó ninguna alteración en la morfología intestinal de las ratas que recibieron extracto salino cocido, ni en las que recibieron extracto salino crudo (figuras 11 y 12). En general, la forma y el tamaño de las vellosidades, así como de las criptas fue idéntica al grupo testigo y no se observó infiltración celular en la lámina propia.

La única alteración morfológica que pudo detectarse en el intestino de las ratas que recibieron extracto salino crudo, fue la ausencia de las microvellosidades en porciones del tercio superior de algunas vellosidades. Cabe destacar que ésta alteración únicamente se observó en la región proximal del intestino (duodeno).



Figura 10. PORCION PROXIMAL DE INTESTINO DELGADO (DUODENO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO PBS POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 14 DIAS (GRUPO TESTIGO). TINCION HEMATOXILINA-EOSINA (100X). LI: LUZ INTESTINAL. V: VELLOSIDAD INTESTINAL. C: CRIPTA.



Figura 11. PORCION PROXIMAL DE INTESTINO DELGADO (DUODENO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO EL EXTRACTO COCIDO DEL FRIJOL BAYO POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 14 DIAS. TINCION HEMATOXILINA-EOSINA (200X). LI: LUZ INTESTINAL. V: VELLOSIDAD INTESTINAL. C: CRIPTA.



Figura 12. PORCION PROXIMAL DE INTESTINO DELGADO (DUODENO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO EL EXTRACTO CRUDO DEL FRIJOL BAYO POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 14 DIAS. TINCION HEMATOXILINA-EOSINA (100X). LI: LUZ INTESTINAL. V: VELLOSIDAD INTESTINAL. C: CRIPTA.

En un estudio previo (74) se demostró que el grado y extensión en la alteración morfológica producido por las lectinas depende de la cantidad y de la frecuencia con que se administran éstas proteínas.

Se ha reportado (74) un acortamiento significativo de las vellosidades del intestino delgado en ratas alimentadas con dietas que contenían desde 0.25% de la lectina en la dieta.

En éste estudio, la cantidad de la lectina que se administró a las ratas, fue de aproximadamente 0.15 mg, que corresponde al 3% del total de proteína administrada (5 mg/ml), el cual es significativamente menor que la cantidad de lectina empleada en los otros estudios (74). Quizá por esto, no se detectó ninguna alteración en la morfología del intestino, o a que la microscopía óptica no permite una buena resolución de los daños reportados en otros estudios.

6. LOCALIZACION DE LA LECTINA EN EL INTESTINO.

La localización de la lectina (PHA) a lo largo del intestino delgado de las ratas que recibieron los extractos cocido y crudo del frijol Bayo, comprendió los siguientes aspectos:

- Sitio: se refiere a la región del intestino donde se unió la lectina, es decir, el duodeno, el yeyuno y/o el ileon.
- Distribución: se refiere a el patrón de unión de la lectina en la(s) vellosidad(es) intestinal(es), es decir, si comprendía a la vellosidad completa incluyendo la región de la cripta, la mitad superior o inferior de la vellosidad, el epitelio y/o la lámina propia de la vellosidad, etc.
- Intensidad: se refiere a la cantidad de lectina unida al intestino, con base en la intensidad de la tinción con inmunoperoxidasa, la cual se determinó de acuerdo con la siguiente escala: fuerte (+++), moderada (++) , débil (+) y ausente (-).

La tinción con inmunoperoxidasa de los cortes de intestino delgado (duodeno) de las ratas del grupo testigo, del grupo que recibió el extracto cocido y del grupo que recibió el extracto crudo del frijol Bayo, se muestra en las figuras 13, 14 y 15 respectivamente.

No se detectó a la lectina en ninguna de las muestras de intestino delgado en el grupo de ratas a las que se les administró el extracto cocido del frijol Bayo (figura 14), lo cual sugiere que la lectina fué destruída totalmente por el proceso de cocción. Sin embargo, los resultados de la actividad hemaglutinante del extracto cocido difieren de esta observación, ya que después del tratamiento térmico, fue posible detectar dicha actividad con un título de 1:4 (cuadro 1).

La aparente contradicción en estos resultados puede sugerir que la antigenicidad y la actividad hemaglutinante de la lectina residen en sitios (subunidades) diferentes de la molécula, y que su resistencia a la inactivación por calor, también es diferente.

En un estudio previo (69) la cocción en autoclave por 15 minutos, fue suficiente para destruir la actividad mitogénica de la PHA así como la inducción de la síntesis de inmunoglobulinas *in vitro*, pero no tuvo ningún efecto sobre la actividad hemaglutinante, lo cual se explicó con base en la resistencia de las subunidades, al tratamiento térmico.

Otra posible explicación es que la cantidad de lectina residual en el extracto cocido del frijol Bayo, no fue suficiente para ser detectada por el método de detección utilizado (inmunoperoxidasa).

El cuadro 6 resume el patrón de unión de la lectina en las muestras de intestino delgado del grupo de ratas que recibieron el extracto crudo del frijol.



Figura 13. PORCION PROXIMAL DE INTESTINO DELGADO (DUODENO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO PBS POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 14 DIAS (GRUPO TESTIGO). TINCION INMUNOPEROXIDASA (400X). LI: LUZ INTESTINAL. V: VELLOSIDAD INTESTINAL.



Figura 14. PORCION PROXIMAL DE INTESTINO DELGADO (DUODENO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO EL EXTRACTO COCIDO DEL FRIJOL BAYO POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 14 DIAS. TINCION INMUNOPEROXIDASA (400X). LI: LUZ INTESTINAL. V: VELLOSIDAD INTESTINAL.



Figura 15. PORCION PROXIMAL DE INTESTINO DELGADO (DUODENO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO EL EXTRACTO CRUDO DEL FRIJOL BAYO POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 3 DIAS. TINCION INMUNOPEROXIDASA (530X). LAS FLECHAS INDICAN LOS SITIOS DONDE SE UNIO LA LECTINA. LI: LUZ INTESTINAL. LP: LAMINA PROPIA. E: EPITELIO.

