

18
24-



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



"DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA
CUANTITATIVA EN LA DETERMINACION DE
LECTINAS EN FRIJOLES Y SU CORRELACION
CON SU TOXICIDAD SUBAGUDA"

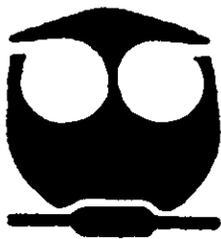
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

GARCIAFIGUEROA ASENCIO DIANA YESICA



MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

267108



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Jurado asignado:

Presidente Prof. Sotelo López Angela

Vocal Prof. Valle Vega Pedro

Secretario Prof. Lucas Florentino Bernardo

1er. Suplente Prof. Cornejo Barrera Lucia

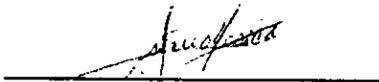
2º. Suplente Prof. Gil Vieyra Leticia

Lab 111. Departamento de Farmacia

Edificio E. Facultad de Química



M. en C. Lucas Florentino Bernardo



Garciafigueroa Asencio D. Yesica.(sustentante)

DEDICATORIAS:

A mi madre por esa cálida luz
que no ha dejado de acompañarme
durante toda mi vida, por su apoyo y sus consejos.

A Dios...

A la vida...

Agradecimientos:

Al Maestro Bernardo Lucas por su dedicación al guiarme y su apoyo incondicional.

A Lety por su alegre disposición tanto en el trabajo como en lo personal.

A la U.N.A.M. por abrirme sus puertas hacia mi formación y por el orgullo de pertenecer a ella.

A mi país por engrandecer mi orgullo de ser mexicana

A mis abuelitas, mis tíos y a mi hermano, por ser parte de mí...

A mis amigos que continúan conmigo a través de los recuerdos.

A Edgar por compartir mis intereses y estar conmigo aún en la distancia.

INDICE

Introducción.....	1
Objetivos.....	4

Capítulo 1: Generalidades

1.1. Las Leguminosas

1.1.1. Las Leguminosas	5
1.1.2. Sustancias tóxicas presentes en leguminosas.....	8

1.2. Lectinas

1.2.1. Antecedentes.....	10
1.2.2. Propiedades fisicoquímicas.....	12
1.2.3. Especificidad.....	14
1.2.4. Localización de las lectinas en las plantas.....	15
1.2.5. Actividades biológicas.....	17
1.2.6. Toxicidad.....	22

Capítulo 2: Materiales y Métodos

2.1. Diagrama de trabajo.....	28
2.2. Determinación semicuantitativa de lectinas.....	31
2.3. Determinación de proteína por método de Lowry.....	34
2.4. Tratamientos térmicos.....	37
2.5. Análisis bromatológico.....	40
2.6. Prueba biológica de REP.....	40
2.7. Prueba biológica de digestibilidad.....	45
2.8. Estudio histopatológico.....	46
2.9. Estudio estadístico.....	47

Capitulo 3.Resultados y discusión.

Resultados y discusión de resultados.....	48
Conclusiones.....	89
Bibliografía.....	90

Hoy en día la creciente demanda de alimentos a nivel mundial , conlleva a la búsqueda de fuentes de abastecimiento económicamente accesibles. Una de estas pueden ser las leguminosas, que forman parte de la dieta esencial de muchos países en la actualidad.

México es uno de los países de mayor consumo de frijol (*Phaseolus spp*) que junto con el maíz constituye, la dieta básica de una gran parte de la población rural, se conocen cerca de 3 000 tipos de frijol cultivados, agrupados en 67 variedades que se consumen tradicionalmente en las diferentes regiones del país.

En 1990 más del 50% de los menores de cinco años en el país padecía algún grado de desnutrición, elevándose este índice al 80% en las zonas marginadas de las grandes ciudades y en las áreas rurales. En el sur de la República Mexicana, el 22% de los niños menores de cinco años presentan nutrición deficiente (FAO, 1994). Esta situación conjuntamente con la práctica de hábitos alimentarios inadecuados ha motivado la preocupación de muchos investigadores a fin de conocer las sustancias nocivas que pueden tener los frijoles de mayor consumo y su contribución en la salud de la población.

Uno de los factores antinutricionales que afecta a la calidad nutricia del frijol son las lectinas, las cuales tienen la capacidad de aglutinar los glóbulos rojos de especies animales e incluso del hombre, de manera específica.

INTRODUCCIÓN

Este tipo de compuestos son de naturaleza proteínica y pueden representar del 2 hasta el 10% de la proteína total de grano seco. Este tipo de proteínas, cuando son ingeridas en forma activa como parte de la alimentación produce con mayor o menor gravedad, una intensa inflamación de la mucosa intestinal, con la posterior destrucción de las células epiteliales, edema y hemorragias del tejido linfático.

Actualmente se cuenta con una metodología *in vitro* para la determinación de lectinas; la cual es semicuantitativa y solo cuando se corre simultáneamente una muestra de referencia puede darnos un grado de comparación en el contenido de este tóxico.

Con base en lo anterior se hicieron las modificaciones pertinentes a la metodología semicuantitativa con el fin de obtener una metodología que maneje datos cuantitativos que, aplicada a diferentes muestras biológicas proporcionara datos cuantitativos del contenido de hemaglutininas.

Se ha establecido que el valor nutricional de las proteínas de frijoles *Phaseolus vulgaris* se incrementa por procesos térmico, especialmente por tratamientos con calor húmedo. Se trabajó con dos condiciones de calor para disminuir el contenido de lectinas en las muestras y con la aplicación de la metodología cuantitativa a éstas se logro cuantificar el contenido de lectinas remanente.

INTRODUCCIÓN

Además se realizó un estudio de toxicidad subaguda con ratas de ambos sexos, administrando dietas de frijoles *Phaseolus* de la variedad Pinto, Gordo y Negro Jamapa, tanto crudos como cocidos.

Los resultados obtenidos *in vitro* concordaron con los resultados *in vivo* pues las muestras que contenían mayor contenido de lectinas-- según la metodología cuantitativa-- fueron las dietas que causaron más rápido efectos tóxicos en los animales de prueba. Mientras que las muestras que no contenían niveles tan altos de hemaglutininas, administrados a los animales de estudio, aunque no causaron la muerte de éstos, sí hubo daño a nivel gastrointestinal y valores bajos de digestibilidad y REP comparados con una muestra de referencia.

Objetivo General:

- Desarrollar una metodología cuantitativa basada en el método semicuantitativo de Jaffé para la medición de lectinas en muestras vegetales que permitan establecer una relación con el grado de toxicidad.

Objetivos Particulares:

- Realizar los cambios pertinentes que permitan expresar el grado de aglutinación en términos cuantitativos.
- Correlacionar el contenido de lectinas con el de la fracción proteínica soluble (albúminas y globulinas) de extractos de diferentes muestras de frijol común.
- Emplear el método propuesto en muestras vegetales tratadas a dos diferentes tratamientos térmicos que logren disminuir su toxicidad, para lo cual se cuantificará el contenido de lectinas en las muestras tratadas.
- Correlacionar el contenido de lectinas utilizando el método propuesto con el grado de toxicidad *in vivo*.

Capítulo 1.Generalidades

1.1.LAS LEGUMINOSAS

1.1.1.Antecedentes

La familia de las leguminosas es la tercera más numerosa de las plantas y se consume desde hace 8,000 años. Existen alrededor de 18,000 especies agrupadas en 650 géneros y son sólo aproximadamente 20 las que se utilizan en la alimentación humana y animal en gran escala. El género *Phaseolus* es uno de los más importantes dentro de este grupo de plantas. Se cree ser originario de México y su distribución está concentrada en América Central.

El consumo de leguminosas (principalmente *Phaseolus vulgaris*, frijol común) forma parte de los hábitos alimentarios de las poblaciones en desarrollo, especialmente de los grupos de nivel socioeconómico bajo; lo cual se debe a su costo relativamente bajo y a su gran aceptabilidad; por lo que se le ha denominado "la carne de los pobres" ¹.

Se caracterizan por ser una excelente fuente de vitaminas y minerales así como su elevado contenido de proteínas que en muchos casos supera el 10%. Sin embargo, son deficientes en aminoácidos azufrados y por esta razón suelen consumirse combinados con cereales, complementándose así sus cualidades nutricias. Otro aspecto importante que hay que considerar en las leguminosas, es su resistencia al ataque de plagas, debido entre otros factores a la existencia de determinadas sustancias tóxicas naturales que actúan como un mecanismo de defensa para la planta contra insectos y microorganismos dañinos.

¹ Mulle, T., and Tubin, G., 1986. Nutrición y ciencia de los alimentos. Ed. Acribia. Zarpa. Pp 112.

Las leguminosas se distinguen por tres características principales:

- a) Forman vainas de las más variadas formas y tamaños, dentro de las cuales se hallan uno o más grano.
- b) Tienen la capacidad de asociarse con bacterias *Rhizobium*, las cuales forman nódulos en las raíces de la planta. Estas fijan el nitrógeno atmosférico convirtiéndolo en amoníaco y así queda disponible para ser absorbido.
- c) Pueden sintetizar aminoácidos y acumular cantidades elevadas de proteínas debido a la capacidad de fijar el nitrógeno de la atmósfera.(2)

El frijol común, es la especie más cultivada y conocida del género *Phaseolus* en México. El frijol es nativo de América, probablemente del centro de México y Guatemala. Brasil es el mayor productor de frijol en el mundo y México es el mayor productor en América Central y América del Norte con un promedio anual de 968 mil toneladas de grano y 1,800 000 ha cultivadas. Los rendimientos son de 550 kg./ha., aunque con riego se ha mejorado su cultivo obteniéndose hasta 1200 kg./ha.

En México y el resto de América Latina se cultivan fundamentalmente cuatro especies de *Phaseolus*: *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus* y *P. acutifolius*.. El consumo de frijol para algunas regiones constituye la fuente básica de proteínas aportando hasta el 30 % del total de la dieta y es también una buena fuente de algunas vitaminas como la tiamina y la niacina, hidratos de carbono y de minerales como el hierro y el calcio.

Existen múltiples variedades de frijol que se caracterizan por el tamaño, la forma, el color de la semilla y el crecimiento de la planta .(1)

Las variedades mexicanas de *P. vulgaris*, contienen aproximadamente de un 14 a 23 % de proteína cruda , mientras que en otros países se han encontrado variedades que poseen contenidos que oscilan de 19 a 26 % proteína cruda. Algunas características bromatológicas del grano maduro de estas variedades se presentan en el cuadro 1.1.(3)

Cuadro 1.1. Composición general de algunas leguminosas comestibles

Grano seco	Porción Comestible (%)	Energía (Kcal/por gramo)*	Proteína cruda. (%)	Lípidos (%)	Carbo hidratos (%)	Fibra Cruda (%)
Chícharo	100	345	22.0	2.0	64.0	4.7
Frijol negro	100	322	21.8	2.5	55.4	4.1
Alubia	100	330	20.3	2.8	58.6	4.0
Frijol Amarillo	100	337	14.2	1.7	67.1	4.5
Frijol blanco	100	312	22.4	2.7	52.0	3.9
Garbanzo	96	370	19.0	6.2	61.0	3.4
Haba	80	345	22.9	2.2	61.5	5.9
Lenteja	100	335	23.1	1.4	59.7	3.2
Haba blanca	100	331	25.4	1.3	57.1	4.9
Frijolillo	100	325	20.0	1.0	61.0	4.9

* Base seca

1.1.2. Sustancias tóxicas presentes en leguminosas

Las leguminosas, además de poseer esas cualidades nutricias, son fuente de tóxicos y sustancias antinutritivas naturales que se encuentran presentes en el reino vegetal en pequeñas cantidades, denominándose constituyentes secundarios de las plantas. El papel que desempeñan no está bien esclarecido; no obstante, el criterio más difundido es el de sugerir su posible rol como sistema de defensa contra sus depredadores como son: bacterias, hongos e insectos.

La severidad de sus efectos varían en el organismo humano, desde una simple irritación dérmica hasta provocar la muerte. Estos aspectos conjuntamente con la dureza del grano contemplan algunas de las más importantes líneas de investigación en la actualidad. Estas sustancias tóxicas pueden estar presentes en los granos de forma variable ya que su existencia y concentración están determinadas por las condiciones de humedad, variedad, parte de la planta y época de recolección; asimismo, durante el almacenamiento de los granos, pueden ocurrir cambios debido a la acción de agentes físicos y biológicos que alteran la presencia de estos compuestos (3)

Entre las sustancias tóxicas naturales que están presentes en las leguminosas se encuentran los glicósidos cianogénicos y según las condiciones de almacenamiento las aflatoxinas. Algunos de los compuestos tóxicos presentes en los granos tiene mayores implicaciones toxicológicas que otros, pudiendo limitar el consumo de la variedad que los contiene.(4)

Existen leguminosas que contienen glicósidos cianogénicos pero en cantidades que no llegan a ser tóxicas. Otros glicósidos son del tipo de las saponinas que son compuestos con propiedades tensoactivas. Ellas forman espuma en soluciones acuosas y provocan hemólisis de las células rojas de la sangre. Sin embargo, tiene efectos benéficos como la reducción del colesterol. Se encuentra en la soya, alfalfa, hojas de té, azúcar de remolacha y tienen sabor amargo.(5)

Los frijoles contienen en su fracción de carbohidratos algunos oligosacáridos responsables de la flatulencia, ellos no son tóxicos, pero el hombre carece de enzimas para digerirlos, por lo que llegan al colon donde

son fermentados por la flora generando gases (metano principalmente) y esto hace que su consumo pueda limitarse .(2,3)

1.2.LECTINAS

1.2.1. ANTECEDENTES

El estudio de las hemaglutininas se origina con Kobert y colaboradores, quienes investigaron la toxicidad de proteínas de ciertos miembros de Euforbiaceas y Leguminosas. Así Stillmark (1888) fue el primero en describir la aglutinación de eritrocitos de animal por extractos de semilla de ricino, proteína aislada de la semilla de *Ricinus communis* (Euforbiaceas) obtuvo pruebas demostrativas de que el material responsable de la aglutinación era una proteína, a la que llamó ricina. Mientras Hellin y Elfstrand descubrieron en otras semilla dos hemaglutininas similares; la abrina en la semilla *Abrus precattorius* y la croetina de la semilla *Croton tiglium*(Euforbiaceas). (6)

Paul Ehrlich, bacteriólogo alemán, descubrió que estas sustancias podían utilizarse para estudiar algunos problemas de inmunología en lugar de usar las toxinas bacterianas con la ayuda de ricina y de la abrina.

La primera lectina que se logró purificar fue la concanavalina A, procedente del jack bean(*Canavalina ensiformis*), que fue cristalizada en 1919 por James B. Summer. En 1936, Summer y Stacey F. Howell comprobaron, por una parte, que la adición de concanavalina A a una solución de glucógeno, carbohidrato que actúa como forma de reserva de

los azúcares en los organismos animales, provocaba la precipitación del glucógeno de la solución y por otra parte, que el azúcar de caña inhibía la aglutinación de los glóbulos rojos mediante concanavalina A. (7)

Summer y Howell establecieron la hipótesis de que la hemaglutinación provocada por la concanavalina A podría ser la consecuencia de una acción de la proteína con carbohidratos situados sobre la superficie de los glóbulos rojos.(8)

Esto fue confirmado en 1952 por Winifred Watkins y Walter Morgan, la adición de algunos azúcares sencillos podía inhibir o impedir la hemaglutinación provocada por lectinas. Al parecer, las moléculas de azúcar inhibitoras ocupan los lados de unión de las lectinas, interfiriendo de esta forma en el proceso de unión de la lectina a las unidades de azúcar situadas sobre los glóbulos rojos.(7)

El término de lectina deriva del latín Legere, escoger. Las lectinas son definidas como glicoproteínas aglutinantes de células. En contraste con los anticuerpos, los cuales tienen una estructura similar, las lectinas varían en composición, peso molecular, etc. Las lectinas son nombradas de acuerdo a su nombre trivial(Concanavalina A) o según su fuente(Lectina del frijol de soya, lectina del cacahuate, etc) o nombre botánico (lectina **Dolichos biflorus**)(8).

