

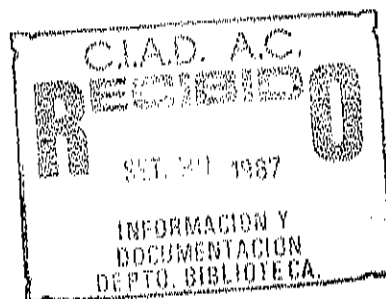
EFFECTOS DE LA LECTINA DE Amaranthus cruentus SOBRE
LA MUCOSA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE MONOGASTRICOS.

Por

Ana Ma. Calderón de la Barca

1007
1008
1009
1

Tesis aprobada por el
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y ALIMENTOS
como requisito parcial para obtener
el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
CON
ESPECIALIDAD EN NUTRICION Y ALIMENTOS

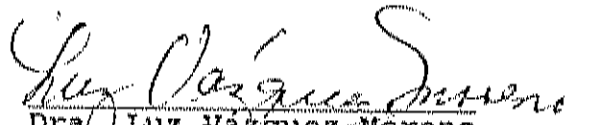


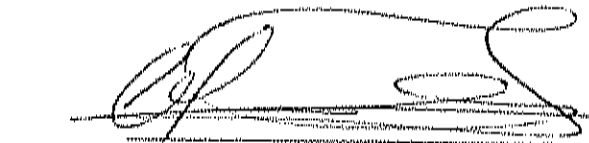
CENTRO DE INVESTIGACION EN ALIMENTACION Y DESARROLLO, A.C.


1987

APROBACION

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de ANA MA. CALDERON DE LA BARCA, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Nutrición y Alimentos.


Dra. Luz Vázquez Moreno
Directora de Tesis


Dr. Mauro E. Valencia J.


Dr. Luis A. Mejía C.

Hermosillo, Son. 10 de junio de 1987.

RECONOCIMIENTO

El presente estudio fue realizado en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD); Centro de Investigaciones Biológicas de B.C.S., A.C. (CIB) y Hospital Infantil del Edo. de Sonora y sustentando económicamente por las dos primeras instituciones; por lo que agradezco las facilidades prestadas al Dr. Carlos E. Peña, Director General y Dr. Mauro E. Valencia, Director de la División de Nutrición y Alimentos del CIAD; al Dr. Daniel Lluch Belda, Director General y Dr. José Luis Ochoa, Director de la División de Biología Experimental del CIB; y al Dr. Guillermo López, Jefe del Departamento de Patología del Hospital Infantil.

AGRADECIMIENTOS

Con cariño y gratitud a mi directora de tesis, la Dra. Luz Vázquez por su guía, paciencia e interés a lo largo de la realización de este estudio.

Con aprecio a los miembros del comité de tesis, Dr. Mauro E. Valencia y Dr. Luis Mejía, por sus sugerencias en el trabajo y en la edición de esta tesis.

Con gratitud, al Dr. Minor Cordero y Dr. Guillermo López por su asesoría en los experimentos de histiología y al personal técnico del Departamento de Patología del Hospital Infantil, por su cooperación.

Gracias así mismo, a mis compañeros de la División de Biología Experimental del CIB y del Laboratorio de Bioquímica del CIAD, por su asistencia técnica y apoyo moral.

Con afecto, a todas las personas que de una u otra forma me ayudaron en esta etapa de formación profesional.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
INTRODUCCION.	1
REVISION BIBLIOGRAFICA.	3
1. PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LA LECTINA DE <u>Amaranthus cruentus</u>	8
Introducción.	8
Materiales y Métodos.	10
Resultados y Discusión.	13
2. INTERACCION DE LA LECTINA DE <u>Amaranthus cruentus</u> CON LA MUCOSA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL <u>in vitro</u>	20
Introducción.	20
Materiales y Métodos.	23
Resultados y Discusión.	26
3. EFECTO DE LA LECTINA DE <u>Amaranthus cruentus</u> SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LAS PROTEINAS <u>in vitro</u>	33
Introducción.	33
Materiales y Métodos.	37
Resultados y Discusión.	39
4. EFECTOS DE LA LECTINA DE <u>Amaranthus cruentus</u> SOBRE EL BALANCE DE NITROGENO Y LA MUCOSA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE LA RATA.	46
Introducción.	46
Materiales y Métodos.	48
Resultados y Discusión.	51
CONCLUSIONES.	55
BIBLIOGRAFIA.	58