CUADRO 6

LOCALIZACION DE LA LECTINA (PHA) EN EL INTESTINO DELGADO DE RATAS ALIMENTADAS CON EL EXTRACTO CRUDO DEL FRIJOL BAYO

| GRUPO | REGION PROXIMAL (DUODENO) | REGION MEDIAL (YEYUNO) | REGION DISTAL (ILEON) |
|---------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 2 HORAS | +++ | - | - |
| 1 DIA | - | - | - |
| 3 DIAS | ++ | - | - |
| 7 DIAS | ++ | - | - |
| 14 DIAS | + | - | - |

Intensidad de la tinción: fuerte (+++), moderada (++), débil (+) y ausente (-).

La tinción se limitó a la superficie externa de la membrana de las células epiteliales situadas en los dos tercios superiores de las vellosidades, únicamente en la región proximal del intestino delgado (duodeno) (figura 15).

No se detectó tinción en las células de las criptas de Lieberkühn lo que sugiere que el receptor de la PHA se encuentra presente únicamente en las células epiteliales maduras, como ha sido indicado en estudios previos (64, 90, 96).

Tampoco se detectó la presencia de la PHA en las regiones medial (yeyuno) (figura 16) y distal (ileon) del intestino delgado lo que significa que el sitio de acción de la lectina depende de la presencia de un oligosacárido que se encuentra únicamente en la región proximal del tracto intestinal.



Figura 16. PORCION MEDIAL DE INTESTINO DELGADO (YEYUNO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO EL EXTRACTO CRUDO DEL FRIJOL BAYO POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 3 DIAS. FUNCION INMUNOPEROXIDASA (200X). LI: LUZ INTESTINAL. V: VILLOSIDAD INTESTINAL. C: CRIPTA.

Estos resultados coinciden con otros reportados previamente (74) donde se observó unión de la PHA únicamente a nivel de duodeno. Sin embargo, existe una pequeña contradicción con otros estudios (96) donde reportan unión de la lectina también a nivel del yeyuno.

Estas contradicciones entre los resultados de los diferentes trabajos pueden ser debido a los diferentes sitios donde se tomó la muestra de yeyuno. Mientras que para tomar muestras de duodeno existe cierto control ya que siempre se toma alrededor de los primeros 3 cm después de la válvula pilórica, para tomar muestras de yeyuno no existe control ya que el yeyuno no tiene límites bien definidos y además su longitud es mayor.

La cantidad de lectina unida al intestino delgado (intensidad de la tinción), varió con el tiempo de administración. La intensidad de la tinción fué mayor en el intestino de las ratas a las que se les administró el extracto crudo durante tres días (figura 15), y ésta fué menor a los 14 días (figura 17). Estos resultados sugieren que la exposición crónica a la lectina produce un aumento en la exfoliación celular, por lo que éstas células deben ser reemplazadas a partir de las criptas de Lieberkühn.

Esto se ha explicado por un aumento en la tasa mitogénica de la cripta (con el consiguiente aumento en la síntesis de ADN y ARN) y al aumento en la velocidad con la que éstas células migran hacia la porción de la vellosidad que ha sido dañada. A pesar de que el número de células epiteliales se mantiene, se ha propuesto que estas células pueden presentar formas inmaduras de sus glicoproteínas de membrana, debido a que la velocidad con la que migran no permite una glicosilación correcta de sus proteínas. Con base en ésto, se puede explicar la disminución observada en la intensidad de la tinción con inmunoperoxidasa.

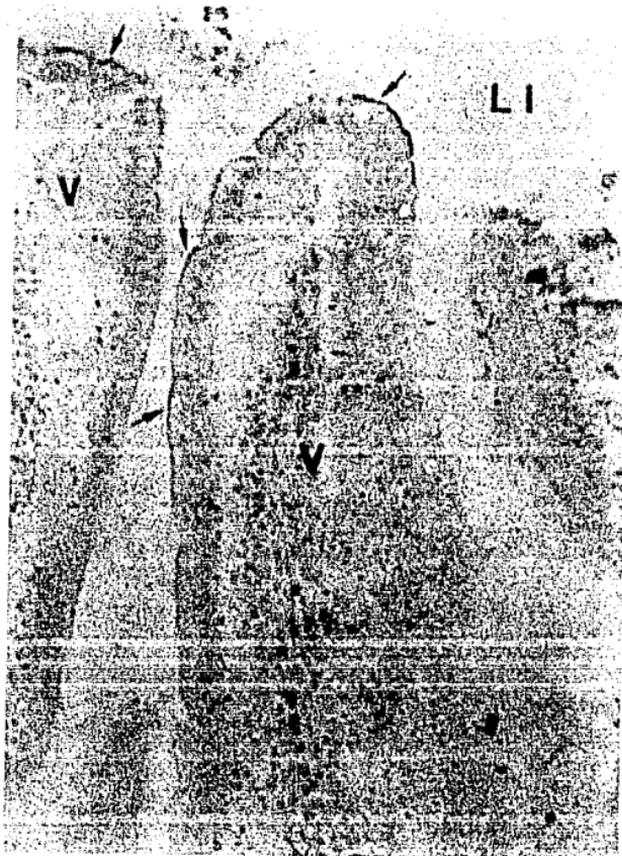


Figura 17. PORCION PROXIMAL DE INTESTINO DELGADO (DUODENO) DEL GRUPO DE RATAS QUE RECIBIO EL EXTRACTO CRUDO DEL FRIJOL BAYO POR INTUBACION GASTRICA DURANTE 14 DIAS. TINCION INMUNOPEROXIDASA (200X). LAS FLECHAS INDICAN LOS SITIOS DONDE SE UNIO LA LECTINA. LI: LUZ INTESTINAL. V: VELLOSIDAD INTESTINAL.

Se ha demostrado (90, 97), que después de la administración de la lectina y en ausencia de una nueva exposición la PHA se encuentra unida en las microvellosidades del duodeno en tan solo 1 hora y en las del yeyuno en los siguientes 30 minutos. Asimismo, la histología del epitelio dañado retornaba a la normalidad entre 10 y 20 horas después de la administración, lo cual también fue explicado por la migración celular que reemplaza a las células dañadas por la lectina.