Se ha detectado la presencia de lectinas no solo en plantas (incluyendo a las bacterias) sino también en algunos invertebrados, por ejemplo caracoles. Vivian Teichberg descubrió la presencia de una lectina en la anguila eléctrica. No obstante, parece que las lectinas están más ampliamente distribuidas entre las plantas.(7)

1.2.2 .PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

No existe una estructura característica para todas las lectinas. Muchas de estas proteínas son relativamente ricas en ácido aspártico, serina y treonina que constituye hasta el 30% del contenido en aminoácidos, sin embargo son deficientes o totalmente excentos en aminoácidos que contienen grupos sulfuro. En contraste, existen lectinas como las extraídas de la papa y germen de trigo que son ricas en cisteína(ya que contienen 20 y 11.5 % del total de residuos de aminoácidos respectivamente).

A. Peso molecular y subunidades

El rango del peso molecular de las lectinas comprende de 36,000 para el germen de trigo hasta 265,000 para la lectina del frijol de lima. Algunas lectinas tienen una alta tendencia a la agregación. Aún bajo el almacenamiento y temperatura controlada, la lectina extraída de la Soya (Peso molecular 120,000) y posiblemente la lectina de cacahuete (Peso molecular 110,000) tienden a agregarse debido a su alto peso molecular.

Todas las lectinas están compuestas por subunidades, las cuales comunmente son de 2 ó 4. La disociación en subunidad puede ser irreversible como en el caso de la presencia de agentes detergentes como el dodecil sulfato de sodio ó reversible por ejemplo, utilizando clorhidrato de guanidino en la lectina del germen de trigo y fitohemaglutininas.

B.Requerimientos de iones.

Con algunas excepciones, la mayoría de las lectinas contienen metales y en algunos casos se presentan requerimientos de Mn^{2+} y/o Ca^{2+} para su actividad. El Mn^{2+} en las lectinas puede ser reemplazado por una variedad de metales de transición sin perder su actividad biológica, como fue demostrado para la Concanavalina A y para la lectina extraída de la Soya. El Ca^{2+} en la Concanavalina A puede ser reemplazado por Cd^{2+}

Los metales confieren un alto grado de estabilidad a la Concanavalina A protegiendo a la lectina contra la inactivación por calentamiento y por la hidrólisis por enzimas proteolíticas. El Ni^{2+} solo, protege a la Concanavalina A contra la proteólisis a pH 7 pero no a pH 8.2.(8)

C.Temperatura y pH

La mayoría de las aglutininas interactúan entre un pH de 4.5 a 11. A pH bajo la carga de la superficie celular es reducida y a pH alcalino hay una gran interacción celular. La temperatura está relacionada con la fluidez de la membrana y ésta necesita fluidez para que los receptores se muevan.

Las lectinas pueden presentar reacción en valores de 4 °C a 40°C. A 0°C la movilidad de los receptores es reducida. Los agentes que reducen la polaridad como el etilenglicol incrementan la especificidad de la lectina. Las lectinas que requieren iones metálicos son muy sensibles a las variaciones de pH. A pH bajos los iones metálicos son liberados y la lectina pierde su actividad.(9)

1.2.3.ESPECIFICIDAD

Los carbohidratos forman parte del determinante antigénico del grupo sanguíneo correspondiente. Las lectinas que son específicas para el grupo sanguíneo A, se inhibirán con N-acetil-galactosamina y sus derivados glicosídicos, el grupo B se inhibirán con galactosa, en cambio las lectinas que son específicas para el grupo sanguíneo O (H) serán inhibidas con L-fucosa. Muchas de las lectinas pueden ser inhibidas por carbohidratos sencillos, considerando así que son específicos para determinado azúcar. Los o-glicosilproteínas naturales son mejores inhibidores que los glicanos libres lo que se sugiere que se produce interacciones hidrofóbicas durante la interacción lectina carbohidrato.(10)

Cada molécula de una lectina posee al menos dos sitios de unión, cada uno de los cuales puede acoplarse a una molécula complementaria de azúcar o a varias unidades de azúcar pertenecientes a un oligosacárido. La lectina se une a los azúcares de las superficies celulares por medio de estos lados de unión. Teniendo a su disposición una serie de lectinas que difieren en su especificidad(por presentar lados de unión de formas diferentes). La aglutinina de soya también es específica para la N-acetilgalactosamina, pero de un forma menos restrictiva: la lectina de soya se une a la N-acetilgalactosamina tanto si las moléculas de azúcar están unidas en posición alfa como si lo están en posición beta, mientras que la lectina de frijol de lima sólo se une a las moléculas de N-acetilgalactosamina que están en posición alfa.

En las membranas celulares se encuentran ambas configuraciones, pero el azúcar determinante de la especificidad para el grupo sanguíneo A es la N-acetilgalactosamina con unión en posición alfa. La aglutinina de soya nos es específica de ningún grupo sanguíneo, por lo que además de unirse a la N-acetilgalactosamina, ésta se une a la galactosa y, en consecuencia, provoca la precipitación de glicoproteínas en solución, tales como el colágeno que presenta una galactosa en posición terminal.

La unión de la lectina con el azúcar es bastante débil. No provoca la formación de enlaces covalentes sino que es reversible, como la reacción de una enzima con su sustrato o de un anticuerpo.(11)

1.2.4. LOCALIZACIÓN DE LAS LECTINAS EN LAS PLANTAS

La fuente más rica de lectinas en numerosas plantas es la semilla, la cual puede comprender un porcentaje considerable de la materia seca; en el jack bean, la concaivalina A es de 3-4 % de la proteína.

De acuerdo con datos reportados, en los cotiledones y en el embrión si hay actividad de lectinas trabajando con lectina extraída de lenteja; *Lens culinaris*. La mayor cantidad de lectina esta asociada con los cotiledones; raíces y tallos tienen poca lectina y al estar desarrollándose se notó menos cantidad de lectina en los cotiledones(2 a 3 semanas de desarrollo).Numerosos investigadores han estudiado la aparición y desaparición de las lectinas durante el ciclo de vida de las plantas.(12)

Jones(13) trabajó con las lectinas obtenidas de semilla de *Maclura pomifera*. árbol conocido comúnmente como naranjo chino y clasificado actualmente como *Toxylon pommiferum*.

La actividad de hemaglutinina se detectó en las semillas a las primeras 10 semanas y se incrementó en un máximo hasta alcanzar la madurez en 15 semanas. La actividad comenzó a decrecer después de la germinación de las semillas, pero aún se detectaba a bajas concentraciones en la plántula hasta los 6 meses de edad. En las hojas no se encontró actividad, así como tampoco en la cutícula (cubierta) de las semillas. En todas las partes restantes de la semilla en mayor o menor grado se detectaron componentes aglutinantes. La mayor cantidad de lectinas se observó en el epicótilo (porción del eje de la plántula.) (14).

En las semillas más que en cualquier otro estado de vida de la planta, hay mayor cantidad de lectinas. La pérdida de actividad de las lectinas con la germinación quizás esté relacionada con la actividad proteolítica, al parecer hay una relación inversa entre la cantidad de polisacáridos y la actividad de las lectinas, puesto, que si se incrementan los carbohidratos, se reduce la actividad de la hemaglutinina.

Boyd sugiere que las lectinas, al ser inhibidas por los carbohidratos, pueden funcionar en el almacenamiento de éstos en las plantas. Es muy notorio que hay más lectinas encontradas en las semillas de leguminosas que en cualquier otra familia, y estas lectinas - asegura Jones- están principalmente involucradas con el almacenamiento de proteínas y no con el de carbohidratos.

El concepto básico del almacenamiento de carbohidratos quizá deba reconsiderarse debido al hecho de que la mayoría de las semillas de la familia de las leguminosas almacenan proteínas en un mayor grado que carbohidratos. Para el almacenamiento de carbohidratos se requiere un mecanismo de transporte e inmovilización, y las proteínas unidas a carbohidratos específicos están adaptados para esos propósitos.(15)

1.2.5.ACTIVIDADES BIOLÓGICAS.

Las lectinas presentan varios efectos sobre las células, los más estudiados han sido la aglutinación y estimulación mitogénica, sin embargo, también pueden presentar modificaciones en la actividad membranal de enzimas, bloqueo de la fertilización del óvulo por espermatozoides, toxicidad *in vivo* e *in vitro* y la inhibición del crecimiento de hongos.

A.Enlaces entre células.

Con objeto de actuar sobre las células, las lectinas deben formar enlaces sobre la superficie de éstas. Así la aglutinación puede ser tomada como evidencia del enlazamiento con las células, sin embargo, la falta de aglutinación no demuestra que los enlaces entre células no se hallan dado. Los enlaces son mejor demostrados con la adición de lectinas marcadas con isótopos radioactivos o con compuestos que son visibles bajo el microscopio como ferritina, peroxidasa, etc.

La estructura superficial para los enlaces lectina son de carbohidratos de glicoproteínas o glicolípidos que sobresalen de cada célula.

Esta conclusión se basa primeramente en el hecho de que los enlaces son inhibidos o impedidos por el azúcar que es específico para la lectina. El hecho de que el enlace lectina sea afectado por la modificación de la superficie del azúcar de la célula por glicosidasas, glicosiltransferasas y galactosa oxidasas provee evidencias de esta conclusión.(8)

B. Aglutinación.

La aglutinación es la manifestación más fácilmente detectable de la interacción de una lectina con las células, y hasta la fecha es la prueba más utilizada para revelar la presencia de lectinas. La aglutinación puede ser afectada por numerosos factores como se ilustra en el siguiente cuadro.

1.2.5. Factores que afectan a la aglutinación de células por las lectinas.

Propiedades de las lectinas

Número de sitios de enlace con sacaridos

Fuerza del enlace con sacáridos

Carga eléctrica

Peso molecular

Estructura química de la superficie del receptor

Propiedades de la superficie de la célula

Numero, accesibilidad y distribución de los sitios del receptor

Fluidez de la membrana

Carga eléctrica

Rigidez de la superficie

Componentes citoplásmicos

Membranas de proteínas periféricas

Abastecimientos de energía

Se define como aglutinación como la reacción antígeno-anticuerpo en la cual un antígeno sólido o en partículas forma un cristal con un anticuerpo soluble.

En la aglutinación invertida el anticuerpo está insertado a la partícula sólida y es aglutinado por un antígeno insoluble. Ésta se divide en dos tipos:

-Aglutinación directa; aglutinación de eritrocitos, microorganismos u otras partículas directamente por el anticuerpo del suero. En la técnica directa simple, un antígeno celular o de partículas insolubles es aglutinado directamente por el anticuerpo.

-Aglutinación indirecta o pasiva; la aglutinación de partículas o de eritrocitos a los que se les ha fijado un antígeno por medios químicos. Se refiere a la aglutinación de las células recubiertas de antígeno o a las partículas inertes que son portadoras pasivas de antígenos solubles.(16)

Las lectinas no sólo aglutinan a los glóbulos rojos sino también a otros tipos de células como son los linfocitos, fibroblastos, espermatozoides, bacterias y hongos(27)

C. Estimulación de linfocitos.

Uno de los efectos más dramáticos causados por la interacción de las lectinas con las células es la falta de división de linfocitos lo cual causa un estado de crecimiento y proliferación, fenómeno conocido como estimulación mitogénica. Los primeros agentes mitogénicos descritos fueron las fitohemaglutininas.

Para el año de 1970 fueron descubiertos tres agentes más; lectina extraída de *Phytolacca americana*, una lectina extraída de *Wistaria floribunda* y la Concanavalina A.

La estimulación de los linfocitos por las lectinas (u otros agentes mitogénicos) da como resultado la liberación de sustancias solubles con muchas implicaciones biológica incluyendo la linfocinesis, la inhibición del factor de migración de componentes macrofagos, linfotoxinas e interferones en ciertos casos se ha observado un aumento en la producción de inmunoglobulinas. A pesar de numerosos estudios el mecanismo que desencadena la reacción de estimulación mitogénica es aún desconocido.

Es hasta la fecha aceptado que el paso inicial o de arranque es la unión de la lectina a la superficie de la célula por medio de un azúcar específico. El enlace puede actuar modificando a la estructura y función de la membrana, dando como resultado la transmisión de la segunda señal, la cual inicia en el interior de la misma célula con una serie de cambios bioquímicos que culminan con el crecimiento y proliferación de la célula.

Hay lectinas que producen el efecto mitogénico, unas tienen habilidad de estimular solo a los linfocitos T y otras a los linfocitos B. A pesar de tener efectos distintos en los dos tipos de poblaciones celulares, las lectinas actúan en ambas células. Las fitohemaglutininas y Concanavalina A estimulan poblaciones de linfocitos T. El mitógeno de la fitolaca(PWN) estimula a ambos linfocitos T y B de diferentes especies de animales y el mitógeno hidrosoluble de Nocardia (NESM) activa preferentemente a las células B.

Hay otras lectinas mitogénicas como es la lectina del escarabajo *Allmyrina dichotoma*, que presenta actividad en linfocitos de ratón, rata y humano.(9)

D. Estimulación celular en plantas.

La concanavalina A y las fitohemaglutininas estimulan la germinación del polen *in vitro* como resultado de la reducción del periodo que antecede a la salida del polen hacia el tubo.

E. Inhibición del crecimiento de hongos

La lectina del germen de trigo se fija selectivamente a la hifas de *Thichoderma viride* inhibiendo el crecimiento de éstas medido por la incorporación de acetato radioactivo. De la misma forma la lectina de la papa actúa sobre la *Botrytis cinerea*. La inhibición por incorporación de precursores dentro de hifas de hongos por lectinas de diferentes especies parece resultar en la inhibición de la toma de nutrientes causando el abultamiento de la superficie de las hifas por las lectinas.

La inhibición del crecimiento por las lectinas es una prueba del efecto en la germinación de esporas fúngicas. La cual probablemente ocurra en las primeras etapas del proceso de germinación, después de que la espora se abulte pero poco antes de que los microorganismos sean detectables en el tubo.

Dicha inhibición es mejor expresada por la prolongación del periodo latente, el cual precede a la germinación. Una vez iniciada, el curso de la germinación parece ser normal y después de 18 horas de incubación el porcentaje de esporas de lectinas tratadas que lograron ser germinadas es casi el mismo que las que no fueron tratadas.

1.2.6.TOXICIDAD

A. Interacción con la mucosa intestinal

Jaffé y colaboradores propusieron que la toxicidad de las lectinas del frijol común podría ser atribuible a su habilidad para formar enlaces con receptores específicos de la superficie de células intestinales. Estudios posteriores comprobaron dicha teoría demostrando que lectinas de diferente selectividad por un carbohidrato se unían a varias regiones y diferentes tipos de células de la mucosa intestinal.(8)

Boldt y Banwell (17) en estudios con ratas observaron una mala absorción intestinal, y como consecuencia favorecía la colonización bacteriana en el intestino delgado. En cada caso observaron que el enlace era inhibido por la adición del oligosacárido apropiado, indicando que la interacción isolectina-microvellosidades de la membrana era mediado por la identificación del carbohidrato.

B.Adsorción de nutrientes.

Una de las consecuencias del daño de la mucosa intestinal por las lectinas es el grave deterioro en la adsorción de nutrientes a través de la pared intestinal.