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1.1 Especificidad química de la lectina de <u>Amaranthus cruentus</u>	14
1.2 Rendimientos en la extracción y purificación de la lectina de <u>A. cruentus</u> en Mini Leak-Fetuina . .	15
1.3 Efecto del tratamiento con calor húmedo sobre la estabilidad de la lectina de amaranto	16
1.4 Efecto del pH sobre la actividad de la lectina de <u>A. cruentus</u>	17
1.5 Efecto del buffer de almacenamiento sobre la estabilidad de la lectina de <u>A. cruentus</u>	18
1.6 Estabilidad de la lectina de <u>A. cruentus</u> después de la ultrafiltración en Amicon PM-10	18
2.1 Estudios histológicos de la mucosa gástrica con lectinas específicas para grupos galactosilo y galactosaminilo	28
3.1 Digestibilidad <u>in vitro</u> de caseína en presencia de la lectina de <u>A. cruentus</u>	41
4.1 Composición de la dieta basal para evaluación <u>in vivo</u> de formulaciones experimentales	49
4.2 Balance de nitrógeno y valores de NPU de las ratas alimentadas con las dietas control y experimental.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Purificación de la lectina de <u>A. cruentus</u> por cromatografía de afinidad en Mini Leak-Fetuina. . .	15
1.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS, de la purificación de la lectina de <u>A. cruentus</u> . .	19
2.1	Patrón de inmunodifusión doble del antisuero anti-amaranto contra el extracto crudo y la lectina de <u>A. cruentus</u>	27
2.2	Células parietales de la mucosa estomacal teñidas con HE (a) y con lectina de amaranto fluoresceinada (b)	29
2.3	Células del epitelio superficial del yeyuno teñidas con HE (a) y con lectina de amaranto fluoresceinada (b)	30
2.4	Patrón electroforético de las proteínas de la mucosa gastrointestinal.	31
2.5	Glicoproteínas de mucosa gastrointestinal con especificidad por la lectina de amaranto	32
3.1	Inmunodifusión doble de los hidrolizados de caseína conteniendo lectina contra los anticuerpos anti-amaranto	42
3.2	Patrón electroforético de los productos de la digestión con pepsina.	44
4.1	Secciones transversales del yeyuno de ratas alimentadas con las dietas control y experimental. . .	52
4.2	Inmunodifusión doble de los extractos de heces de rata alimentadas con una dieta experimental. . .	53

RESUMEN

Se estudió el efecto de la lectina de Amaranthus cruentus sobre la mucosa del tracto gastrointestinal de los monogástricos, a nivel macroscópico, microscópico y molecular.

La lectina fue purificada por cromatografía de afinidad en una matriz con fetuína unida covalentemente; tuvo especificidad por N-acetilgalactosamina y el peso molecular del monómero fue de 32.5 KD, por electroforesis. La lectina mantuvo su actividad biológica cuando fue sometida a cambios de pH, calor húmedo y proteólisis in vitro, similares a los fisiológicos.

Al incubar cortes histológicos de la mucosa gastrointestinal con la lectina marcada con fluoresceína, ésta se unió específicamente a las células parietales gástricas y del epitelio superficial en el intestino delgado. El patrón electroforético (en condiciones reductoras) de los extractos de mucosa, presentó solo una banda fluorescente de 17 KD, correspondiente a una glicoproteína gástrica.

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la utilización de proteína (NPU) al comparar ratas alimentadas con una dieta control con otra conteniendo la lectina, a un nivel de 0.2 %. A pesar de esto, la mucosa intestinal de las ratas del segundo grupo, sufrió cambios morfológicos tales como reducción y ensanchamiento de las vellosidades y una pérdida excesiva de epitelio superficial. Además la lectina fue detectada activa en las heces de las ratas del grupo experimental.

INTRODUCCION

Se ha sugerido que el amaranto por su alto valor alimenticio, puede ser una alternativa para solucionar parcialmente el problema de la falta de proteínas en nuestro país, ya que la calidad de las proteínas de su semilla es comparable a la de caseína de la leche (Sánchez Marroquín, 1980), además de que su consumo forma parte de nuestra cultura desde la época prehispánica (Ruskin, 1984).

La semilla de Amaranthus leucocarpus (sin. hypochondriacus) contiene una lectina específica para N-acetilgalactosamina, fácilmente extraíble en solución salina. Cuando se compararon una dieta conteniendo la semilla entera con otra dieta conteniendo la semilla extraída en solución salina, se encontraron diferencias significativas en la calidad de la proteína (PER) y retención de nitrógeno estimado a través de NPR en ratas Sprague Dawley (Calderón de la Barca et al., 1985a).