Sin embargo, la reparación de las microvellosidades también ha sido explicada con base en procesos intrínsecos de reparación y no al reemplazo de las células dañadas (97), por lo que las microvellosidades potencialmente pueden ser dañadas y reparadas repetidamente después de la administración de las lectinas.

Con objeto de determinar si el patrón de unión de la PHA administrada en forma aguda era similar al encontrado por su administración crónica, se realizó un experimento adicional, en el cual un grupo de ratas que recibió una dosis única del extracto crudo del frijol Bayo se sacrificaron a las 2 y 24 horas siguientes.

La tinción con inmunoperoxidasa de los cortes de intestino de las ratas a las 2 horas, mostró un patrón de tinción idéntico al observado en los grupos de ratas que recibieron la administración crónica del extracto durante 3, 7 y 14 días. La tinción se limitó a la membrana externa de las células epiteliales situadas en los dos tercios superiores de todas las vellosidades, únicamente en el duodeno.

En cuanto a la intensidad de la tinción, ésta fue más fuerte en el grupo de ratas de 2 horas que en los grupos de 3, 7 y 14 días.

Estos resultados indican que el patrón de unión de la lectina es el mismo independientemente de la cantidad y frecuencia con que se administre, solo varía la intensidad de la tinción.

Por el otro lado, a las 24 horas no se encontró lectina unida en ninguna región del intestino. Esto parece indicar que la velocidad con la que son reparadas las microvellosidades es debida a la eliminación y reemplazo de las glicoproteínas presentes en su superficie y no al reemplazo de las células completas.

No hay que olvidar que aunque la lectina solo se une en la región proximal del intestino (duodeno), también debe encontrarse libre a nivel de yeyuno y de íleon. Una forma de comprobarlo sería aislando diferentes porciones del intestino delgado y recuperar su contenido para identificar a la PHA. Esto se ha hecho indirectamente al recuperar a la lectina en las heces de animales alimentados con ella (62).

VI. CONCLUSIONES

De las pruebas realizadas en el presente estudio se puede concluir lo siguiente:

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE.

- De acuerdo con la clasificación de Jaffé (42) de las lectinas de las semillas del género *Phaseolus* respecto a su actividad hemaglutinante, la lectina presente en el extracto salino crudo del frijol Bayo pertenece al grupo de las Panaglutininas o lectinas inespecíficas, ya que mostró actividad hemaglutinante sobre todos los eritrocitos humanos de los diferentes grupos sanguíneos (A, B y O) y sobre los eritrocitos de conejo y de vaca.

- En cuanto a la clasificación hecha por Jaffé y Brücher (62) respecto a la actividad hemaglutinante de las Panaglutininas sobre eritrocitos de conejo y eritrocitos de vaca previamente tratados con tripsina y su correlación con la toxicidad de las lectinas, la lectina del frijol Bayo pertenece al grupo A o lectinas tóxicas ya que reaccionó con eritrocitos de conejo y con eritrocitos de vaca tripsinizados.

- El tratamiento térmico empleado (autoclave, 121°C, 30 minutos y 15 lb/in²) redujo significativamente (casi 600 veces) la actividad hemaglutinante de la lectina contenida en el extracto crudo del frijol Bayo.

- En forma individual, ninguno de los azúcares probados fue capaz de inhibir la actividad hemaglutinante del extracto crudo del frijol Bayo aún siendo constituyentes del oligosacárido específico de la PHA.

EFFECTO DE LA LECTINA SOBRE EL ESTADO GENERAL DE LAS RATAS.

- La administración oral del extracto salino crudo de frijol ocasionó una rápida pérdida de peso en las ratas. Este efecto

también se observó en las ratas a las cuales se les administró extracto salino cocido de frijol lo cual indica que el tratamiento térmico utilizado en la cocción no fué suficiente para destruir totalmente a la lectina; lo que explica la actividad hemaglutinante en el extracto cocido.

- A pesar de la pérdida de peso, no hubo cambios en los valores de proteínas totales y de albúmina en suero debido a que éstos parámetros son regulados por mecanismos homeostáticos. También se debe al corto tiempo de duración del estudio, el cual no permite observar cambios en la concentración plasmática de estas proteínas.

ANTICUERPOS ANTI-PHA EN SUERO.

- La administración oral del extracto crudo del frijol Bayo generó una respuesta inmune humoral a nivel sistémico (anticuerpos anti-PHA de clase IgG e IgM), lo que indica que la lectina es capaz de estimular la respuesta inmune sistémica. La cinética de aparición de ambas clases de anticuerpos fue dependiente del tiempo de administración.

- No se detectaron anticuerpos anti-PHA en los sueros de las ratas que recibieron el extracto cocido del frijol Bayo indicando que el tratamiento térmico empleado destruyó la antigenicidad de la lectina, o bien, que la cantidad de lectina restante en el extracto cocido no fue suficiente para inducir una respuesta inmune.

ESTUDIO MORFOLOGICO.

- A nivel de microscopía óptica no se detectaron cambios morfológicos en las muestras de intestino delgado de las ratas a las que se les administró extracto crudo y extracto cocido del frijol Bayo con respecto a las ratas testigo.

LOCALIZACION DE LA LECTINA EN EL INTESTINO.

- No se detectó la presencia de lectina en las muestras de intestino delgado de las ratas que recibieron el extracto cocido del frijol Bayo.

- En el intestino delgado de las ratas que recibieron el extracto crudo del frijol, la unión de la lectina se limitó a la superficie externa de la membrana de las células epiteliales situadas en los dos tercios superiores de las vellosidades, únicamente en la región proximal del intestino delgado (duodeno). Estos resultados sugieren que el oligosacárido específico de la PHA no está presente en el yeyuno ni en el íleon, así como en las células de las criptas de Lieberkühn.

- La intensidad de la tinción disminuyó conforme se alargó el tiempo de exposición a la lectina, indicando que la velocidad con que son reemplazadas las células dañadas es mayor a la velocidad con la que migran las células de la cripta normalmente lo que impide la completa maduración de éstas células.