Esto fue primeramente demostrado *in vivo* por Jaffé y Commejo(18) quienes mostraron que en el aislamiento de una porción de intestino extraído de animales que ingirieron frijoles crudos o lectinas purificadas, mostraban una disminución significativa en la proporción de glucosa que fue transportada a través de la pared intestinal. La habilidad de las lectinas para disminuir la capacidad de adsorción en el intestino delgado no se limita a carbohidratos.

Por ejemplo, la lectina extraída del chícharo (*Pisum arvense*) disminuye la absorción de L-histidina en el duodeno en ratones y la adición de lectinas de frijol a una dieta de caseína resulta en la pobre absorción de lípidos, nitrógeno y vitamina B₁₂ así como en la interferencia en el transporte de iones.

Se ha sugerido que el efecto de las lectinas sobre la capacidad de absorción en el intestino es una consecuencia de cambios sobre la permeabilidad intestinal. Al respecto se encontró que la incorporación de lectina del germen de soya al intestino delgado de ratas disminuye la permeabilidad de las moléculas de polietilenglicol(P.M.<600) pero aumentan la permeabilidad de las grandes moléculas de dextrano(P. M.3000). Por otro lado, la concanavalina A no presenta efectos en la permeabilidad, del polietilenglicol en el intestino, pero sí disminuye la permeabilidad del dextrano.

Estos resultados pueden ser relevantes con respecto a las reacciones alérgicas de los alimentos que contienen lectinas. Esta interferencia "no específica" con la absorción de nutrientes, es sin duda una de las razones por las cuales la proteína de las leguminosas crudas es pobremente utilizada.

Las lectinas pueden interactuar con enzimas hidrolizantes situadas en la región de borde en cepillo, las cuales juegan un papel importante en la digestión de proteínas y carbohidratos. Esta interacción provoca la inhibición de las peptidasas situadas en la región de borde en cepillo y enterocinasas, todos estos estudios realizados *in vitro*, sin embargo la razón por la cual las lectinas inhiben la actividad de estas enzimas aún no es bien comprendida.(8)

Banwell y colaboradores (17) demostraron la forma específica de unión de las fitohemaglutininas a microvellosidades de la región epitelial del intestino delgado utilizando inmunoglobulinas de cabra- anticonejo marcadas con fluoresceína. Los enlaces de lectinas fueron observados después de un consumo crónico de la dieta. Aplicando una dieta control de caseína se observó la pérdida de dichos enlaces en el intestino después de 48 horas, sin daños morfológicos a las microvellosidades de la mucosa intestinal, además de una ganancia en peso y crecimiento.

C.Colonias bacterianas

El crecimiento de bacterias coliformes ha sido observado en el intestino delgado de ratas y pollos en dietas de frijoles crudos o lectinas purificadas. La mucosa que cubre a la superficie del yeyuno, es el lugar donde se ha encontrado la más extensa población de bacterias con diferentes morfologías- los cocobacilos gram positivos y bastones gram negativos encontraron una alta acumulación de bacterias en el sitio de ruptura de microvellosidades del duodeno inducidos por una dieta de frijoles crudos. Estudios bacteriológicos realizados a los órganos internos demuestran que la muerte del animal por consumo de frijoles crudos esta acompañada de invasión bacteria.

Al respecto Wilson y colaboradores(1980) sugieren la siguiente posibilidad:

- a) Un deterioro inmunológico de la supresión del crecimiento de ciertas bacterias
- b) Una agregación de células bacterianas inducida por las lectinas
- c) Una eliminación violenta de bacterias competitivas.
- d) La presencia de más sustancias apropiadas para el desarrollo de dichas bacterias provoca la pobre absorción de nutrientes.(8)

Otra teoría explica que las lectinas debido a su característica de polivalencia se enlazan a sitios receptores de la región de borde en cepillo así como a las bacterias, causando un efecto de "pegado" de bacterias a la superficie del intestino.(19)

En contraste con los efectos tóxicos de las lectinas existen reportes que indican que hay otras lectinas que no sólo no son tóxicas para animales superiores, sino que pueden ser benéficas. Debido a que la fijación las bacterias a los tejidos y células es más complejo que a carbohidratos -específicos fimbrial y/o superficies a las que se adhieren las lectinas, dichos reportes indican que algunas lectinas de plantas pueden inhibir competitivamente la adhesión de bacterias a la pared intestinal.

Este bloqueo depende de la especificidad del enlace tanto para las lectinas como para las bacterias. Si ambas fueran similares ó iguales, el enlace de la bacteria al receptor glicosídico presente en la membrana epitelial puede ser impedido o reducido por la administración de una lectina apropiada a la dieta.

De esta forma, la infección del intestino por agentes patógenos es prevenida por la administración de una dieta natural.

El uso de GNA; una lectina manosa-específica del *Galanthus nivalis*, reduce significativamente la adherencia de manosa sensitiva proveniente de bacteria E. coli, a la pared del intestino sin observarse efectos tóxicos. El uso de GNA causa una inversión dramática de las reacciones causadas por fitohemaglutininas; induce el crecimiento de bacterias de esta forma se reduce el número de bacterias E.coli en el intestino delgado(20).

D.Internalización de las lectinas.

Existe la posibilidad de que las lectinas entren al sistema circulatorio ya sea por una digestión parcial o nula, ejerciendo reacciones tóxicas como la inhibición de síntesis de proteínas, hipersensibilidad local o sistemática del sistema inmune causando daños directamente sobre tejidos. Apoyando esta teoría, se ha demostrado que las lectinas pueden ser detectadas inmunológicamente con técnicas químicas en sangre de ratas que ingirieron frijoles crudos.(19)

E.Toxicidad aguda

El consumo de frijoles crudos puede causar diversos síntomas que pueden presentarse entre una a tres horas después de la ingestión. La sintomatología típica se caracteriza por náusea extrema, seguida del vómito, el cual puede ser muy severo.

Puede presentarse el desarrollo de diarrea más tarde (una hora o más horas), y algunas personas han reportado dolor abdominal. Algunas personas han sido hospitalizadas, pero su recuperación es rápida (3-4 horas después de los ataques).

El diagnóstico es realizado en base a la sintomatología, historia alimentaria y la exclusión de otros ataques causados por agentes envenenantes (como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, arsénico, mercurio).

El síndrome usualmente es causado por la ingestión de frijoles crudos y numerosas erupciones han sido asociadas con el incompleto cocimiento o cocimiento en cacerolas que no han alcanzado la suficiente temperatura interna para destruir las glicoproteínas de las lectinas.

Frecuencia de la enfermedad: Siete erupciones ocurrieron en Reino Unido durante 1976 y 1979, dos incidentes más fueron informados por Public Health Laboratory Services (PHLS), Colindale, en el verano de 1988. (21)

Capítulo 2. Material y Métodos

2.1 Diagrama de trabajo

En la Figura 2.1 se muestra el de diagrama del trabajo experimental para el presente proyecto y la descripción de los puntos más sobresalientes.

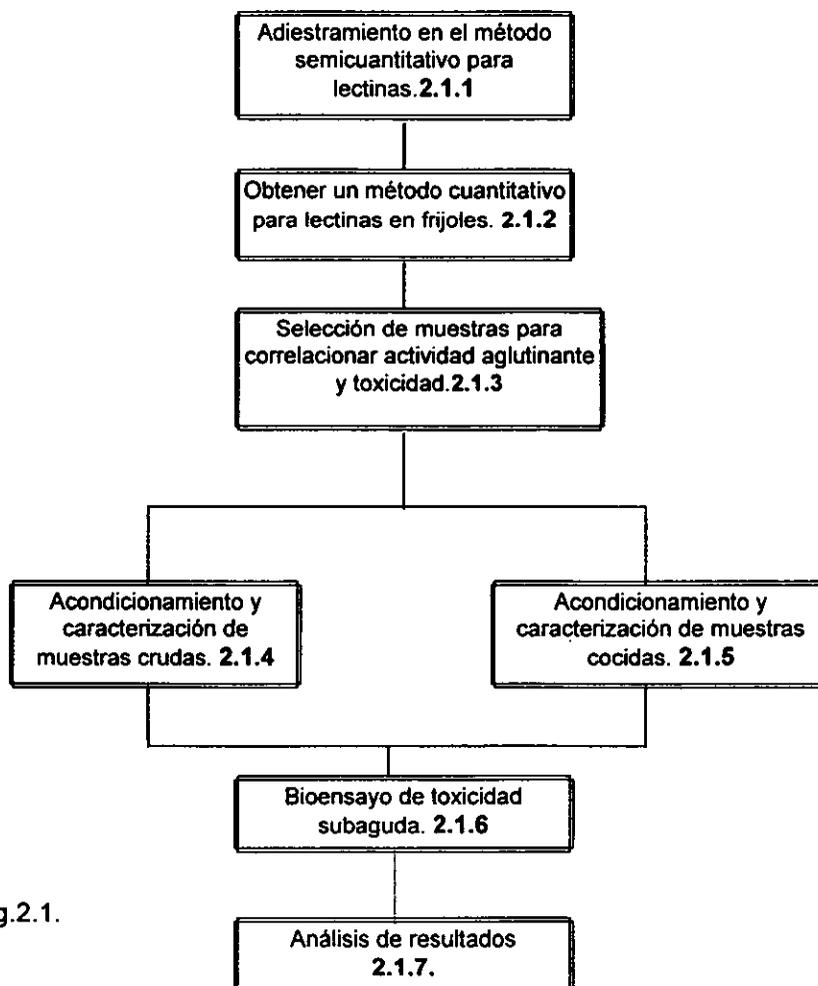


Fig.2.1.

2.1.1. ADIESTRAMIENTO EN EL MÉTODO SEMICUANTITATIVO

Consiste en la familiarización de la metodología *in vitro*, en especial en la preparación de los hematies (lavar, sensibilizar y ajustar la suspensión de eritrocitos) hasta obtener resultados reproducibles en muestras cuyo título ha sido determinado previamente. También en la familiarización de la visualización de la prueba positiva de aglutinación en las microplacas.

2.1.2. OBTENCIÓN DE MODIFICACIONES A UN MÉTODO CUANTITATIVO

Se trabajó con la lectina específica de *Phaseolus vulgaris* y con la ayuda de eritrocitos de hámster (mínimo cinco animales), que sean lo más homogéneo posible en cuanto a su sensibilidad a la aglutinación de sus respectivos hematies. Se realizaron las modificaciones y ajustes pertinentes para obtener el límite de detección y que ésta muestre la menor variación posible, además se expresará en base al contenido de proteína, por lo cual se realizó colateralmente la determinación de proteína en el extracto de lectinas a ensayar.

2.1.3. SELECCIÓN DE MUESTRAS

En la primera etapa del trabajo, se manejaron siete diferentes muestras de frijol *Phaseolus vulgaris* con el objeto de aplicar las modificaciones a la metodología semicuantitativa de lectinas y manejar datos cuantitativos. El siguiente cuadro se indican las variedades de frijol utilizadas y la adquisición de éstas.

Muestra	Procedencia
Frijol Negro Jamapa	Unidad de Posgrado. Universidad Autónoma de Chapingo
Frijol azufrado	Unidad de nutrición. Hospital pediátrico de Centro médico.
Frijol Negro San Luis	Mercado local de Peróte, Veracruz.
Frijol importado	Mercado local de D.F. México
Frijol Gordo	Municipio de Cuetzalán, Puebla.
Frijol Pinto	Departamento de granos, CONASUPO
Frijol Coloni	Aquismón, San Luis Potosí.

Posteriormente con base en la cuantificación de lectinas y disponibilidad de material biológico, se escogieron 3 muestras de frijol *Phaseolus vulgaris* para ser trabajados en pruebas posteriores.

2.1.4. MUESTRAS CRUDAS

Una vez que se cuenta con el material biológico seleccionado, una fracción de éste, se sometió a una molienda fina para obtener una harina de la semilla respectiva lo más homogénea posible. Se le realizó su análisis proximal y a la vez al extracto para lectinas se le determino el contenido de proteína, con el fin de obtener el dato cuantitativo para este tóxico por el método de aglutinación previamente definido.

2.1.5. MUESTRAS COCIDAS

Al mismo material seleccionado en el inciso anterior, se le sometió a dos tratamientos térmicos. Una vez que se realizó el tratamiento térmico, se acondicionó el material para obtener una harina lo más homogénea posible, y al igual que como a las crudas se le realizó el análisis proximal y la cuantificación de lectinas.

2.1.6.BIOENSAYO

Contando con el material crudo y cocido de las muestras de frijoles seleccionados y con la información del análisis proximal, se elaboraron dietas isoproteicas e isocaloricas de acuerdo al protocolo del AOAC para la determinación del índice de eficiencia proteínica, con ciertos ajuste para los fines que se pretende en el presente estudio.

El bioensayo, se realizó en ratas recién destetadas con mínimo seis animales por cada lote. Se utilizaron ratas macho y hembras para evaluar si esta variable mostraba alguna tendencia en el estudio. La cantidad de dieta a preparar fue para un periodo de 21 días. Se llevó un control tanto del alimento ingerido como del peso corporal de los animales, y al final del estudio o si se presentaba la mortalidad con anterioridad, se realizó la necropsia de los animales respectivos, para realizar un examen morfológico, e histopatológico en especial del tracto gastrointestinal.(22)

2.1.7.ANALISIS DE RESULTADOS

Con los resultados obtenidos del bioensayo de toxicidad como el contenido de lectinas por hemaglutinación tanto de muestras crudas como cocidas, se realizó un análisis estadístico, principalmente un análisis de varianza de una vía(ANOVA) y prueba de rango múltiple(Prueba de Dúncan), para buscar una posible correlación entre el efecto hemaglutinante y el carácter tóxico de las lectinas en las muestras estudiadas.(23)

2.2.DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LECTINAS

Fundamento:La detección de hemaglutininas se lleva a cabo con una técnica de diluciones seriadas en la cual se determina el punto final por una estimación visual de la aglutinación de los glóbulos rojos en estudio.(24)

Material /reactivos:

Agitador magnético con tacómetro marca THERMOLINE

Centrífuga para tubos marca DINAC

Incubadora marca Blue M

Espectrofotómetro COLEMAN Junior II-A

Sangre defibrinada y lavada

Solución anticoagulante: heparina.

Solución salina al 1%-Solución salina al 0.9%

Solución de pronasa al 0.2% en solución salina (a)

(a) Cuando se trabaja con sangre de cualquier roedor es conveniente trabajar con esta solución para el proceso de sensibilización.

Procedimiento

1.- Preparación del extracto

Moler finamente la muestra y suspender 0.1 gr en 10 ml de solución salina al 1%, se efectúa una extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m. a la temperatura ambiente.

Después de este tiempo se centrifuga al extracto a 1,400 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante

se filtra a través del filtro de vidrio y de ser necesario se puede lavar el residuo con más solución salina al 1%, para llevar el extracto filtrado al volumen inicial.

2.- Preparación de la sangre:

Una vez que se sangre al animal, la sangre se coloca en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante, agitar suavemente para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante.

La sangre con anticoagulante se transvasa a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina al 0.9 %. La relación sangre: solución salina es aproximadamente 1: 5. Se centrifuga a 1,500 r.p.m durante 10 minutos. Después del último lavado, se mide en el tubo de centrifuga de acuerdo a la cantidad de paquete de eritrocitos se diluyen al 4% para lo cual se agregan por cada 1.0 ml de glóbulos rojos 24 ml de sol. salina al 0.9%.

3) Sensibilización de los glóbulos rojos

A cada 10 ml de suspensión de glóbulos rojos al 4% agregarles 1 ml de solución de pronasa al 0.2 % y colocarlos en incubadora por espacio de 1 hora a 37°- C. Después del tiempo estipulado, centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante, dando además 3 lavados con solución salina 0.9%.

Después del último lavado se resuspende el paquete de glóbulos rojos al 5%, por lo cual cada 1.0 ml de paquete de eritrocitos se le adiciona 19 ml de solución salina 0.9%.