En algunos casos otros factores antinutricionales encontrados en las semillas como taninos, inhibidores de tripsina y lectinas, interaccionan causando un efecto sinérgico que oscurece la respuesta de solo uno de ellos (Jaffé, 1980); esta podría ser la explicación de lo observado al trabajar las dietas de amaranto, en donde la semilla entera contenía diversos factores potencialmente tóxicos. Por tal motivo, se consideró de interés estudiar el efecto de solo la lectina sobre el balance de nitrógeno de ratas de laboratorio.

En el presente trabajo se aisló y purificó la lectina de A. cruentus, una especie de amaranto con propiedades nutricionales y contenido de aminoácidos similar al de A. hypochondriacus (Ruskin, 1984). Esta lectina se utilizó como material principal en un intento de aislar e identificar receptores de mucosa gastrointestinal, específicos para la lectina, y de hacer una evaluación del daño fisiológico que conlleva el ingerir la lectina, sobre la mucosa gastrointestinal, a nivel macroscópico, microscópico y molecular.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Las lectinas son moléculas proteicas que interaccionan específicamente con carbohidratos, no son de origen inmunológico y no presentan actividad enzimática demostrable (Goldstein, 1981); poseen una marcada habilidad para aglutinar células, en especial eritrocitos, y se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza. En las plantas, las semillas tienen mayor concentración de lectinas, aunque se presentan en otros tejidos como raíces, hojas y cortezas (Sharon y Lis, 1972).

Debido a que enlazan específicamente a los carbohidratos de la superficie celular, es posible inhibir la aglutinación de células por lectinas añadiendo azúcares simples (Sharon y Lis, 1972). A esta propiedad de distinguir entre las estructuras de los carbohidratos, deben su nombre las lectinas (Latín legere: seleccionar, escoger), y por la misma se han convertido en instrumentos valiosos para la investigación de la arquitectura de membranas celulares, medicina, biología y aplicaciones bioquímicas. Las lectinas son utilizadas en áreas tan variadas como la tipificación de bacterias y los transplantes de médula ósea, entre otras (Lis y Sharon, 1986).

La primera descripción de una proteína con acción tóxica y capacidad para aglutinar eritrocitos, fue hecha hace 100 años. Desde entonces, la investigación sobre las propiedades y aplicaciones de las lectinas se ha visto estimulada por diversos factores, en tal forma que existen unas 15000 publicaciones al

respecto (Lis y Sharon, 1986); de ellas, solo un número muy reducido se refiere a sus propiedades antinutricionales (Jaffé, 1980).

La asimilación de los nutrientes que contienen las semillas, tan eficiente cuando se trata de proteínas de origen animal, se ve reducida por la presencia de lectinas y otros compuestos (Pusztai, 1985). Se ha encontrado a las lectinas responsables de efectos antifisiológicos tales como: retardo del crecimiento (Liener, 1981), inmunosupresión, disminución en la digestibilidad y en la absorción de nitrógeno (Jaffé y Camejo, 1961; Pusztai et al, 1979); así como en la digestibilidad y absorción de carbohidratos (Rea et al, 1985); se han relacionado con problemas como la enfermedad celiaca ocasionada por gluten de trigo y otros cereales (Auricchio et al, 1985); e incluso algunas de ellas han causado la muerte en animales de laboratorio que han ingerido diversas proporciones de lectinas con la dieta (Pusztai et al, 1979).

En la década presente, se ha establecido que la acción toxicológica de las lectinas se da principalmente vía el intestino delgado (Jaffé, 1980), y que puede estar mediada al menos por cuatro diferentes procesos: a) efectos destructivos sobre las microvellosidades de la mucosa del tracto gastrointestinal, como es el caso de las lectinas de frijol común estudiadas por Rossi y colaboradores (1984), Begbie y King (1985) y Pusztai et al (1979); y de la Con A de Canavalia ensiformis y germen de trigo (Lorentz-Meyer et al, 1985); estos autores