Por último y con base en los resultados obtenidos se puede afirmar que la administración oral del extracto salino crudo del frijol Bayo a ratas ocasiona pérdida de peso debido a la unión de la lectina a las microvellosidades intestinales lo que provoca una interferencia inespecífica con la absorción de nutrimentos. Asimismo, la unión de la lectina a las microvellosidades intestinales debe ocasionar una desorganización de la membrana de las células epiteliales lo cual puede facilitar la entrada de la lectina a la circulación sanguínea e inducir una respuesta inmune a nivel sistémico.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Davison J S. Control of secretion gastric. In: "Gastrointestinal secretion". Edited by J S Davison. Wright. 1989. pp. 86-101.
- 2.- Mantle M and Allen A. Gastrointestinal mucus. In: "Gastrointestinal secretion". Edited by J S Davison. Wright. 1989. pp. 202-229.
- 3.- Allen A, Leonard A J and Sellers L A. The mucus barrier. Its role in gastroduodenal mucosal protection. J Clin Gastroenterol. 1988; 10 (Suppl. 1): S93-S98.
- 4.- Steward M C and Case R M. Principles of ion and water transport across epithelia. In: "Gastrointestinal secretion". Edited by J S Davison. Wright. 1989. pp. 1-31.
- 5.- Selby W S, Janosy G, Goldstein G and Jewell D P. T lymphocyte subsets in human intestinal mucosa: the distribution and relationship to MHC-derived antigens. Clin Exp Immunol. 1981; 44:453-458.
- 6.- Chiba M, Ohta H, Nagasaki A, Arakawa H and Masamune O. Lymphoid cell subsets in normal human small intestine. Gastroenterol Jpn. 1986; 21:336-343.
- 7.- Cerf-Bensussan N, Schneeberger E E and Bhan A K. Immunohistologic and immunoelectron microscopic characterization of the mucosal lymphocytes of human small intestine by the use of monoclonal antibodies. J Immunol. 1983; 130:2615-2622.
- 8.- Tshibassu M, Geboes K, Eggermont E y Desmet V. Jejunal mucosa lymphoid cell subsets and the expression of major histocompatibility complex antigens in children. Eur J Pediatr. 1987; 146:251-256.
- 9.- Shields J G and Parrott D M V. Appearance of delayed-type hypersensitivity effector cells in murine gut mucosa. Immunology. 1985; 54:771-776.
- 10.- Mowat A McI, McInnes I B and Parrott D M V. Functional properties of intra-epithelial lymphocytes from mouse small intestine. IV. Investigation of the proliferative capacity of IEL using phorbol ester and calcium ionophore. Immunology. 1989; 66:398-403.
- 11.- Goodman T and Lefrancois L. Expression of the γ - δ T-cell receptor on intestinal CD 8⁺ intraepithelial lymphocytes. Nature. 1988; 333:855-858.
- 12.- Bonneville M, Janeway C A, and Ito K. Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of γ - δ T cells. Nature. 1988; 336:479-481.
- 13.- Brandtzaeg P, Bosnes V, Halstensen T S, Scott H, Sollid L M and Valnes K N. T lymphocytes in human gut epithelium preferentially express the α/β antigen receptor and are often CD 45/UCHL 1 positive. Scand J Immunol. 1989; 30:123-128.
- 14.- Brandtzaeg P, Halstensen T S, Kett K, Krajci P, Kvale D, Rognum T O, Scott H and Sollid L M. Immunology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and

- intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*. 1989; 97:1562-1584.
- 15.- Mc Dermott M R, Horsewood P, Clark D A and Bienenstock J. T lymphocytes in the intestinal epithelium and lamina propria of mice. *Immunology*. 1986; 57:213-218.
 - 16.- Fiocchi C, Tubbs R R and Youngman K R. Human intestinal mucosal mononuclear cells exhibit lymphokine-activated killer cell activity. *Gastroenterology*. 1985; 88:625-637.
 - 17.- Wolf J L and Bye W A. The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Ann Rev Med*. 1984; 35:95-112.
 - 18.- 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; 21:327-335.
 - 19.- Uchida J. Electron microscopic study of microfold cells (M cells) in normal and inflamed human appendix. *Gastroenterol Jpn*. 1988; 23:251-262.
 - 20.- Sneller M C and Strober W. M cells and host defense. *J Infect Dis*. 1986; 154:737-741.
 - 21.- Pappo J and Owen R L. Absence of secretory component expression by epithelial cells overlying rabbit gut-associated lymphoid tissue. *Gastroenterology*. 1988; 95:1173-1177.
 - 22.- Owen R L. Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. *Gastroenterology*. 1977; 72:440-451.
 - 23.- Weltzin R, Lucia-Jandris P, Michetti P, Fields B N, Kraehenbuhl J P and Neutra M R. 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.
 - 24.- Wiman K, Curman B, Forsum U, Klareskog L, Malmnäs-Tjernlund U, Rask L, Trägårdh L and Peterson P A. Occurrence of Ia antigens on tissues of non-lymphoid origin. *Nature*. 1978; 276:711-713.
 - 25.- Mayer L, Eisenhardt D, Salomon P, Bauer W, Plous R and Piccinini L. Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans: differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1991; 100:3-12.
 - 26.- Mac Donald T T, Weinel A and Spencer J. HLA-DR expression in human fetal intestinal epithelium. *Gut*. 1988; 29:1342-1348.
 - 27.- Chiba M, Iizuka M and Masamune O. Ubiquitous expression of HLA-DR antigens on human small intestinal epithelium. *Gastroenterol Jpn*. 1988; 23:109-116.
 - 28.- Bland P. MHC class II expression by the gut epithelium. *Immunol Today*. 1988; 9:174-178.
 - 29.- Russell G J and Harmatz P R. Major histocompatibility complex class II expression on enterocytes: to present or not to present. *Gastroenterology*. 1991; 100:274-276.
 - 30.- Bland P W. and Warren L G. 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.