NOTA: Cuando se observa que la sangre tiene algunos coágulos, es necesario filtrar esta suspensión a través de un trozo de gasa.

4) Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos.

Se toma 1 ml de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizada y se agregan 4 ml de solución salina al 0.9%. Se lee en el espectrofotómetro a 620 nm, usando como blanco solución salina al 0.9%. La lectura que se debe obtener será de 25 ± 1 de transmitancia, en caso contrario se realizará la dilución necesaria.

5) Microtitulación

En las placas tipo V del microtiter, colocar en cada pozo de una hilera 50 μ L de sol. salina al 0.9% con el pipeteador de gota evitando tocar las paredes del pozo. A continuación llenar el microdilutor de 50 μ L por contacto con la superficie del extracto problema y se procede a realizar las diluciones sucesivas en la hilera escogida, introduciendo el microdilutor en el pozo rotándolo sin excesiva presión.

Por último con un pipetero de gota colocar en cada pozo 50 μ L de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y ajustados. Luego se rota la placa en forma circular y se lleva a la incubadora a 37°C durante 1 hora.

6) Lectura

Una vez transcurrido el tiempo estipulado se coloca la placa de plástico sobre el dispositivo de lectura. Se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba. Se reporta la máxima dilución que presente aglutinación.

NOTA: Cuando se trabaja con sangre de alta sensibilidad es conveniente realizar un mayor número de diluciones, por lo cual se pueden tomar hasta 3 hileras, realizando la serie de dilución en forma de culebra. (25)

2.3.DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR MÉTODO DE LOWRY.

Modificación del método de Lowry que da una respuesta fotométrica lineal.

Fundamento: Se basa en la reacción del fosfomolibdato, en solución alcalina, con los residuos de tirosil de las proteínas; se utiliza Cu^{2+} para incrementar la sensibilidad de la reacción. El color azul que se forma es bastante estable y tiene un máximo de absorbancia a 650nm.

Equipo y material

Baño de agua con termostato y homogenizador marca Grant, mod SE10

Pipeta automática Labsystems de 200-1000 μL

Pipeta automática Labsystems de 50-100 μL

Cronómetro

Espectrofotómetro Sequoia-Torner mod 340

Fotoceldas 19X105 nm.

Reactivos y soluciones

Reactivo de Folin-Ciocalteu(Sigma cat.2790)

Hidróxido de sodio 1.0N

Albúmina bovina (Sigma cat. A-3425)

Solución A, tartrato de sodio y potasio y carbonato de sodio(1)

Solución B, tartrato de sodio y potasio y $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2 \text{O}$ (2)

Solución C (3)

- (1) Solución A: se disuelven 2g de tartrato de sodio y potasio y 100 g de carbonato de sodio en 500 ml de solución 1N de hidróxido de sodio para después aforar a 1000 ml con agua.
- (2) Solución B: Se disuelven 2g de tartrato de sodio y potasio y 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en 90 ml de agua para aforar después a 100 ml con la solución 1N de hidróxido de sodio.
- (3) Solución C: Un volumen del reactivo de Folin-Ciocalteu se diluye en 15 volúmenes de agua. Esta solución se prepara diariamente y debe tener una normalidad entre 0.15 N y 0.18 N cuando se titula a pH10 con NaOH 1N. Si la acidez fuese mayor a 0.18 N deberá ser ajustada con NaOH. El tartrato de sodio y potasio se divide entre ambas soluciones A y B, para evitar una cristalización en B, además de mantener la concentración de tartrato necesaria.

Procedimiento

Para la curva estándar se utiliza una solución de albúmina bovina cuya concentración equivalga a 360 $\mu\text{g/ml}$ en agua destilada. La curva estándar va de 36-324 μg de proteína (albúmina bovina) donde se cumple la ley de Lambert -Beer. Y esta serie de tubos se trabajan en la misma forma que las muestras de proteína problema.

Los extractos de las muestras de frijol problema tanto crudos como procesados se preparan de la misma forma que se prepara el extracto para la determinación semicuantitativa de lectinas, descrito en el apartado 2.2.

Considerando que las semillas de frijol pueden contener hasta el 20% de proteína se utilizan únicamente 150 μL del extracto para trabajar dentro del rango de la ley Lambert-Beer.

Posteriormente las muestras problema se llevan a 1 ml con agua destilada, se colocan en tubos con su correspondiente etiqueta y se les adiciona 0.9 ml de la solución A con agitación para que se mezclen, a continuación se colocan en un baño de agua a 50 °C durante 10 minutos, después de los cuales se retiran del baño hasta que vuelvan a alcanzar la temperatura ambiente (21-25°C en aproximadamente 10 minutos) y puedan ser tratados con 0.1 ml de la solución B; los tubos se dejan a la temperatura ambiente al menos 10 minutos y después se tratan con 3 ml de la solución C, que es adicionada de manera rápida y con cierta presión para asegurar que se mezclen en cuestión de 1 a 2 segundos.

Los tubos son nuevamente colocados en el baño de agua a 50°C por 10 minutos y enfriados a temperatura ambiente, para finalmente proceder a la lectura de las absorbancias a 650 nm.(26)

TUBOS PARA LA CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE PROTEINA

Tubo	Solución estándar μl	Agua destilada μl	Concentración (μg)
B	0	1000	0
1	25	975	9
2	50	950	18
3	75	925	27
4	100	900	36
5	200	800	72
6	300	700	108
7	500	500	180
8	700	300	252
9	900	100	324

2.4. TRATAMIENTOS TÉRMICOS APLICADOS AL FRIJOL

Fundamento: Debido al carácter proteico de las lectinas, es posible la inactivación o inutilización de éstas por medio del calor. Esto se logra por la desnaturalización de las proteínas. (27)

La efectividad de los procesos térmicos aplicados a muestras biológicas depende de la combinación de temperatura, tiempo, humedad, etc. De acuerdo a la cantidad de lectinas encontradas en las diferentes muestras a estudiar se seleccionaron únicamente tres de ellas las cuales fueron sometidas a dos tratamientos de cocción con lo cual se intenta disminuir el contenido de hemaglutininas en las muestras vegetales.

2.4.1. Tratamiento de frijol: remojo en agua -cocción (T RC)

Equipo y material

Termómetro

Parrilla

Recipiente de aluminio grande

Reactivos

Cloruro de sodio

1 Kg de frijol crudo.

Procedimiento:

Pesar 1kg de frijol crudo y adicionar agua destilada, la relación agua:muestra es aproximadamente 1:3, dejar remojando por lo menos 5 horas. Transcurrido este tiempo hacer un recambio del agua destilada adicionándola hasta que cubra por completo la muestra. Dejar hervir vigorosamente durante 10 minutos.

Posteriormente las muestras cocidas son colocadas en charolas de aluminio para ser desecadas en la estufa a una temperatura de $55 \pm 2^\circ\text{C}$ para que después pudiera obtenerse una harina lo más homogénea posible.

Nota: Debido que era necesario mantener una temperatura de 95°C , se adicionó cloruro de sodio al agua destilada en un 5%, para aumentar el punto de ebullición, debido a la altitud de la Ciudad de México.

2.4.2. Tratamiento de frijol en autoclave(TA)

Equipo y material

Balanza

Autoclave vertical

Cronómetro

Vasos de precipitado de 1 L

Papel aluminio

Reactivos

Agua destilada

300 g de frijol crudo.

Procedimiento

Se pesan 300 g de frijol crudo y se vacía en el vaso de precipitado, se agrega agua destilada, la relación muestra: agua es aproximadamente 1:3. Se colocan los vasos de precipitado en el autoclave y se lleva a hasta una presión equivalente a una temperatura de 121°C durante 30 minutos.

Al término de este tiempo las muestras son colocadas en charolas de aluminio para ser desecadas en la estufa a una temperatura de $55 \pm 2^\circ\text{C}$ para que posteriormente pueda obtenerse una harina lo más homogénea posible.

2.5. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

Fundamento: El análisis proximal o sistema analítico Weende, se desarrollo en Alemania hace más de cien años, en la estación experimental que lleva su nombre. Este sistema se ha criticado mucho, pero hasta la fecha nadie ha desarrollado otro mejor que sea tan práctico y aceptable.(28)

La determinación de humedad, cenizas, grasa, fibra cruda, proteína y carbohidratos por diferencia se llevó a cabo de acuerdo al método oficial del A.O.A.C.(29)

2.6. PRUEBA BIOLÓGICA DE REP

El grado de crecimiento de un animal bajo condiciones bien definidas, provee un cambio relativamente simple para evaluar el valor nutritivo de una proteína. Si la dieta a probar es insuficiente en uno a más aminoácidos, el crecimiento puede ser reducido o detenido. Así el crecimiento es un índice sensible a la disponibilidad de los aminoácidos y pueden ser usados para evaluar el efecto global de una dieta proteínica.(29,30)

Fundamento: El incremento de peso de ratas recién destetadas, alimentadas con una dieta proteínica bajo condiciones bien establecidas provee una medida confiable de valor nutricional.(31)

Procedimiento

- **Preparación de dietas**

Para llevar a cabo la evaluación nutricional de una fuente de proteína, se necesita elaborar una dieta que sea isoproteínica e isocalórica, con respecto a una dieta de referencia (generalmente CASEINA) y que además la única variable sea precisamente la proteína, por lo que es de suma importancia contar con el análisis proximal de la fuente de proteína a evaluar, para poder ajustarla a la dieta de referencia. (32,33)

Es importante señalar que las dietas se prepararon considerando un 15 % de proteína. Además fueron suplementadas con un 1% de pancreatina para todas las dietas para contrarrestar el efecto que causan los inhibidores de tripsina y un 0.4% de metionina para todas las dietas excepto para la dieta de referencia.

La proporción de los materiales que fueron utilizados para la preparación de las dietas tanto crudas como cocidas de las 3 variedades se muestran en los cuadros 2.6.2., 2.6.3, y 2.6.4, así como para la dieta de referencia en el cuadro 2.6.1, quedando de la siguiente manera:

Cuadro 2.6.1. Dieta de Caseína para la prueba biológica REP

Componentes	Caseína
Caseína (g)	16.77
Aceite(g)	7.96
Minerales(g)	4.90
Vitaminas(g)	1.0
Celulosa(g)	1.0
Agua(mL)	4.49
Carbohidratos(g)	63.88
Metionina(g)	-
Pancreatina(g)	1.0

Cuadro 2.6.2 Dieta preparada con frijol Pinto crudo y cocido para la prueba biológica REP

Componentes	Crudo	cocido (T R C) ¹	cocido (T A) ²
Harina de frijol(g)	79.07	83.61	83.89
Aceite(g)	7.24	7.71	7.36
Minerales(g)	2.24	2.08	-
Vitaminas(g)	1.0	1.0	1.0
Celulosa(g)	-	-	-
Agua(mL)	-	-	-
Carbohidratos(g)	9.05	6.27	4.27
Metionina(g)	0.4	0.4	0.4
Pancreatina(g)	1.0	1.0	1.0

1. Tratamiento remojo y cocción

2. Tratamiento en autoclave

Cuadro 2.6.3. Dieta preparada con frijol Negro Jamapa crudo y cocido para la prueba biológica REP

Componentes	crudo	cocido (T R C) ¹	cocido (T A) ²
Harina de frijol(g)	58.32	63.67	73.78
Aceite(g)	7.25	7.79	7.23
Minerales(g)	2.42	0.81	2.33
Vitaminas(g)	1.0	1.0	1.0
Celulosa(g)	-	-	-
Agua(mL)	-	0.85	-
Carbohidratos(g)	29.17	24.47	14.26
Metionina(g)	0.4	0.4	0.4
Pancreatina(g)	1.0	1.0	1.0

1. Tratamiento remojo y cocción

2. Tratamiento en autoclave

Cuadro 2.6.4. Dieta preparada con frijol Gordo crudo y cocido para la prueba biológica REP

Componentes	crudo	cocido (T R C) ¹	cocido (T A) ²
Harina de frijol(g)	62.4	63.96	59.74
Aceite(g)	6.6	7.72	7.62
Minerales(g)	241	0.39	2.36
Vitaminas(g)	1	1.0	1.0
Celulosa(g)	-	-	-
Agua(mL)	-	-	-
Carbohidratos(g)	27.19	25.53	27.88
Metionina(g)	0.4	0.4	0.4
Pancreatina(g)	1	1	1

1. Tratamiento remojo y cocción

2. Tratamiento en autoclave

• **Animales**

Se utilizaron ratas recién destetadas(21-23 días de nacidas) de ambos sexos, que fueron colocadas de acuerdo a la distribución de "culebra japonesa", quedando tres ratas macho y tres hembras por cada lote. Un grupo debe ser alimentado con una dieta de referencia(caseína) y otro(s) con una dieta que contiene la(s) proteína(s) de prueba y deben ser isocalóricas entre sí.

Además se llevo un registro del comportamiento que se observaba día a día para cada una de las ratas en estudio. Las observaciones se registraban en una tabla como la que se muestra en la figura 2.6.

Toxicidad aguda: _____ Fecha: _____

Especie: _____ Peso Inicial _____ Peso final : _____

Sexo: _____

Decripción: _____

—

Dia	Lordosis	Xifosis	Ataxia	Piloerección	Erección caudal	Agresividad	Aletargamiento	Exitación	Disnea	Cianosis
Inicio										
1º										
3º										
6º										
9º										

Observaciones:

√= Si se observo

X= no se observó

Fig.2.6.

- **Desarrollo de la prueba**

El peso de cada rata es registrado al inicio del experimento y todos los animales deben de tener libre acceso al alimento durante el periodo de prueba y agua "ad libitum". Los animales fueron pesados tres veces a la semana y el último día de prueba. Al final del experimento los valores de REP tanto para la proteína de referencia como para las proteínas de prueba se calculan como:

$$\text{REP} = \frac{\text{Incremento de peso(g)}}{\text{Proteína consumida(g)}} = \frac{P_f - P_i}{(\sum AI) * (F)}$$

Donde:

F= Factor correspondiente al contenido de proteína en la dieta, expresado en fracción decimal.

$\sum AI$ = Sumatoria del alimento ingerido durante el periodo de estudio.

2.7. Prueba biológica de digestibilidad

Fundamento: La digestibilidad de las proteínas se considera como un indicador inicial de su calidad y es definida como la cantidad de los aminoácidos constituyentes de las proteínas, para ser absorbidos por el organismo de prueba.(31)

Procedimiento

La recolección de heces se inició al quinceavo día de estudio hasta el término de éste. Las heces de cada rata se recibían en un frasco

de vidrio y se metieron en una estufa de secado a una temperatura de 50 ± 5 °C(para evitar el crecimiento de hongos en las heces).Una vez que fueron secadas las heces, se pesaron y molieron en mortero.

Posteriormente a las heces se les determinó el contenido de nitrógeno, lo mismo que a las dietas evaluadas y esta forma obtener el nitrógeno fecal y nitrógeno ingerido.

$$D = \frac{N \text{ absorbido}}{Ni} = \frac{(Ni - Nf) * 100}{N \text{ ingerido}}$$

Donde:

D=Digestibilidad

Ni= Nitrógeno ingerido

Nf= Nitrógeno fecal

2.8.Estudio histopatológico

Al final del estudio se sacrifico el animal o si la muerte se presentó antes, se extrajeron dos porciones del intestino(yeyuno e ileon) además del hígado; órganos que son principalmente dañados por el consumo de lectinas. Los cuales eran colocados en un frasco de plástico previamente etiquetados que contenían una solución de formaldehido al 10%. Las observaciones fueron realizadas por el Departamento de Patología, de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia.(34)

2.9. Estudio estadístico.

Se realizó un análisis estadístico para correlacionar los resultados de toxicidad *in vivo* y el contenido de lectinas en muestras tanto crudas como cocidas.