encontraron daño en el borde de cepillo del intestino delgado, de monogástricos cuyas dietas contenían las semillas crudas o las lectinas purificadas, b) efecto sobre las enzimas intestinales; como lo ha mostrado la disminución en la actividad enzimática de homogenados de tejido intestinal de ratas cuyas dietas contenían lectinas de soya, frijol y germen de trigo (Jindal et al, 1984; Higuchi et al, 1984); o la influencia de lectinas dietarias sobre la digestión de almidón por humanos, que mostró una reducción con respecto al control, la cual puede ser ocasionada por el enlace directo de las lectinas con las enzimas digestivas, así como por una reducción de la accesibilidad de las enzimas al sustrato (Rea et al, 1985). c) enlace de células del epitelio intestinal y reducción de la absorción de nutrimentos a través de su pared; demostrado por microscopía de inmunofluorescencia en secciones del yeyuno de puerco alimentado con una dieta conteniendo frijol crudo, en donde puede observarse la presencia de la fitohemaglutinina enlazada al borde de cepillo de los enterocitos (Begbie y King, 1985); o las lectinas de germen de trigo y haba blanca, que se unieron específicamente a la mucosa del yeyuno de rata al incubar los intestinos completos con las lectinas marcadas (Lorenz-Meyer et al, 1985). Por último, d) proliferación de las bacterias normales del intestino; en los experimentos realizados por Wilson et al (1980), se encontró una sobrepoblación de E. coli en el intestino delgado de las ratas después de seguir una dieta que contenía frijol con un alto contenido de lectina, estos autores sugieren como un mecanismo posible la inmunosupresión

ocasionada por las lectinas. Banwell et al (1983), encontraron además sobrecrecimiento de aerobios y anaerobios totales, en las diversas secciones de intestino delgado de ratas alimentadas con fitohemaglutininas.

[Las consecuencias de la ingestión de lectinas de semillas sobre monogástricos, se han estudiado en general con semillas crudas o lectinas purificadas en altas concentraciones de la dieta; hay pocos estudios sobre la ocurrencia de lectinas en alimentos procesados, y menos sobre la relación de éstas con efectos adversos en una dieta variada. Se ha detectado actividad biológica de lectina en 33% de los alimentos de una dieta común que incluye ingredientes para ensalada, frutas frescas, nueces y cereales procesados (Nachbar y Oppenheim, 1980). Otros autores, han encontrado termoresistencia en lectinas tratadas con calor húmedo, durante diversos periodos (Liener, 1981; Goldstein, 1981; Newburg y Concon, 1985), incluso se ha demostrado que una lectina de frijol mantiene su actividad después de 18 hrs de tratamiento con calor seco (Liener, 1981).] En un trabajo sobre el efecto de las lectinas de los alimentos en la digestibilidad del almidón, se detectó actividad hemaglutinante en 16 alimentos de origen vegetal, ricos en almidón, cocinados en forma convencional; esta actividad correlacionó bien con la depresión en la digestibilidad del almidón en humanos sanos y diabéticos (Rea et al, 1985); mostrando así que las lectinas afectan la digestibilidad de otras biomoléculas diferentes a las proteínas.

(Ya que las lectinas son proteínas, se podría pensar que un proceso digestivo las desactivará por completo, evitando efectos antifisiológicos. Sin embargo, hay lectinas resistentes a procesos proteolíticos, como se ha demostrado in vitro al digerir caseína y albúmina bovina en presencia de una fitohemaglutinina de frijol que deprime la digestibilidad de ambas en 23 y 12.5 % respectivamente; debido a que no se hidroliza en esas condiciones y así puede afectar la actividad enzimática (Thompson et al, 1986). También se han encontrado lectinas activas de frijol y haba en las heces de ratas cuyas dietas las contenían (Nakata y Kimura, 1985), indicando así su resistencia a variaciones de pH unidas al proceso de proteólisis por enzimas digestivas.

Practicamente todas las semillas contienen lectinas (Pusztai, 1985) y en la actualidad existen métodos que facilitan su aislamiento y purificación, permitiendo evaluar la posible significancia de las aglutininas de las plantas sobre el valor nutritivo de las proteínas (Goldstein, 1981).]

CAPITULO 1.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LA LECTINA DE Amaranthus cruentus.

Introducción

Para la determinación de lectinas, el material en estudio se muele y se extrae con agua, solución salina o buffers de pH neutro (Jaffé, 1980); las lectinas del gluten de algunos cereales se extraen sucesivamente en buffers de fosfatos, alcohol y soluciones alcalinas, debido a que algunas de sus proteínas son insolubles en buffers acuosos (Concon et al, 1983).