- 31.- Bjerke K, and 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.
- 32.- Walker W A and Isselbacher K J. Uptake and transport of macromolecules by the intestine. Possible role in clinical disorders. Gastroenterology. 1974; 67:531-550.
- 33.- Pang K Y, Walker W A and Bloch K J. Intestinal uptake of macromolecules. Differences in distribution and degradation of protein antigen in control and immunised rats. Gut. 1981; 22:1018-1024.
- 34.- Walker W A. and Bloch K J. Intestinal uptake of macromolecules: in vitro and in vivo studies. NY Acad Sci. 1983; 409:593-602.
- 35.- Bland P W and Warren L G. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. II. Selective induction of suppressor T cells. Immunology. 1986; 58:9-14.
- 36.- Czerkinsky C, Prince S J, Michalek S M, Jackson S, Russell M W, Moldoveanu Z, McGhee J R and 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.
- 37.- Jeurissen S H M, Claassen E, Van Rooijen N and Kraal G. Intra-intestinal priming leads to antigen-specific IgA memory cells in peripheral lymphoid organs. Immunology. 1985; 56:417-423.
- 38.- Jones A L. The intestinal immune system: a time for the reaper. Gastroenterology. 1984; 87:234-237.
- 39.- Elson C O, Kagnoff M F, Fiocchi C, Befus A D and Targan S. Intestinal immunity and inflammation: recent progress. Gastroenterology. 1986; 91:746-768.
- 40.- Altorfer J, Hardesty S J, Scott J H and Jones A L. Specific antibody synthesis and biliary secretion by the rat liver after intestinal immunization with cholera toxin. Gastroenterology. 1987; 93:539-549.
- 41.- Sugiura H and Nakanuma Y. Secretory component and immunoglobulins in the intrahepatic biliary tree and peribiliary gland in normal livers and hepatolithiasis. Gastroenterol Jpn. 1989; 24:308-314.
- 42.- Jaffé W G. Hemagglutinins (Lectins). In: "Toxic constituents of plant foodstuffs". Liener I E. 2nd. Edition. Academic Press USA. 1980. pp. 73-102.
- 43.- Liener I E. Toxic factors in edible legumes and their elimination. Am J Clin Nutr. 1962; 11:281-298.
- 44.- Sharon N and Lis H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science. 1972; 177:949-959.
- 45.- Franz H. Hundred years of ricin. In: "Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry". Vol 6. Editors Bog-Hansen T C and Freed D L J. Sigma Chemical Company. St. Louis, MO. USA. 1988. pp. 7-13.
- 46.- Sharon N and Lis H. Legume lectins: a large family of homologous proteins. FASEB J. 1990; 4:3198-3208.

- 47.- Lis H and Sharon N. Lectins as molecules and as tools. *Ann Rev Biochem.* 1986; **55**:35-67.
- 48.- Lis H and Sharon N. The biochemistry of plant lectins (Phytohemagglutinins). *Ann Rev Biochem.* 1973; **42**:541-571.
- 49.- Etzler M E. Lectins as probes in studies of intestinal glycoproteins and glycolipids. *Am J Clin Nutr.* 1979; **32**:133-138.
- 50.- Peschke P, Kuhlmann W D and Wurster K. Histological detection of lectin binding sites in human gastrointestinal mucosa. *Experientia.* 1983; **39**:286-287.
- 51.- Triadou N and Audran E. Interaction of the brush-border hydrolases of the human small intestine with lectins. *Digestion.* 1983; **27**:1-7.
- 52.- Walker R A. The use of lectins in histology and histopathology. In: "Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry". Vol 6, Editors Bog-Hansen T C and Freed D L J. Sigma Chemical Company. St. Louis, MO. USA. 1988. pp. 591-600.
- 53.- Yamamura Y, Tanaka J L, Madvasta K R, Fudenberg H H and Proctor J W. Differences in mitogenic responses of murine T cells to two distinct Phytohemagglutinin (PHA) subcomponents. *Immunol Comm.* 1981; **10**:9-20.
- 54.- Nachbar M S and Oppenheim J D. Lectins in the United States' diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *Am J Clin Nutr.* 1980; **33**:2338-2345.
- 55.- Jaffé W G. Immunology of plant agglutinins. In: "Immunological aspects of foods". Edited by Nicholas Catsimpcolas. The AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut. 1977. pp. 170-181.
- 56.- Fordsdyke D R and David C M. Comparison of enhancement by heated serum and 2-mercaptoethanol of lymphocyte transformation induced by high concentrations of concanavalin A. *Cell Immunol* 1978; **36**:86-96.
- 57.- Siraganian R P and Siraganian P A. Mechanims of action of concanavalin A on human basophils. *J Immunol.* 1975; **114**:886-893.
- 58.- Haber J, Rosenau W and Goldberg M. Separate factors in phytohemagglutinin induce lymphotoxin, interferon, and nucleic acid synthesis. *Nature.* 1972; **238**:60-61.
- 59.- Calderón R A and Córdoba F. Immunosuppressive activity of *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus vulgaris* extracts in mice. *Eur J Immunol.* 1976; **6**:522-525.
- 60.- Freed D L J and Buckley C H. Mucotractive effect of lectin. *Lancet* 1978; **I**:585-586.
- 61.- Jaffé W G and Vega-Lette C L. Heat-labile growth-inhibiting factors in beans (*Phaseolus vulgaris*). *J Nutr.* 1968; **94**:203-210.
- 62.- Jaffé W G y Brücher O. Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutininas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). *Arch Latinoamer Nutr.* 1972; **22**:267-281.
- 63.- Nakata S and Kimura T. Effect of ingested toxic bean lectins on the gastrointestinal tract in the rat. *J Nutr.* 1985; **115**:1621-1629.