Se aplicó un análisis de varianza de una vía y la prueba de rango múltiple (Prueba de Duncan) ambas con un nivel de significancia de 95%.

(23)

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1. Análisis bromatológico

Los cuadros 3.1.1., 3.1.2., y 3.1.3., de la sección 3.1 muestran los resultados obtenidos de la determinación de humedad, cenizas, grasa, fibra, proteína y carbohidratos, respectivamente. Datos que eran necesarios para poder llevar a cabo la evaluación nutricional de las muestras de frijol estudiadas y poderlas ajustar a la dieta de referencia(caseína) en el bioensayo de toxicidad subaguda.

La caracterización de las muestras cocidas (ambos tratamientos) mostró en términos generales, una disminución del contenido de proteína al aplicar alguno de los tratamientos térmicos como consecuencia de la desnaturalización de las proteínas por efecto del calor, que se vio afectada de acuerdo a la estabilidad de cada proteína. El contenido de lípidos también se vio disminuido por el calor, siendo las muestras tratadas con condiciones (T RC) las que disminuyeron en mayor proporción.

Por otro lado, el contenido de cenizas fue mayor para todas las muestras que se les aplicó las condiciones (T RC) mientras que para las muestras con condiciones de autoclave(T A) mostraron un % de cenizas ligeramente mayor o igual al de las muestras crudas.

Cuadro 3.1.1. Muestra de Frijol Negro Jamapa

Determinación	F.Negro J. crudo	F.Negro J.(T RC) ¹	F. Negro J.(TA) ²
% Humedad	7.82	6.50	8.07
% Cenizas	4.42	6.57	3.62
% Grasa	1.29	0.33	1.04
% Fibra	4.0	5.7	7.39
% Proteína	25.72	23.56	20.33
%Carbohidratos	56.75	57.33	59.55

1. Tratamiento remojo y cocción
2. Tratamiento en autoclave

Cuadro 3.1.2. Muestra de Frijol Pinto

Determinación	F.Pinto crudo	F.Pinto (T R C) ¹	F. Pinto (T A) ²
% Humedad	10.45	6.50	6.97
% Cenizas	3.49	6.57	3.48
% Grasa	0.96	0.34	0.76
% Fibra	5.37	5.70	4.13
% Proteína	18.97	23.56	17.88
%Carbohidratos	60.76	57.33	66.78

- 1.Tratamiento remojo y cocción
- 2.Tratamiento en autoclave

Cuadro 3.1.3. Muestra de Frijol Gordo

Determinación	F.Gordo crudo	F.Gordo (T R C) ¹	F. Gordo (T A) ²
% Humedad	10.09	11.72	11.11
% Cenizas	4.14	7.20	4.41
% Grasa	2.23	0.44	0.63
% Fibra	4.58	5.14	7.92
% Proteína	23.92	23.45	25.19
%Carbohidratos	55.04	52.04	50.74

1. Tratamiento remojo y cocción

2. Tratamiento en autoclave

3.2. Contenido de lectinas y proteína soluble en muestras de frijol

El cuadro 3.2.1 muestra los resultados resumidos del título de hemaglutinación de los eritrocitos de diferentes individuos de la misma especie (hamsters) utilizando la lectina purificada de *Phaseolus vulgaris* (PHA-P Sigma #L-8754) comprobándose que no hay diferencia significativa al trabajar con los eritrocitos de diferentes individuos de esa misma especie. De esta forma ésta variable no afecta a los resultados posteriores.

Las modificaciones realizadas a la metodología semicuantitativa de lectinas consistieron en lo siguiente:

- cambio del volumen de microtitulación, para lo cual se colocaban 100 μL de solución salina en cada pozo y el volumen final de titulación era de 150 μL . De tal forma que al llenar el microdilutor y llevarlo al siguiente pozo se estaba realizando una dilución 1:3.
- limpieza cuidadosa del cuello del microdilutor con papel absorbente, de tal forma que se asegurara que se tomaban exactamente 50 μL .
- se realizaron las diluciones necesarias para obtener el título visual no mayor a 15 en las placas tipo V del microtiter, ya que títulos de microtitulación más grandes dificultaban la reproducibilidad de los resultados.
- se definió la unidad de hemoaglutinación (U H) para manejar datos cuantitativos , que en el presente estudio es equivalente a 50 mg de lectina purificada de *Phaseolus vulgaris* (PHA-P Sigma # L-8754).

La Fig 3.2 muestra la Curva Patrón que fue utilizada para la determinación de proteína por método de Lowry. La r^2 obtenida indica una buena correlación lineal de los datos manejados.

Los cuadros 3.2.2 y 3.2.3 se presentan los resultados de la fracción protéica (albúminas y globulinas) en mg por gramo de muestra.

Con la obtención del contenido proteico por mg de muestra se pudo expresar la concentración de lectinas en UH por mg de proteína en los cuadros 3.2.4. al 3.2.6.

La cuantificación de lectinas de las diferentes muestras estudiadas permitió visualizar el contenido de hemaglutininas que se encontraban en las siete variedades de frijol estudiadas para posteriormente hacer una selección de éstas para trabajar únicamente con tres de ellas.

Dicha clasificación se hizo considerando la disponibilidad del material mismo y su contenido de lectinas, de esta forma se trabajo con el frijol Gordo que tiene el mayor contenido de lectinas(103 312 UH), frijol Pinto que se encuentra con valores intermedios y frijol Negro Jamapa que tiene una concentración relativamente baja del tóxico en estudio.

La determinación de la fracción proteica(albúminas y globulinas) aplicando los tratamientos (T R C) y (T A) por el método de Lowry se muestra en el cuadro 3.2.3, los resultados señalan que el tratamiento (T R C) disminuyó de manera significativa el contenido de albúminas y globulinas pero fue menos severo que el tratamiento (T A) que causó una modificación importante en el grado de solubilidad de la fracción proteica determinándose valores sumamente bajos menores a 1 mg de albúminas y globulinas por gramo de muestra.

En general, la aplicación de calor a la fracción proteica de las muestras, disminuyó el contenido de albúminas y globulinas, que es donde se encuentran las glicoproteínas, como consecuencia de la desnaturalización de las proteínas por el efecto del calor.

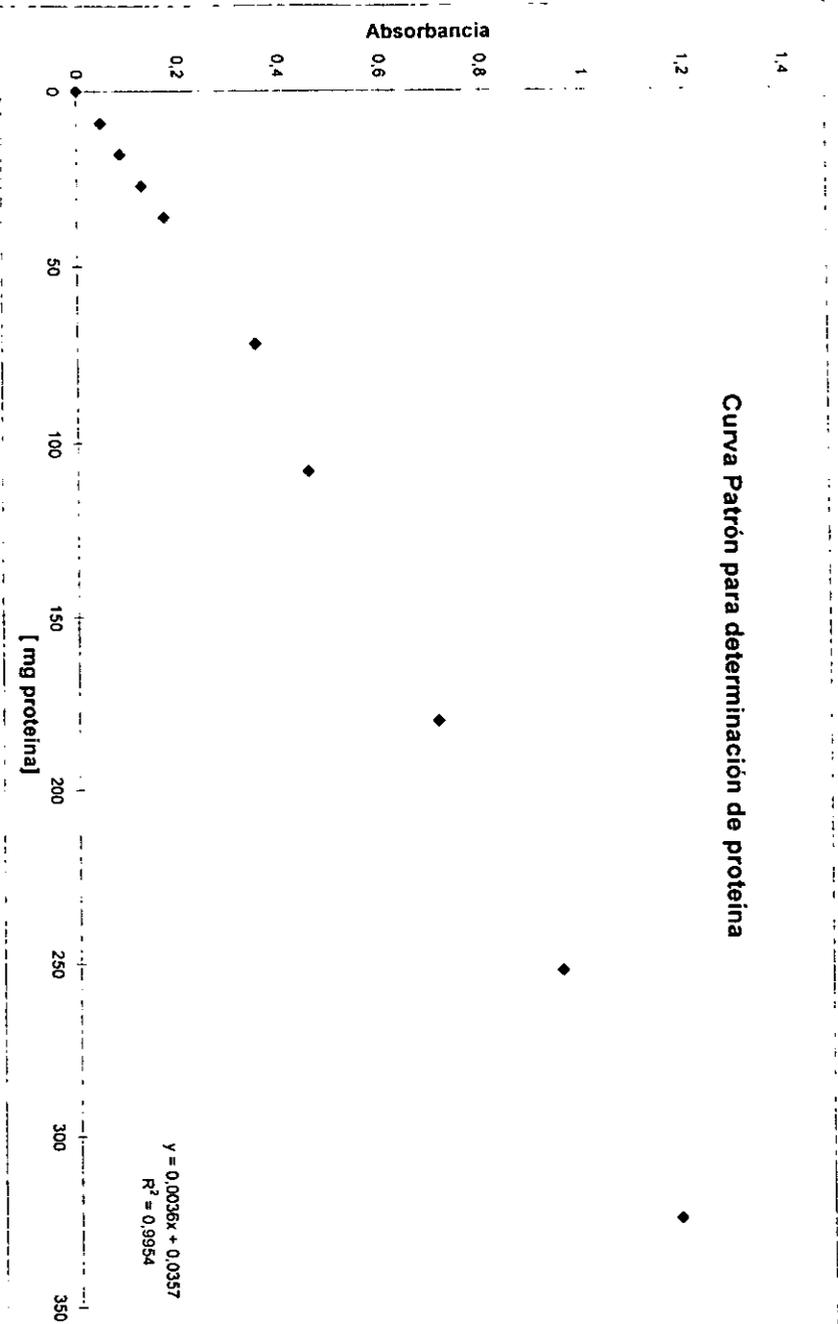
Por otro lado estudios de hidrolisis enzimática *in vitro* sugieren que el calentamiento de la globulina G1 es rápidamente hidrolizada por enzimas proteolíticas. Lo mismo, que el calentamiento de la globulina G2 y glutelinas que fueron hidrolizadas más rápidamente que en su forma nativa.(35)

Los cuadros 3.2.5. y 3.2.6. muestran los resultados del contenido de lectinas utilizando los tratamientos (T R C) y (T A) respectivamente. Se obtuvo el título de máxima dilución donde se observa prueba positiva de aglutinación, así como el contenido de lectinas expresado en UH por gramo de muestra.

La aplicación del tratamiento(T R C) aunque logró disminuir la concentración de lectinas no fue tan severo, dejando un remanente de hasta 1 000 UH, como es el caso de la lectina del Frijol Pinto. Por otro lado el tratamiento(TA) es decir, con condiciones de autoclave, disminuyó de manera drástica el contenido de lectinas(ver cuadro3.2.6.), pues en ninguna de las tres muestras estudiadas la concentración de lectinas expresada en UH fue mayor a 1 UH, observación que no se pudo haber diferenciado si se contara únicamente con el título de la máxima dilución.

Se observó que la aplicación de calor a las muestras biológicas disminuyó el contenido de la fracción proteica; las muestras de frijol crudo fueron las que contenían el mayor contenido de albúminas y globulinas, y después de ser sometidas a los tratamientos TRC y TA disminuyó de manera importante el contenido de albúminas y globulinas.

Curva Patrón para determinación de proteína



Cuadro 3.2.1. Contenido semicuantitativo de lectinas utilizando lectina purificada de *Phaseolus vulgaris*

No. hamster	Título ¹ ± D.S
1	5.0 ± 0.00
2	5.2 ± 0.41
3	4.7 ± 0.71
4	5.2 ± 0.45
Promedio global ±C.V	4.9 C.V.=13.17

¹ Máxima dilución donde se muestra prueba positiva de aglutinación. Desviación estandar donde n=5. (Dilución 1:100)

Cuadro 3.2.2. Contenido de proteína en el extracto salino de los frijoles crudos evaluados.

Muestra cruda	Concentración ¹
Frijol Negro Jamapa	153 ± 4.0
Frijol Azufrado	114 ± 1.0
Frijol Negro San Luis	85 ± 4.9
Frijol Negro importado	94 ± 7.8
Frijol gordo	115 ± 1.7
Frijol pinto	125 ± 4.5
Frijol coloni	93 ± 7.8

¹ Concentración de proteína expresado en mg/g muestra

Cuadro 3.2.3 .Contenido de proteína en el extracto salino de los frijoles procesados

Muestra cocida	Contenido ¹
Frijol Negro Jamapa(TRC) ^a	4.92
Frijol Pinto(TRC) ^a	4.08
Frijol Gordo(TRC) ^a	6.32
Frijol Negro Jamapa(TA) ^b	1.01
Frijol Pinto (TA) ^b	1.23
Frijol Gordo (TA) ^b	1.78

¹ Contenido de proteína expresado en mg/ g de muestra.

a. Tratamiento remojo cocción

b. Tratamiento en autoclave

Cuadro 3.2.4. Contenidos de lectinas en las muestras de frijoles crudos evaluados

Muestra	Título ¹ ± D.S.	Concentración ²	UH / mg proteína
Frijol Negro Jamapa	6.7 ± 0.57 ^a	1.7	0.01
Frijol Azufrado	4.8 ± 0.55	0.19	1.6 e-3
Frijol Negro San Luis	7.4 ± 0.55	1.7	0.02
Frijol Negro importado	7.6 ± 0.52	5.25	0.05
Frijol gordo	17 ± 0.52	103 312	898.3
Frijol pinto	11 ± 0.74	141.7	1.13
frijol coloni	15 ± 1.1	11 479	123.4

¹ Título promedio de las muestras. Desviación estandar donde n=5. (Dilución 1:100)

² Concentración de lectinas expresado en unidades hemoaglutinantes(UH) / g muestra

Cuadro 3.2.5. Contenido de lectinas en las muestras de frijoles procesados con el tratamiento(T RC)

Muestra	Título ¹ ±D.S.	Concentracion ²	UH / mg proteína
Frijol Negro	10.7 ± 1.2 ^a	1.41	0.29
Frijol Pinto	16.8 ± 0.84 ^a	1 033	253
Frijol Gordo	10 ± 1.22 ^b	47.2	7.47

¹Título promedio de las muestras y desviación estandar donde n=5 .

a Sin dilución b Dilución 1:100

²Concentración de lectinas expresado en unidades hemoaglutinantes(UH)/ g muestra

Cuadro 3.2.6.Contenido de lectinas en las muestras de frijoles procesados con el tratamiento (TA)

Muestra	Título ¹ ±D.S.	Concentración ²	UH / mg proteína
Frijol Negro Jamapa	5.66 ± 0.81	0.005	4.95 e-3
Frijol Pinto	6.16 ± 0.4	0.005	4.06 e-3
Frijol Gordo	1 ± 0.0	2.4 e-5	1.34 e-5

¹Título promedio de las muestras y desviación estandar donde n=5. (Sin dilución)

²Concentración de lectinas expresado en unidades hemoaglutinantes(UH) / g muestra

3.3.Evaluación biológica

Las dietas elaboradas con frijoles crudos se elaboraron para una duración de aproximadamente 2 semanas, sin embargo, la mortalidad de los animales se presentó en los primeros días de estudio, como puede verse en las figuras 3.3.1.,3.3.2. y 3.3.3.

Las dietas de frijol Gordo y Pinto, que eran las de mayor contenido en lectinas(ver cuadro 3.2.4) fueron también las más dañinas ya que causaron la mortalidad de los animales desde el primer día y para el cuarto día ya se tenía el 100% de mortalidad. Mientras que el frijol Negro Jamapa crudo mostró sus efectos hasta el segundo día y el 100 % de mortalidad hasta el sexto día.