Las lectinas son rutinariamente detectadas y cuantificadas por su habilidad para aglutinar eritrocitos; de acuerdo al monosacárido que inhibe mejor la hemaglutinación, las lectinas se clasifican en un número pequeño de grupos: manosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, fucosa y ácido acetilneuramínico (Lis y Sharon, 1986). Cuando se estudia una nueva fuente de lectinas, se utilizan eritrocitos humanos y animales en forma nativa o tratados con tripsina o neuraminidasa, ya que hay lectinas específicas para ciertos tipos sanguíneos y otras que solo aglutinan eritrocitos pretratados (Jaffé, 1980).

Los esquemas de purificación de lectinas se basan principalmente en su especificidad química, inmovilizando los carbohidratos adecuados en una matriz inerte para afinidad cromatográfica (Lis y Sharon, 1986). En algunos casos se utilizan el Sefadex y la Sefarosa (polímeros de dextranos y

galactosa), para lectinas con afinidad por grupos glucosilo y galactosilo (Jaffé, 1980). Cuando se dificulta la preparación de un adsorbente específico, debido a que la lectina no presenta afinidad química por una estructura simple, pero aglutina eritrocitos, se utilizan eritrocitos tratados con formaldehído o estroma de eritrocitos tratados con glutaraldehído como adsorbente (Ochoa y Kristiansen, 1978).

La purificación puede complicarse porque las lectinas no solo difieren cuando provienen de diversas plantas, sino también entre variedades y cultivares de una misma especie, presentando propiedades diferentes que requieren modificaciones del procesamiento utilizado (Jaffé, 1980).

Para analizar los diversos pasos del proceso de purificación de lectinas y caracterizarlas se utilizan la electroforesis en gel de poliacrilamida lineal o en gradiente, en condiciones nativas o reductoras (Laemmli, 1970; Caron y Faure, 1983); la doble inmunodifusión y la inmunolectroforesis cruzada (Ory *et al*, 1981).

Una vez purificada, la lectina se encuentra en la solución con la que se eluyó de la columna cromatográfica de afinidad, en la mayoría de las veces en concentraciones bajas, es necesario entonces dializarla, ya que los buffers de elución son de pH bajo o contienen el azúcar inhibidor de la lectina. Se cambian entonces a buffers adecuados para mantener la estabilidad de la molécula y que hagan posible la disolución de la lectina después de la liofilización. Muchas veces las lectinas pierden

actividad al liofilizarlas por lo que se utiliza entonces la concentración por ultrafiltración. El almacenamiento final se realiza siempre a baja temperatura y se le añaden inhibidores de crecimiento bacteriano para su conservación.

El objetivo de esta primera parte del trabajo, fue obtener la lectina purificada, conocer sus propiedades relevantes al presente estudio y mantenerla estable por el tiempo necesario para realizar las pruebas pertinentes.

Materiales y Métodos

Extracción

La semilla de A. cruentus fue proporcionada por el Dr. Sánchez Marroquín del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (Chapingo, Mex.). La extracción de la lectina de las semillas fue realizada en la misma forma que la de A. leucocarpus (Calderón de la Barca et al, 1985a). El extracto crudo conteniendo la lectina fue clarificado usando papel de fibra de vidrio (Whatman GF/A) y almacenado a 4°C hasta su uso.

La concentración de las soluciones proteicas se determinó por el método de Lowry (Lowry et al, 1951).

Ensayo de Hemaglutinación

Para detectar la actividad aglutinante en el extracto crudo y en los diversos pasos de la purificación, se utilizó una modificación del método de doble dilución seriada (Jaffé, 1980). Se tomaron muestras de 25 µl y se depositaron en la placa de aglutinación, diluyéndose en la forma usual con PBS (buffer

salino de fosfatos $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.02 M, NaCl 0.9% pH 7.4), se añadieron entonces 25 μl de suspensión de eritrocitos ABO al 2% a cada pozo. El título de hemaglutinación fue definido como el inverso de la máxima dilución que mostraba aglutinación visible a los 30 min. La actividad específica se calculó dividiendo el título entre la concentración de proteína en mg/ml.

Especificidad química

Las pruebas de inhibición se realizaron haciendo las diluciones de 25 μl de la muestra en soluciones de azúcares 0.1 M ó fetuina al 1%; después de 40 min, se añadieron a cada dilución 25 μl de suspensión de eritrocitos al 2% y determinado el título en la forma antes descrita. Los azúcares utilizados fueron N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, D-galactosa, D-manosa, L-fucosa y ac. acetilneuramínico.