- 64.- Banwell J G, Boldt D H, Meyers J, Weber F L, Miller B and 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.
- 65.- Calderón de la Barca A M, Vázquez-Moreno L and Valencia M E. The lectin of *Amarantus cruentus* resists *in vivo* proteolysis and effects the gastrointestinal mucosa of rats. In: "Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry". Vol. 6, Editors Bog-Hansen T C and Freed D L J. Sigma Chemical Company. St. Louis, MO. USA. 1988. pp. 125-132.
- 66.- Weber T M. Isolation and characterization of a lymphocyte-stimulating leucoagglutinin from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Scand J Clin Lab Invest*. 1969; Suppl. 111.
- 67.- Barkham P and Ballas A. Phytohemagglutinin: separation of hemagglutinating and mitogenic principles. *Nature*. 1963; 200:141-142.
- 68.- Punnett T and Punnett H H. Induction of leucocyte growth in cultures of human peripheral blood. *Nature*. 1963; 198:1173-1175.
- 69.- Gómez Rodríguez Francisco Enrique. Caracterización, actividad mitogénica y producción de inmunoglobulinas *in vitro*, por lectinas de dos variedades de *Phaseolus vulgaris*. Facultad de Química. UNAM. 1986.
- 70.- Toms G C and Western A. Chemotaxonomy of the leguminosae. Edited by Harbone J B, Boutler D and Turner B L. Academic Press, New York. 1971. pp. 367-462.
- 71.- Noah N D, Bender A E, Realdi G B and Gilbert R J. Food poisoning from raw red kidney beans. *Br Med J*. 1980; 281:236-237.
- 72.- Lorenzsson V and Olsen W A. *In vivo* responses of rat intestinal epithelium to intraluminal dietary lectins. *Gastroenterology* 1982; 82:838-848.
- 73.- Sotelo A, González Licea A, González-Garza M T, Velasco E and Feria-Velasco A. Ultrastructural changes of epithelial intestinal cells induced by the ingestion of raw *Phaseolus acutifolius*. *Nutr Rep Int*. 1983; 27:329-337.
- 74.- Lafont J, Rouanet J M, Gabrion J, Assouad J L, Zambonino Infante J L and Besançon P. Duodenal toxicity of dietary *Phaseolus vulgaris* lectins in the rat: an integrative assay. *Digestion*. 1988; 41:83-93.
- 75.- Donatucci D A, Liener I E and Gross C J. Binding of navy bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin to the intestinal cells of the rat and its effect on the absorption of glucose. *J Nutr*. 1987; 117:2154-2160.
- 76.- Ceri H, Falkenberg-Anderson K, Fang R, Costerton J W, Howard R and Banwell J G. Bacteria-lectin interactions in phytohemagglutinin-induced bacterial overgrowth of the small intestine. *Can J Microbiol*. 1988; 34:1003-1008.
- 77.- Banwell J G, Howard R, Kabir I and Costerton J W. Bacterial overgrowth by indigenous microflora in the

- phytohemagglutinin-fed rat. *Can J Microbiol.* 1988; 34:1009-1013.
- 78.- Greer F, Brewer A C and Pusztai 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.
 - 79.- Pusztai A, Grant G and Bardocz S. Effect of diet on gut development. Rowett Research Institute. Annual Report. 1988. pp. 8-10.
 - 80.- Petres J and Czukur B. Effect of different heat treatments on hemagglutinin activity in white kidney bean. In: "Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry". Vol. 6, Editors Bog-Hansen T C and Freed D L J. Sigma Chemical Company. St. Louis, MO. USA. 1988. pp. 137-139.
 - 81.- Felsted R L, Leavitt R D and Bachur N R. Purification of the phytohemagglutinin family of proteins from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) by affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta.* 1975; 405:72-81.
 - 82.- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L and Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.
 - 83.- Kraus A L. Research methodology. In: "The laboratory rat". Vol. II Academic Press, Inc. USA. 1980. pp. 1-42.
 - 84.- Tietz N W. Química clínica moderna. Primera Edición en Español. Interamericana, México. 1972. pp. 189-192.
 - 85.- Miyada D S, Baysinger V, Notrica S and Nakamura R M. Albumin quantification by the binding and salt fractionation technique. *Clin Chem.* 1972; 18:52-56.
 - 86.- Voller A, Bidwell D E and Bartlett A. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Edited by Dynatech Laboratories, Alexandria VA., USA. 1979.
 - 87.- Johnson G D and Dorling J. Immunofluorescence and immuno-peroxidase techniques. In: "Techniques in clinical immunology". Edited by Thompson R A. Second Edition. Blackwell Scientific Publications. London. 1981. pp. 106-137.
 - 88.- Pettigrew N M. Techniques in immunocytochemistry. Application to diagnostic pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 1989; 113:641-644.
 - 89.- Wu A M, Sugii S and Herp A. A table of lectin carbohydrate specificities. In: "Lectins -Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry". Vol 6, Editors Bog-Hansen T C and Freed D L J. Sigma Chemical Company. St. Louis, MO. USA. 1988. pp. 723-740.
 - 90.- Pusztai A, Clarke E M W and King T P. The nutritional toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. *Proc Nutr Soc.* 1979; 38:115-120.
 - 91.- Doe W F. The intestinal immune system. *Gut.* 1989; 30:1679-1685.
 - 92.- Alzpurua de H J and Russell-Jones J. Oral vaccination. Identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. *J Exp Med.* 1988; 167:440-451.
 - 93.- Strober W and James S P. The mucosal immune system. In: "Basic and clinical immunology". Edited by Stites D P and Terr A I.

7th Edition. Appleton & Lange, Connecticut USA. 1991. pp. 175-186.

- 94.- Greer F and Pusztai A. Toxicity of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in rats: changes in intestinal permeability. *Digestion*. 1985; 32:42-46.
- 95.- Pusztai A. Plant and food lectins as metabolic signals for the gut. Systemic absorption of lectins from the small intestine: oral delivery of polypeptide drugs. Rowett Research Institute. Annual Report. 1990. pp. 18-25.
- 96.- King T P, Pusztai A and Clarke E M W. Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin-induced lesions in rat small intestine. III. Ultrastructural studies. *J Comp Path*. 1982; 92:357-373.
- 97.- Weinman M D, Allan C H, Trier J S and Hagen S J. Repair of microvilli in the rat small intestine after damage with lectins contained in the red kidney bean. *Gastroenterology*. 1989; 97:1193-1204.

ANEXO 1

DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES. (Método de Lowry)

FUNDAMENTO.

La determinación de proteínas totales por el método de Lowry se fundamenta en la reacción de las proteínas con el reactivo de fenol de Folin-Ciocalteau. El color que se forma es debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína, tal como sucede en el método de Biuret, y la reducción de fosfomolibdato y fosfotungstato a azul de molibdeno y a azul de tungsteno respectivamente, por la tirosina y el triptofano presentes en la proteína (82).