De igual forma, las dietas preparadas con frijoles cocidos por el tratamiento (TR C)--que dejó un contenido de lectinas aún alto- causó la muerte desde los primeros días de estudio y la mortalidad del 100% del lote al sexto día, para el caso del frijol Pinto y frijol Gordo representados en las figuras 3.3.4. y 3.3.5. Excepto para la dieta elaborada con frijol Negro Jamapa, figura 3.3.6., que tuvo el contenido más bajo de lectinas(1 UH)aunque no causó la mortalidad de todo el lote, produjo un daño significativo (33% de mortalidad).

De las observaciones obtenidas del comportamiento de los animales, registrados como se ilustra en la figura 2.6, en general, se encontró que los animales sufrían de aletargamiento, y sólo en algunos casos presentaban piloerección.

Los animales que consumieron frijoles tratados en autoclave(T A) que contenían el menor contenido de lectinas(menos de 1 UH) se adaptaron a la dieta administrada durante el periodo de estudio y no presentaron mortalidad. Por lo tanto, fue a éstos así como a los animales del lote de frijol Negro Jamapa(T R C) a los que se les pudo medir el REP y digestibilidad que se explican en los siguientes párrafos.

Los cuadros 3.4.1, al 3.4.5 muestran el balance de nitrógeno, ganancia de peso y consumo de alimento obtenidos durante un periodo de 21 días. Del cuadro 3.4.5. fue necesario eliminar dos datos debido a la alta variabilidad con respecto a los resultados del mismo grupo, lo mismo que en el cuadro 3.4.2, en el cual, se eliminó un dato.

Las tablas 3.4.6., 3.4.7., 3.4.8., 3.4.9. y 3.4.10., muestran los índices biológicos más relevantes como son la digestibilidad, REP y peso porcentual del hígado, en forma resumida y concreta los resultados del bioensayo respectivo.

La determinación de digestibilidad de la dieta de referencia mostró que la fuente de proteína fue bien asimilada por los animales en experimentación, lo cual era de esperarse debido a la fuente proteica. Mientras que los valores de digestibilidad de las dietas evaluadas fluctuaron entre 56 y 60 , resultados que son similares a los reportados por la literatura por tratarse de una proteína de origen vegetal, excepto en el caso de la dieta de frijol Negro Jamapa (T R C) que mostró el valor más bajo de digestibilidad.

El REP de la dieta de referencia determinado fue de 2.42 Por otro lado, las determinaciones de relación de eficiencia proteica para las dietas de frijol (T A) mostraron valores cercanos al REP de referencia, lo

cual indica que después de ser procesadas las muestras se eliminó de forma significativa los factores tóxicos y quedo una proteína de buena calidad que mantiene el crecimiento de los animales en forma similar a la dieta de referencia.

Sin embargo para la dieta de frijol Negro Jamapa (T R C) el REP determinado al igual que la digestibilidad fueron bajos, recordando que fue en esta dieta en la cual el 33 % de los animales murieron antes de concluir el estudio.

Es probable, que los efectos tóxicos asociados con la ingestión de frijoles crudos, se deban a la interacción directa de las lectinas con la mucosa intestinal como ha sido demostrado por varios autores como Pusztai, Sotelo et al., etc.

Estudios similares del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) señalan que los frijoles crudos disminuyen el crecimiento de ratas y causaban la muerte, cuando se incluían en la dieta. (17)Estos efectos tóxicos eran eliminados por cocción de los frijoles a 120°C durante 30min como ha sido demostrado por varios autores.

Figura 3.3.1. Mortalidad de ratas evaluadas con dieta de frijol Gordo crudo

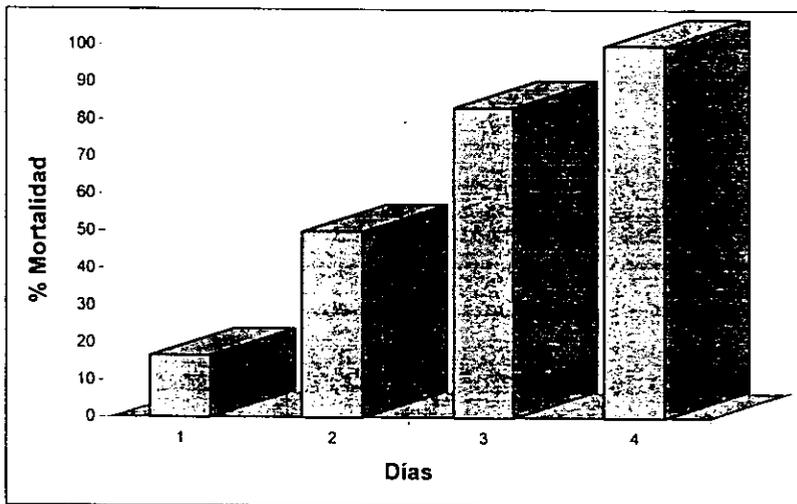


Figura 3.3.2. Mortalidad de ratas evaluadas con dieta de frijol Pinto crudo

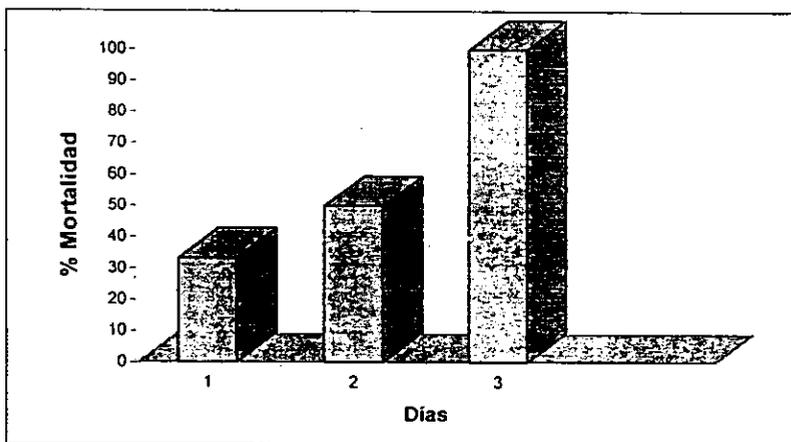


Figura 3.3.3. Mortalidad de ratas evaluadas con dieta de frijol Negro Jamapa crudo

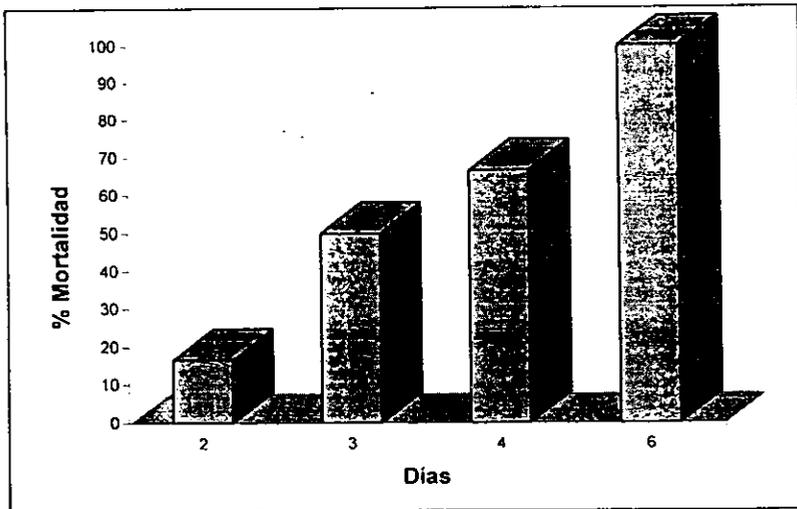


Figura 3.3.4. Mortalidad de ratas evaluadas con dieta de frijol Gordo cocido (TRC)

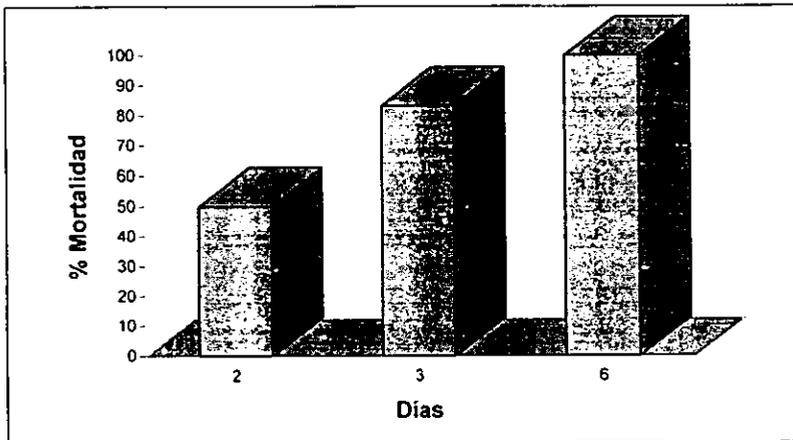


Figura 3.3.5. Mortalidad de ratas evaluadas con dieta de frijol Pinto cocido (TRC)

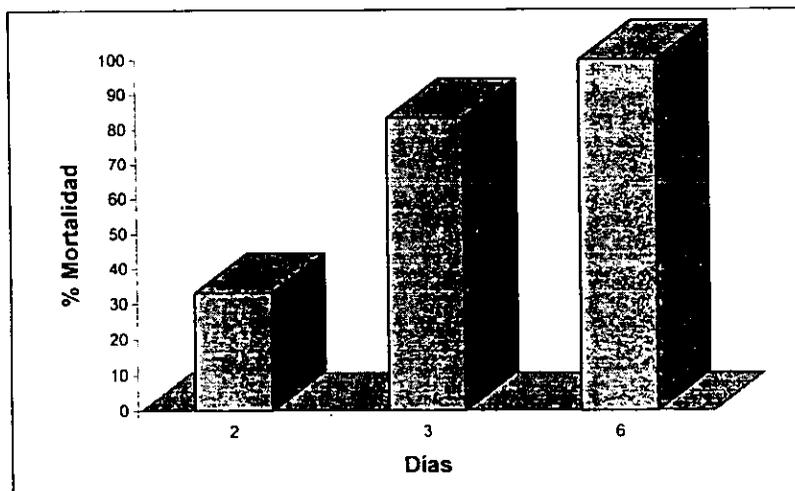
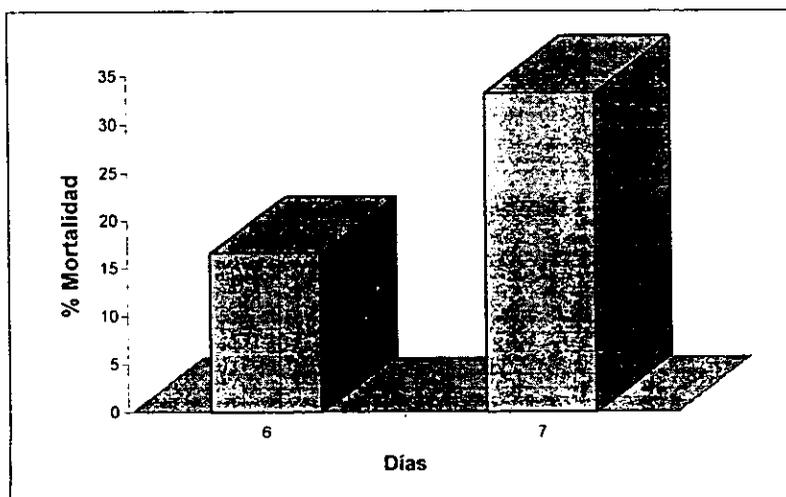


Figura 3.3.6. Mortalidad de ratas evaluadas con dieta de frijol Negro Jamapa (TRC)



Cuadro 3.4.1. Incremento en peso, alimento ingerido y balance de nitrógeno de ratas evaluadas con la dieta de caseína

No. de animal	Peso ¹ (g)	Alim. 1 (g)	Alim.* (g)	Peso heces* (g)	Peso hígado (g)	% N en heces	N. ingerido	N. fecal	N. abs.
1	84,3	238	80,9	4	6,82	5,6	0,18	0,22	1,61
2	75,7	232,9	69,2	3,1	5,53	7,58	0,15	0,23	1,34
3	86,8	252	85,9	3,2	8	5,72	0,19	0,18	1,78
4	96,3	279,5	96	4,4	8,01	6,84	0,21	0,3	1,89
5	92,6	246,8	86	3,2	7,97	6,38	0,19	0,2	1,76
6	116,8	315,6	110,8	3,7	8,75	6,56	0,25	0,24	2,29

¹ Valores tomados durante un periodo de 21 días.

* Valores tomados durante los últimos 6 días de estudio.

Cuadro 3.4.2. Incremento en peso, alimento ingerido y balance de nitrógeno de ratas evaluadas con la dieta de frijol Negro Jamapa (TRC)

No. de animal	Peso ¹ (g)	Alim. 1 (g)	Alim.* (g)	Peso heces* (g)	Peso hígado (g)	%N en heces	N. ingerido	N. fecal	N. abs.
2	49,7	203,9	83	17,7	4,92	5,99	2	1,06	0,94
3	44,8	187,4	66,5	16	4,69	6,02	1,61	0,96	0,65
6	61,7	230,1	80,5	22	6,53	5,29	1,95	1,16	0,79

¹ Valores tomados durante un período de 21 días.

* Valores tomados durante los últimos 6 días de estudio.

Cuadro 3.4.3. Incremento en peso, alimento ingerido y balance de nitrógeno de ratas evaluadas con dieta de frijol Gordo(TA)

No. de animal	Peso ¹ (g)	Alim. 1 (g)	Alim.* (g)	Peso heces* (g)	Peso hígado (g)	% N en heces	N. ingerido	N. fecal	N. abs.
1	57	181,4	71,4	13,8	5,06	6,04	1,73	0,83	0,89
2	63,9	235,1	88,5	15,8	6,2	5,71	2,14	0,9	1,23
3	59,2	261,7	88,1	14,7	7,58	5,93	2,13	0,87	1,25
4	43,4	167,7	67,2	10,4	5,25	6,32	1,62	0,65	0,96
5	46,9	176,6	65,8	10	5	6,18	1,59	0,61	0,97
6	61,2	211,9	82,9	14,2	7,33	5,64	2	0,8	1,2

¹ Valores tomados durante un período de 21 días.

* Valores tomados durante los últimos 6 días de estudio.

Cuadro 3.4.4. Incremento en peso, alimento ingerido y balance de nitrógeno de ratas evaluadas con dieta de frijol Pinto (TA)

No. de animal	Peso ¹ (g)	Alim. 1 (g)	Alim. * (g)	Peso heces * (g)	Peso hígado (g)	% N en heces	N. ingerido	N. fecal	N. abs.
1	82,5	224,4	83	13,9	6,38	5,92	1,97	0,82	1,15
2	58,5	176,2	66,8	11,7	5	6,22	1,59	0,73	0,86
3	78,9	260,6	90	17,6	7,92	5,26	2,14	0,92	1,22
4	54,8	179,2	66,3	12,4	5,42	5,71	1,58	0,71	0,87
5	42,5	157,3	59	9,7	4,94	6,29	1,4	0,61	0,79
6	86,3	266,3	92	17,7	8,14	5,29	2,19	0,94	1,25

¹ Valores tomados durante un periodo de 21 días.

* Valores tomados durante los últimos 6 días de estudio.

Cuadro 3.4.5. Incremento en peso, alimento ingerido y balance de nitrógeno de ratas evaluadas con dieta de frijol Negro Jamapa(TA)

No. de animal	Peso ¹ (g)	Alim. 1 (g)	Alim.* (g)	Peso heces* (g)	Peso hígado (g)	% N en heces	N. ingerido	N. fecal	N. abs.
3	57,3	214,7	81,7	15	5,27	5,38	1,9	0,81	1,09
4	52,8	199,5	60,3	11,1	5,43	5,31	1,4	0,59	0,81
5	64,8	227,9	63,2	9,6	5,97	5,7	1,47	0,55	0,92
6	87,8	254,6	86,2	14,7	7,89	5,28	2	0,78	1,22

¹ Valores tomados durante un periodo de 21 días.

* Valores tomados durante los últimos 6 días de estudio.

Cuadro 3.4.6. Digestibilidad, REP y relación porcentual del hígado de ratas evaluadas con la dieta de caseína

No. de animal	Digestibilidad	REP	Relación % hígado
1	87,5	2,43	6,15
2	84,81	2,23	5,24
3	90,81	2,37	6,48
4	94,98	2,37	6,43
5	89,79	2,58	6,47
6	90,51	2,54	5,35
Promedio	89,73	2,42	6,02
Des. standar	3,42	0,13	0,57
C. V.	3,81	5,37	9,47

Cuadro 3.4.7. Digestibilidad, REP y relación porcentual del hígado de ratas evaluadas con la dieta de frijol Negro Jamapa (TRC)

No. de animal	Digestibilidad	REP	Relación % hígado
2	47	1,61	6,25
3	40,37	1,58	5,74
6	40,51	1,77	6,02
Promedio	42,63	1,65	6,15
Des. standar	3,79	0,10	0,36
C.V.	23,78	18,68	5,9

Cuadro 3.4.8. Digestibilidad, REP y relación porcentual del hígado de ratas evaluadas con la dieta de frijol Gordo(TA)

No. de animal	Digestibilidad	REP	Relación % hígado
1	51,85	2,48	5,98
2	57,85	2,28	5,5
3	59,06	2,42	6,12
4	59,4	2,42	7,21
5	61,13	2,63	6,51
6	60	2,6	6,6
Promedio	58,22	2,47	6,32
Desv. standar	3,30	0,13	0,58
C. V.	5,67	5,23	9,17

Cuadro 3.4.9. Digestibilidad, REP y relación porcentual del hígado de ratas evaluadas con la dieta de frijol Pinto (TA)

No. de animal	Digestibilidad	REP	Relación % hígado
1	58,3	2,47	5,83
2	54,25	2,23	5,79
3	56,86	2,03	6,51
4	55,1	2,06	6,44
5	56,62	1,82	6,84
6	57,24	2,18	5,99
Promedio	56,40	2,13	6,23
Des. standar	1,48	0,22	0,42
C.V.	2,62	10,32	6,75

3.4.10. Digestibilidad, REP y relación porcentual del hígado de ratas evaluadas con la dieta de frijol Negro Jamapa (TA)

No. de animal	Digestibilidad	REP	Relación % hígado
3	57,43	1,83	5,4
4	57,98	1,82	6,65
5	62,63	1,95	6,3
6	61,15	2,37	5,75
Promedio	59,80	1,99	6,09
Des. standar	2,50	0,26	0,44
C.V.	24,39	15,31	7,32

3.5. Estudio Histopatológico

Al realizar la necropsia de los animales, se observó una inflamación a nivel intestino grueso y flatulencia, en algunos casos el hígado de los animales presentaba una coloración oscura y jazpeada.

A continuación se muestran algunas definiciones que se utilizaron para caracterizar el daño causado por las dietas de frijoles crudos y cocidos a los animales en estudio.

La extensión y distribución de las lesiones son importantes características de los procesos patológicos. Las lesiones focales (localizadas) están por lo general más controladas por el hospedador que las difusas (las que se distribuyen por los tejidos) su carácter focal indica que el proceso patológico ha sido delimitado.

Multifocal: En algunas enfermedades, un único foco de lesión puede extenderse hasta formar numerosos focos, o bien, muchos de estos pueden aparecer simultáneamente.

Atrofia: Disminución del tamaño celular o del número de células que han alcanzado su tamaño normal

Inflamación: La respuesta inflamatoria es una reacción a una agresión en la que componentes de la sangre circulante se trasladan a través de la pared de un vaso sanguíneo con permeabilidad alterada. La inflamación se inicia cuando la dilatación y permeabilidad aumentada del vaso se combinan con la activación de leucocitos circulantes para promover el paso de fluidos y células hacia los espacios tisulares. (34)

En el cuadro 3.5.1 se muestran los resultados obtenidos del estudio histopatológico realizado por el Departamento de Patología de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Las observaciones de los cortes del hígado no se presentan en dicho cuadro ya que revelaron que ninguna de las dietas de frijol tanto crudas como cocidas causaron lesión alguna.

La atrofia causada a las vellosidades de la región del intestino delgado, específicamente del yeyuno, fue clasificado en grave, discreto y moderado. Además se expresó la distribución de la lesión como difusa o multifocal. Sin embargo, existieron factores que impidieron realizar observación en los tejidos, como son los cambios post-mortem, representados en el cuadro 3.5.1 como cambios autolíticos, debido a que pasaron más de 2 horas a la temperatura ambiente de haber fallecido el animal al practicarle la necropsia.

Cada número en el cuadro 3.5.1. indica el número de animales de cada lote que presentaron o no alguna patología descrita en el párrafo anterior, así como la localización de la atrofia en caso de existir.

Los animales a los que se les administró frijoles crudos mostraron un grado de atrofia en general discreta, excepto en el caso particular del lote de frijol Gordo crudo, en el cual los resultados indicaron que no se presentó lesión alguna, siendo que es éste el que contiene el mayor contenido de lectinas de todas las dietas evaluadas.

Posiblemente la fracción dañada se encontraba en la región proximal al yeyuno y no en la zona en que se realizó la biópsia, ya que se tomó la parte final del yeyuno y principio del ileon, que es donde se reporta que se presentan las lesiones a nivel del tracto gastrointestinal por acción de las lectinas.

Las dietas de frijoles cocidos con el tratamiento(T R C) también presentaron una lesión discreta, en general el 60 % de los animales tenían atrofia discreta. Mientras que las dietas de frijol (TA) es decir, que fueron cocidos en autoclave, aún cuando fueron las que contenían el menor contenido de lectinas, presentaron un grado de atrofia de discreta a moderada.

Lo cual se explica si se considera que los animales de ingirieron frijoles crudos o cocidos de los lotes(T R C) murieron en la primera semana de estudio debido al alto contenido de lectinas, sin embargo los animales de los lotes con tratamiento(T A) consumieron durante 21 días dicho alimento.

Pusztai (35) demostró que lectinas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*)causaban una ruptura de las células de la región del borde en cepillo de ratas alimentadas con dietas del frijol crudo, así como una severa alteración de las microvellosidades de las células del duodeno y yeyuno.

Las figuras 3.5.1. a la 3.5.8, representan de forma esquemática, el grado de atrofia en porcentaje que presentó cada una de las dietas evaluadas.

De la misma forma se representan de forma gráfica los cambios autolíticos que impidieron visualizar alguna alteración. El lote de referencia (caseína) y el lote de Frijol Gordo crudo que no presentaron alteraciones se omitieron.

Las figuras 3.5.10. , 3.5.11 y 3.5.12., ilustran un corte transversal de una sección del intestino delgado. La figura 3.5.10. muestra atrofia discreta en la cual se observa una ligera disminución del tamaño de las vellosidades, en la figura 3.5.11 muestra un grado de atrofia moderada, las vellosidades del intestino delgado han disminuido de forma notoria su tamaño pero no todas las células han sido afectadas. Estudios similares con escumite(*Phaseolus acutifolius*) se encontró una marcada alteración de las microvellosidades donde se mostraban notablemente delgadas y largas comparadas con las normales(36)

Mientras que la figura 3.5.12 el grado de atrofia es grave, todas las vellosidades fueron afectadas por la dieta administrada y el tamaño de éstas disminuyó significativamente comparado con la figura 3.5.9. en la cual se muestra un corte de la dieta de referencia, donde las vellosidades se encuentran sin cambio alguno.

Sotelo et al.(36) demostraron que la administración de frijoles crudos de escumite(*Phaseolus acutifolius*) causan daños patológicos en las células absorptivas, así como la destrucción de microvellosidades, dilatación de mitocondrias fragmentación del retículo endoplásmico, etc.

Cuadro 3.5.1. Estudio histopatológico del tracto intestinal de las ratas a las que se les administró dietas de frijol Gordo, Pinto, Negro Jamapa crudos y cocidos, si como la dieta de caseína.

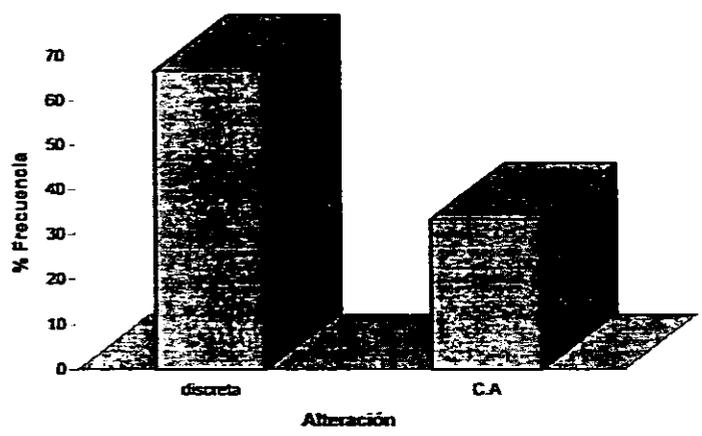
Dieta	Severidad de la atrofia			Localización		Cambio autolítico	Sin alteración
	Discreta	Moderada	Grave	Difuso	Multifoc.		
Caseína							6
F.Gordo cr ^a							6
F.Pinto cr ^a	3		1	4		2	
F. Negro cr ^a	4				4	2	
F.Gordo (T.R.C) ^b	4			4		2	
F.Pinto (T.R.C) ^b	4		2	4	2		
F.Negro (T.R.C.) ^b	2	3		5		1	
F.Gordo (T. A.) ^c	3	3		4	2		
F.Pinto (T. A) ^c	4	2		5	1		
F.Negro (T. A.) ^c	3	3		5	1		

a. Frijol crudo

b.Frijol con tratamiento de remojo y cocción

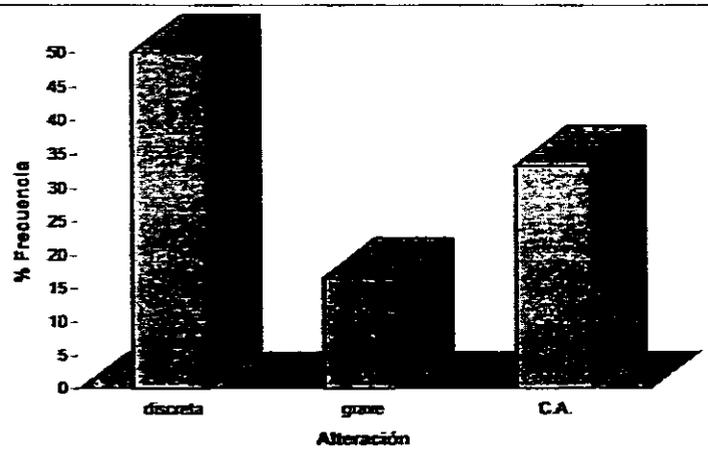
c. Frijol con tratamiento en autoclave

Figura 3.5.1. Resultados histopatológicos de porción del intestino de ratas evaluadas con dieta de frijol Negro Jamapa crudo



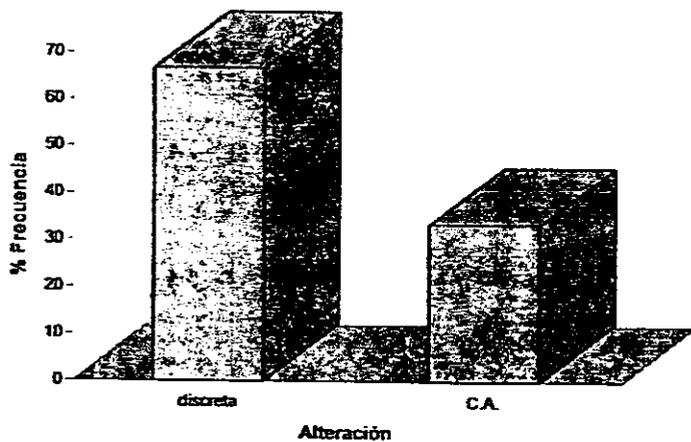
C.A= cambios autolíticos

Figura 3.5.2. Resultados histopatológico de porción del intestino de ratas evaluadas con dieta de frijol Pinto crudo



CA=cambios autolíticos

Figura 3.5.3. Resultados histopatológicos de porción del intestino de ratas evaluadas con dieta de frijol Gordo(TRC)



CA=Cambios autolíticos

Figura 3.5.4. Resultados histopatológicos de porción del intestino de ratas evaluadas con dieta de frijol Pinto (TRC)

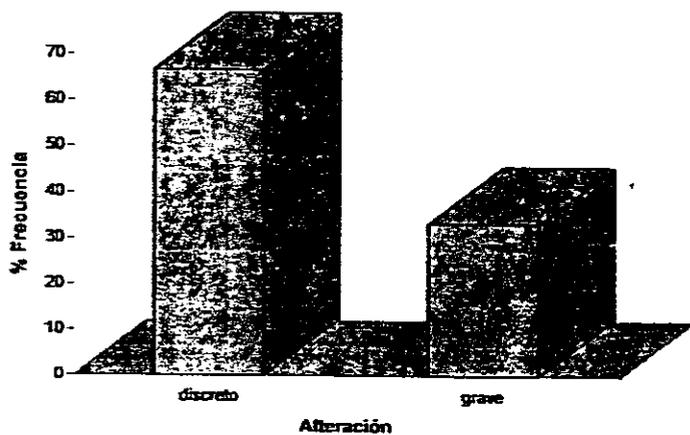
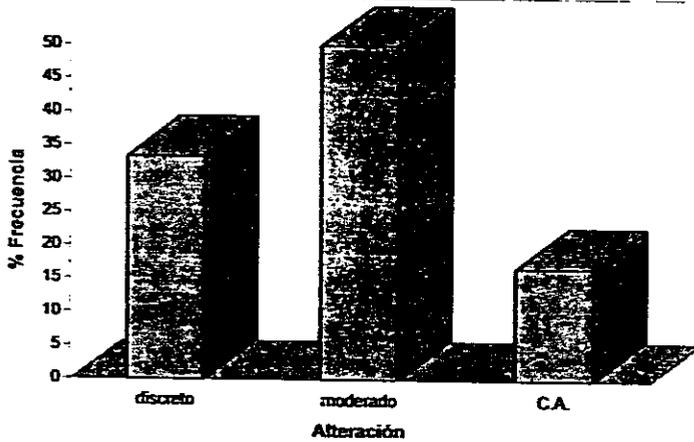


Figura 3.5.5. Resultados histopatológicos de porción del intestino de ratas evaluadas con dieta de frijol Negro Jamapa (TRC)



CA=Cambios autofíticos

Figura 3.5.6. Resultados histopatológicos de porción del intestino de ratas evaluadas con dieta de frijol Gordo (TA)

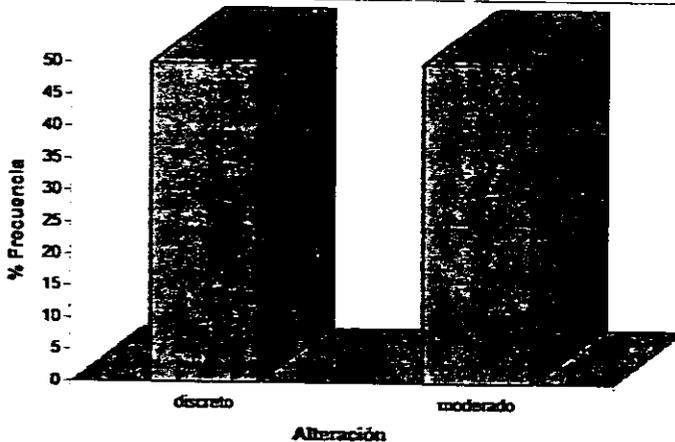


Figura 3.5.7. Resultados histopatológicos de porción del intestino de ratas evaluadas con dieta de frijol Pinto (TA)

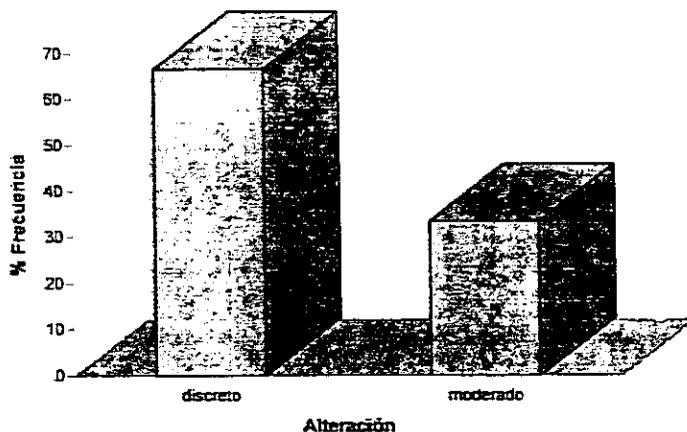


Figura 3.5.8. Resultados histopatológicos de porción del intestino de ratas evaluadas con dieta de frijol Negro Jamapa (TA)

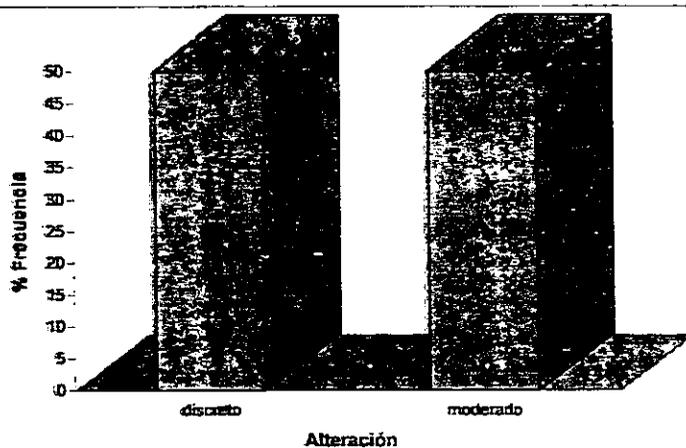




Figura 3.5.9.