REACTIVOS.

- A. Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N.
- B. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% en tartrato de sodio y potasio al 1%.
- C: Solución de cobre alcalino: 50 ml del reactivo A y 1 ml del reactivo B (se prepara el mismo día que se va a usar).
- D. Reactivo de Folin 1N (Sigma Chemical Company).
- E. Solución estándar: se preparan estándares de Albúmina Sérica Bovina (SIGMA, Chem. Com.) en NaOH 0.1N a concentraciones de 4, 2, 1 y 0.5 mg/ml.

METODO.

Se colocan 20 μl de muestra en un tubo de ensaye, se añaden 200 μl de agua destilada y 1.0 ml de la solución de cobre alcalino. Se agita en vortex y se deja reaccionar 10 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 100 μl del reactivo de Folin, se agita, se deja reaccionar 30 minutos y se lee la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro.

ANEXO 2

ADMINISTRACION INTRAGASTRICA

Para realizar la administración intragástrica de los extractos salinos de frijol a las ratas, se utilizó una cánula de cobre niquelada con "punta de globo" (Ferrill & Moreland) la cual se adaptó a una jeringa (Figura).

La administración se realiza de la siguiente forma (83): se toma con una mano a la rata, aproximadamente a la altura del torax con los dedos índice y medio a cada lado de la cabeza para impedir que pueda voltear y morder, y se sostiene firmemente pero sin apretar para evitar que la rata reaccione con agresividad (Figura).

Una vez sujeto el animal, la cánula se introduce por la boca girando levemente y moviendo sobre la lengua hasta llegar al esófago (Figura) donde es expulsado el líquido de la jeringa.

La inserción de la cánula en el esófago debe realizarse con cuidado y de manera correcta para evitar la infusión accidental del líquido en la tráquea.



ANEXO 3

PUNCION CARDIACA

Para realizar la punción cardiaca, la rata anestesiada se coloca en posición decúbito dorsal y se palpa el latido del corazón con los dedos pulgar e índice en la región de la 4a. a la 6a. costillas.

Una vez palpado el corazón se introduce la aguja de la jeringa a través de la pared torácica en un ángulo aproximadamente de 45° al eje horizontal del cuerpo de la rata (Figura) (83). El extremo de la aguja llega a transmitir el palpitir del corazón.

Idealmente, la pared del ventrículo izquierdo es penetrado usando éste método, y la fuerte pulsación puede producir el flujo sanguíneo a la jeringa.

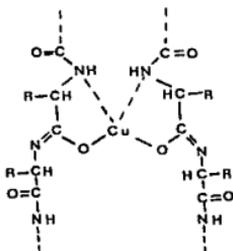


ANEXO 4

DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES SERICAS (Método de Biuret)

FUNDAMENTO.

Este método se fundamenta en el color azul violeta producido al reaccionar el reactivo alcalino de cobre con las proteínas (84). El color es debido a la formación del siguiente complejo:



REACTIVOS.

- A. Diluyente de Biuret: KI 0.5% (p/v) en NaOH 0.25N.
- B. Reactivo de Biuret: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 15.0 g
tartrato de sodio y potasio 45.0 g
Diluyente de Biuret c. b. p. 1000 ml
- C. Biuret de trabajo: Reactivo de biuret diluido 1:2 con diluyente de biuret.

SOLUCION ESTANDAR.

Se preparan soluciones de Albúmina Sérica Bovina (SIGMA Chem. Com.) a las concentraciones de 10, 8, 6, 4, y 2 g/dl en SSI (NaCl 0.89%)

METODO.

Se colocan 20 μ l de muestra en un tubo de ensaye y se agregan 2.0 ml del reactivo de biuret diluido 1:2. Se agita perfectamente y se deja reaccionar 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lee la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro.

ANEXO 5

DETERMINACION DE ALBUMINA SERICA (Verde de Bromocresol)

FUNDAMENTO.

La determinación de albúmina en suero por el método de enlace a colorantes se fundamenta en la unión de la albúmina a colorantes ftaleínicos como el verde de bromocresol produciendo un color cuya intensidad es proporcional a la concentración de albúmina presente (85).

REACTIVOS.

| | |
|----------------------|---------|
| NaOH 10% | 26 ml |
| Verde de Bromocresol | 500 mg |
| Acido láctico | 30 ml |
| Tween 20 | 10 ml |
| Agua destilada | 1000 ml |

*Antes de aforar, se ajusta el pH a 4.0 con NaOH 10%. Queda una solución concentrada 5X.

SOLUCION ESTANDAR.

Se preparan soluciones de Albúmina Sérica Bovina (SIGMA Chem. Com.) a las concentraciones de 2, 3, 4, 5 y 6 g/dl en SSI.

METODO.

Se colocan 20 μ l de muestra (suero, plasma o estándar) en un tubo de ensaye y se agregan 5.0 ml del reactivo (diluído 1:5 con agua destilada), se agita y se lee la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro.

ANEXO 6

SISTEMA ELISA INDIRECTO



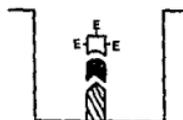
ADSORCION DEL ANTIGENO
A LA FASE SOLIDA

LAVADO



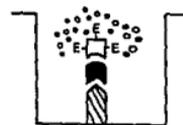
ADICION DEL SUERO PROBLEMA
(EL ANTICUERPO ESPECIFICO SE
UNE AL ANTIGENO)

LAVADO



ADICION DE UNA ANTI-IMUNOGLOBULINA
CONJUGADA CON ENZIMA

LAVADO



ADICION DEL SUSTRATO

LA INTENSIDAD DEL COLOR ES PROPORCIONAL A LA
CONCENTRACION DEL ANTICUERPO.