Microfotografía (10X) Sección del intestino delgado(yeyuno).

Esquematación de vellosidades.(Control)

De corte de animal que ingirió dieta de caseína



Figura 3.5.10.

Microfotografía (10X) Sección del intestino delgado(yeyuno).

Esquematización de atrofia discreta, localización difusa.

De corte de animal que ingirió dieta de Frijol Negro Jamapa (TA).

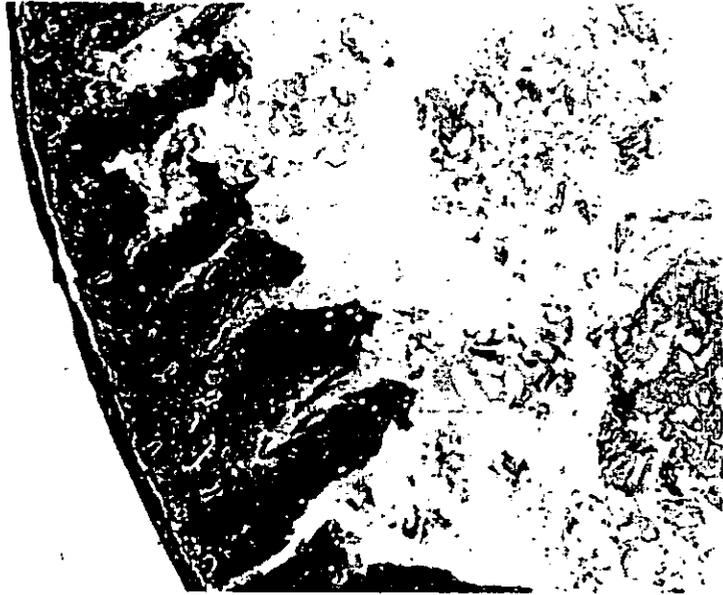


Figura 3.5.11.

Microfotografía (10X) Sección del intestino delgado(yeyuno).

Esquematzación de atrofia moderada, localización difusa.

De corte de animal que ingirió dieta de frijol Pinto (T R C)

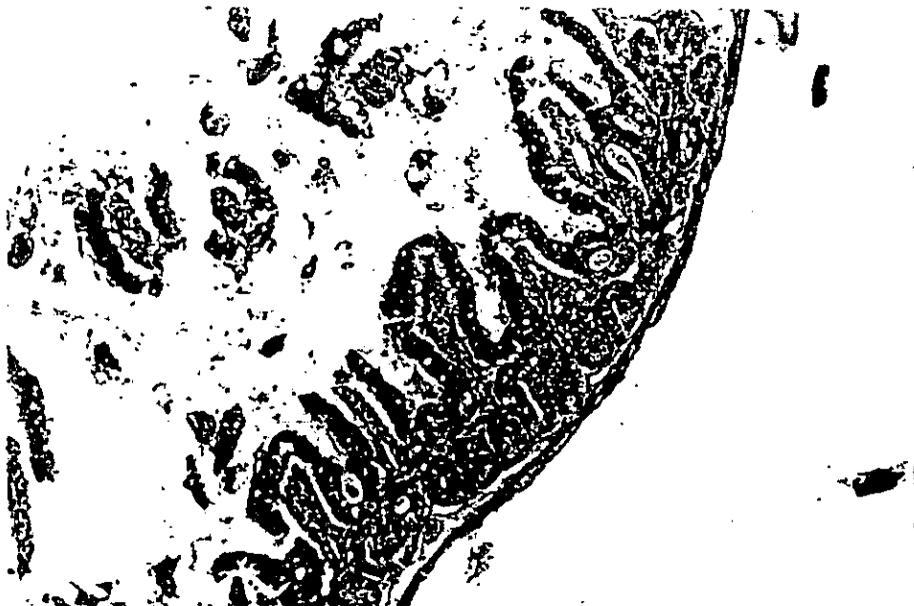


Figura 3.5.12.

Microfotografía(10 X) Sección del intestino delgado(yeyuno).

Esquemmatización de atrofia grave , localización difusa.

De corte de animal que ingirió dieta de frijol Pinto(T R C)

3.6. Estudio estadístico

El cuadro 3.6.1 muestran los resultados del estudio estadístico realizado a los resultados del bioensayo nutricional: Rep, digestibilidad y relación porcentual del hígado de las diferentes dietas evaluadas. También se realizó una prueba de rango múltiple (Prueba de Duncan) con un valor de significancia del 95%.Las cuales indican que el hígado no fue afectado por el consumo de lectinas como se explicó en el estudio histopatológico.

Por otro lado las dietas de frijol procesadas con el tratamiento (TA) mostraron diferencia significativa respecto a la dieta de referencia(caseína), en la evaluación de digestibilidad , lo mismo que la dieta de frijol Negro Jamapa procesada con el tratamiento (TRC) con respecto a la dieta de referencia y a las dietas de frijol (TA).

En la evaluación de REP también se observó diferencia significativa entre las dietas, la dieta de frijol Gordo (TA) no mostró diferencia significativa comparada con la dieta de referencia, pero si con las dietas de frijol Pinto (TA) ,Negro Jamapa (TA) y Negro Jamapa (TRC).Y ésta última fue significativamente diferente con respecto a las dietas evaluadas.

El estudio estadístico concordó con los resultados del estudio de toxicidad subaguda, pues ambos señalan que de las pruebas de digestibilidad y REP se obtuvieron valores diferentes significativamente con respecto a la dieta de referencia dependiendo del contenido de lectinas en las muestras evaluadas.

Cuadro 3.6.1.

Muestra	UH / g M	días(100%) mort.	R E P	Digest.	Relación % higado
Gordo crudo	103 312	4	-	-	-
Pinto crudo	141.7	3	-	-	-
Negro crudo	1.7	6	-	-	-
Gordo(TRC)	47.2	6	-	-	-
Pinto (TRC)	103.3	6	-	-	-
Negro (TRC)	1.41	-	1.65 ^c	42.6 ^c	6.15 ^a
Gordo(TA)	2.4 e-5	-	2.47 ^a	58.2 ^b	6.32 ^a
Pinto (TA)	0.005	-	2.13 ^b	56.4 ^b	6.23 ^a
Negro(TA)	0.005	-	1.99 ^b	59.8 ^b	6.09 ^a
Caseína	-	-	2.42 ^a	89.7 ^a	6.02 ^a

- Al modificar el volumen de microtitulación y realizar una dilución adecuada, se logró cuantificar el contenido de lectinas en las muestras biológicas evaluadas.
- Con la aplicación de esta metodología y un estándar de referencia se pudo cuantificar en términos de unidades de hemaglutinación (UH) el contenido de lectinas en las semillas crudas y procesadas.
- Así mismo, se verificó que diversas concentraciones de lectina provocaban diferentes grados de atrofia en las vellosidades en los estudios realizados *in vivo*. Como resultado se observó desde una disminución del crecimiento de los animales hasta la muerte de éstos, debido a la interacción directa entre las lectinas y las vellosidades intestinales.
- Se estableció que no existe correlación entre el contenido de lectinas con la fracción proteica soluble (albúminas y globulinas) pero son significativamente disminuidas por procesos térmicos.
- Se encontró una correlación entre el contenido de lectinas expresados en UH / g muestra y su toxicidad, pues al parecer desde 1 UH / g se manifiestan daños severos en el tracto gastrointestinal.

1. Mulle, T., and Tubin, G., (1986). *Nutrición y ciencia de los alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza. Pp 112-127
2. Bourges., H. (1985) "Tecnología alimentaria, un recurso cultural". En Ramos-Galván R (de). *Alimentación normal en niños y adolescentes. El Manual Moderno*. Pp 441-473. México.
3. Bourges., H. (1987) " Las leguminosas en la alimentación humana" 2ª Parte. *Cuadernos de Nutrición*, 10(2). pp 17-32. México, D.F.
4. Bender, E.A. 1993. *Introducción a la nutrición y el metabolismo*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp 293
5. Anderson, L., Dibble, M. Turkki, P. Mitchell, H. and Rynbergon, H., 1985. "Nutrición y dieta de Cooper", Nueva editorial Interamericana S.A. México, D.F. Pp 56-58.
6. Harbone, J.B., Boutler, D and Turner, B.L. (1971) "Chemotaxonomy of the leguminosae". Academic Press. Pg 369-371 .New York.
7. Mendieta Rergis, Araceli .(1986). Tesis Aislamiento y parcial caracterización de las lectinas de tres especies de *Phaseolus*. Facultad de Química, UNAM. Pp 3-8. México, D.F.
8. Halina Lis and Nathan Sharon. T. (1981) "The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise " Vol 6. Academic Press; Pp 3769-415. New York.
9. Agraz Balcazar Maria Guadalupe. (1989). Tesis Actividad biológica de extractos crudos de lectinas de leguminosas silvestres y comestibles. Facultad de Química, UNAM. Pp 7-11, 16-18. México, D.F.
10. Fundenberg, Hugh. H., Stiles P.P., (1982). "Inmunología Clínica." 3ª Edición. El Manual Moderno, Pp 33-35 México. D.F.
11. Janson, V.K., Sakamoto, C.K., Burger, M.M., (1973). "Isolation and characterization of agglutinin receptor-sities". *Biochimica et Biophysica Acta*, 291, Pp 136-143.

12. Howard, I.K., Sage, H.J., Horton, C.B., (1972) "Studies on the appearance and location of hemagglutinins from a common lentil during the life cycle of the plant". Arch.Biochem. Biophys. 149, pg 323-326.
13. Jones, J.M., Cawley, L.P., Teresa G.W.(1967) "The lectins of *Maclura pomifera*: zimografic studies, distribution in the developing plant and production in tissue cultures of epicotyles". J.Immun. 98,2. Pp 364-367.
14. Kahre, L. Bekendam, J., Grob, R., (1978) "Manual para la evaluación de plántulas en análisis de germinación". ISTA-Instituto Nacional de Semillas y Plantas de vivero, Pp 33-35. España.
15. De León Fong, J.A., (1987). "Tesis Las lectinas en vegetales superiores y su función en procesos fisiológicos" Facultad de Química, UNAM. Pp 7-12, 16, 17. México, D.F.
16. Ascencio, F., Ochoa, J.L., (1985) "Marine invertebrate agglutinins: The lectin from *Megapitaria squalida* CLAM" Lectins 4. Pp 409-414.
17. Bold, D.H., Banwell, J.G., (1985) "Binding of isolectins from red kidney bean *Phaseolus vulgaris* to purified rat brush-border membranes" *Biochimica et Biophysica Acta* 843,3. Pp 1-3.
18. Jaffé, G., Brucher, O. (1972) "Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemagglutininas de frijoles". Arch.Latinoamer.Nut. 22. Pp 267-281
19. Liener, E. Irvin (1986) "Nutritional Significance of Lectins in the Diet" .Academic Pres., Pp 534-544. New York.
20. Pusztai, Arpad "Chemical probiosis: Blockage by food (plant) lectins of infection of the gut with pathogenic bacteria". Rowett Research Institute, Scotland, UK. Pp 1-4.
21. FDA/ CFSAN (1992) " Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook" Pp 1-3.

22. Yang.M.G. and Mickelsen., O. (1974)"Laboratory animals in nutritional research" in : Methods of animal experimentation. Gay,W.I.(Editor) Academic Press, Vol V. N.Y. Pp 1-12,
- 23.Mongomery, D.C. 1991 "Diseño y análisis de experimentos . Editorial Interamericana, Pp 147, 163-167.
- 24.Conrath,T.B., (1972)"Hanbook of microtiter procedures" Dynatech CO. Pp 1-29.
- 25.Cooke Eneering Company(1969)"Microtiter (Instruction Manual) 4ª Edition,Alexandria, Virginia.
26. Hartree, E.,(1972) "Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response". Anal. Bioche. 48. Pp 422-427.
27. Badui,D.S., 1993. "Química de los alimentos" Ed. Alhambra, S.A. Pp 66-67, 538.
- 28.Pearson, D.(1976)"The Chemical Analysis of Foods". 7ª Edition, Churchill Livingtone. Pp 13-15. New York.
29. Helrich,K. (1990) "Official Methods of Analysis of the AOAC" 5ªEdition.Published by AOAC. Inc.Vol II. Pp 1095-1098. Arlington.
30. Iruegas, A.E.(1973) "Determinación de la calidad proteínica de algunas leguminosas por diferentes métodos biológicos". Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá(INCAP), Pp 3-5. Guatemala, C.A
- 31.Pellett, P.L. and Young, V.R. (1980) "Nutritional Evaluation of Protein Foods"The United Nations University, Pp 1-6, 27-54. Tokio.
32. Bender,A.E. and Doell,B. M. (1957) " Biologcal evaluation of protein : a new aspect". Bri.J. Nutr. Pp11,140-158.
33. Sarwar.G., an McLanghlan.J.M. (1981)"Relative ner protein ratio method for evaluatin protein quality". Nutr.Rep.Int. 23(6) Pp 1157-1166.

-
34. Cheville, F. Norman., "Introducción a la anatomía patológica general veterinaria". Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp 12-22
35. Lanfer Marquez, U.M., Lajolo, F.M. (1981). "Composition and digestibility of albumin, globulin and glutelins from *Phaseolus vulgaris*". J. Agric. Food Chem. 29. Pp 1068-1074.
36. Sotelo, A., González-Licea. A., (1983) "Ultrastructural changes of epithelial intestinal cells induced by the ingestion of raw *Phaseolus acutifolius*". Nutr.Rep.Int. Vol 27, No.2. Pp329-337.