ANEXO 7

PREPARACION DE REACTIVOS (Detección de anticuerpos anti-PHA)

- 1.- Lectina de *Phaseolus vulgaris*, fracción eritroaglutinante (PHA-E) (Sigma Chemical Co.).
- 2.- Amortiguador de recubrimiento (Carbonato-Bicarbonato, 0.1M, pH=9.6).

| | |
|---------------------------------|---------|
| Na ₂ CO ₃ | 1.59 g |
| NaHCO ₃ | 2.93 g |
| *NaN ₃ | 0.20 g |
| Agua destilada c.b.p. | 1000 ml |

Estable por dos semanas a temperatura ambiente.

* La azida de sodio se omite cuando se utiliza peroxidasa como enzima.

- 3.- Amortiguador de fosfatos salinos con Tween 20 (Polioxi-etilen sorbitan monolaurato) (PBS-Tween, 0.1M, pH=7.2).

| | |
|--|---------|
| NaCl | 8.0 g |
| Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O | 2.9 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2 g |
| KCl | 0.2 g |
| *NaN ₃ | 0.2 g |
| Tween 20 | 0.5 ml |
| Agua destilada c.p.b. | 1000 ml |

* La azida de sodio se omite cuando se utiliza peroxidasa como enzima.

- 4.- Amortiguador de recubrimiento-albúmina libre de r-globulinas al 0.2% (Carbonatos-ASB al 0.2%).

Albúmina Sérica Bovina

libre de r-globulinas

(Sigma Chemical Company) 0.2 g

Amortiguador de recubrimiento 100 ml

- 5.- Conjugados.

- Suero de cabra, anti-IgG (τ) de rata, conjugado con peroxidasa. (Peroxidase labeled. Affinity purified antibody to rat IgG (τ) goat) (KIRKEGAARD & PERRY LABORATORIES, INC. (kpl)).

- Suero de cabra, anti-IgM (μ) de rata, conjugado con peroxidasa. (Peroxidase labeled. Affinity purified antibody to rat IgM (μ) goat) (KIRKEGAARD & PERRY LABORATORIES, INC. (kpl)).

- 6.- Sustrato.

Amortiguador fosfato-citrato (pH=5.0):

Acido cítrico 0.1 M 24.3 ml

Na₂HPO₄ 0.2 M 25.7 ml

Agua destilada c.b.p. 50.0 ml

Disolver 40 mg de o-fenilendiamina (OPD, Sigma Chem. Co.)(*
en 100 ml de amortiguador fosfato-citrato y agregar 40 μ l de H₂O₂ al 30%.

La solución sustrato o-fenilendiamina es sensible a la luz y debe prepararse justo antes de usarse.

*Tener precaución al pesarla ya que es un carcinógeno que puede ser absorbido por la piel.

- 7.- Fase sólida.

Se utilizan placas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano, NUNC-F (Dinamarca).

ANEXO 8

PREPARACION DE REACTIVOS (Técnicas de Tinción Histológicas)

- 1.- PBS, 0.1 M, pH=7.4
- 2.- Eter
- 3.- Formol al 10% en amortiguador salino de fosfatos
- 4.- Etanol al 70%, 80%, 96% y 100%
- 5.- Xilol
- 6.- Parafina histológica (Laboratorios del Río, S.A., Méx.)
- 7.- Albúmina de Mayer:

| | |
|-----------------------|---------|
| Clara de huevo fresco | 50.0 ml |
| Glicerina | 50.0 ml |

Mezclar bien y filtrar a través de gasa gruesa (a 55°C).
Agregar un cristal de fenol o de timol como conservador.
Diluir al 20% para su uso.
- 8.- Hematoxilina, fórmula de Delafield (Sigma de México, S.A.).
- 9.- Eosina.

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Solución madre (eosina alcohólica): | |
| Eosina Y o amarilla | 1.0 g |
| Eosina B o azulada | 1.0 g |
| Etanol absoluto | 100 ml |
| Solución de trabajo: | |
| Eosina alcohólica | 50 ml |
| Agua destilada | 300 ml |
- 10.- Acetona Q.P.
- 11.- Solución Metanol-H₂O₂

| | |
|-------------------------------|-------|
| Metanol | 50 ml |
| H ₂ O ₂ | 1 ml |
- 12.- Suero de conejo anti-lectina de *Phaseolus vulgaris* (anti-PHA fracción eritroaglutinante) (Anti-*Phaseolus vulgaris* lectin. Antibody developed in rabbit) (Sigma Chemical Company)

13.- Suero de cabra anti-IgG, específico para cadenas H y L de conejo, conjugado con peroxidasa (Peroxidase labeled. Affinity purified antibody to rabbit IgG (H+L) goat) (KIRKEGAARD & PERRY LABORATORIES, INC. (kpl))

14.- Solución sustrato-revelador.

3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chem. Co.) 1.0 mg

Buffer Tris-HCl 0.2 M, pH=7.6 2.0 ml

H₂O₂ al 30% 2.0 μ l

15.- Resina

ANEXO 9

PROCESAMIENTO DE TEJIDOS (Microscopía Óptica)

FIJACION DE LOS TEJIDOS.

Las muestras se colocan en una solución de formol al 10% en PBS durante 24 horas para preservar su estructura y fijar sus antígenos sin destruir su antigenicidad.

Transcurridas las 24 horas las muestras se lavan con agua corriente para eliminar el formol.

DESHIDRATACION Y CLARIFICACION DE LOS TEJIDOS.

La deshidratación de los tejidos se realiza transfiriéndolos a recipientes con etanol al 70%, 80%, 96% y 100% en orden creciente de concentración, dejándolos 1 hora en cada uno.

Después del último baño en etanol al 100% las muestras se transfieren a xilol dejándolas 2 horas para su clarificación.

INCLUSION EN BLOQUES DE PARAFINA.

Las muestras clarificadas son transferidas a un recipiente con parafina histológica fundida a 60°C e incubadas a la misma temperatura durante 2 horas para su impregnación, después de lo cual se forman los bloques y se dejan solidificar.

CORTES DE TEJIDO.

Se realizan cortes transversales de 7 μ de grosor utilizando un microtomo.

Los cortes son montados sobre portaobjetos cubiertos con albúmina de Mayer y puestos en una parrilla de calentamiento hasta la fusión de la parafina, para fijar la muestra al portaobjeto.