Purificación

Se acoplaron 700 mg de fetuina tipo III a 15 ml de gel de agarosa activada con sulfonato de divinilo (Mini-Leak de Kem En Tec). El procedimiento para acoplar la lectina se realizó de acuerdo o como lo indica Kem En Tec. (Hellerup, Dinamarca). El gel así preparado, fue empacado en una columna de cromatografía de 12 x 1.1 cm y lavado varias veces con PBS, Glicina-HCl 0.1 M pH 2.5 y Glicina NaOH 0.1 M pH 9, equilibrándose finalmente con PBS. Se inocularon 40 ml de extracto crudo a la columna, lavándose con 10 volúmenes de PBS y eluyéndose la lectina unida con 3.5 volúmenes de glicina-HCl pH 2.5.

Caracterización parcial

Se tomaron muestras conteniendo entre 100-150 μg de proteína y se precipitaron con 9 volúmenes de acetona fría; al cabo de 2 h a 4°C , se centrifugaron las suspensiones a 5000 rpm en una centrifuga Damon/IEC. Los precipitados fueron resuspendidos en buffer de Laemmli para muestras y cargados en un gel al 15% de poliacrilamida para electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970).

Estabilidad

Tratamiento con calor húmedo. Se incubaron cinco muestras de la lectina purificada en concentración de 0.8 mg/ml, en baño de agua a 30, 40, 45, 55 y 60°C durante 15 min. Inmediatamente después de la incubación, se midió la actividad hemaglutinante.

Buffers de almacenamiento Las soluciones con la lectina purificada eluidas de la columna cromatográfica, fueron dializadas contra los siguientes buffers: $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 0.05 M pH 4.8, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.02 M pH 7.2 y $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0.05 M pH 9; se almacenaron a 4°C durante 7 días, midiendo la actividad hemaglutinante cada día.

Actividad hemaglutinante a diferentes pH's. Se midió la actividad aglutinante de las soluciones de lectina purificada (0.8 mg/ml), haciendo las diluciones en Glicina-HCl/Glicina-NaOH desde pH 3.5 hasta pH 8.5. La hemaglutinación fue determinada con eritrocitos tratados con glutaraldehído (Ochoa y Kristiansen, 1978).

Concentración. Se concentraron 100 ml de una solución de lectina purificada por ultrafiltración utilizando un sistema Amicon (Mod 400) con membrana PM10. Se tomaron muestras cuando la solución estuvo concentrada 2, 4 y 10 veces su volumen inicial, a dichas muestras se les determinó el título de hemaglutinación.

Resultados y Discusión

La Tabla 1.1 muestra que la lectina de A. cruentus tiene especificidad por N-acetilgalactosamina únicamente, esta es una característica importante debido a que otras lectinas conocidas que son específicas para N-acetilgalactosamina, también reconocen D-galactosa (ejemplos: las lectinas de Dolichus biflorus, Sophora japónica y soya), como lo reportan Goldstein y Hayes (1978). La lectina de A. cruentus reconoce N-acetilgalactosamina en carbohidratos y glicoproteínas complejas como la fetuína (Tabla 1.1). Las anteriores lectinas con doble especificidad han sido utilizadas para el análisis histológico de células parietales de la mucosa gástrica humana (Kessimian et al, 1986), indicando la prevalencia de uno o ambos residuos carbohidrato en las glicoproteínas de la membrana celular.

TABLA 1.1 Especificidad química de la lectina de Amaranthus cruentus.

Inhibidor	Título
Ninguno	32
D-Galactosa	32
N-Acetil-D-Galactosamina	4
N-Acetil-D-Glucosamina	32
D-Manosa	32
L-Fucosa	32
Ac. N-acetilneuramínico	32
Fetuína	0

El método para purificar la lectina de A. cruentus, fue diseñado en base a la propiedad de la lectina de unirse a fetuína, como puede observarse en la Fig. 1.1 una gran proporción de las proteínas del extracto crudo no se unen a la fetuína de la matriz cromatográfica, mientras que la fracción "d" que sí se une químicamente, es eluida con facilidad al bajar el pH y presenta títulos de hemaglutinación directamente proporcionales a la concentración de lectina eluida. En la Tabla 1.2 se incluyen títulos de hemaglutinación, contenido de proteínas, actividades específicas y rendimientos del extracto crudo y las dos fracciones cromatográficas. La pureza de la lectina aumenta desde 5.62 hasta 101.59 unidades en actividad específica, lo que resulta en un factor de purificación de 18 veces. La actividad aglutinante es recuperada por completo, indicando un método muy eficiente y sencillo consistente en un solo paso.

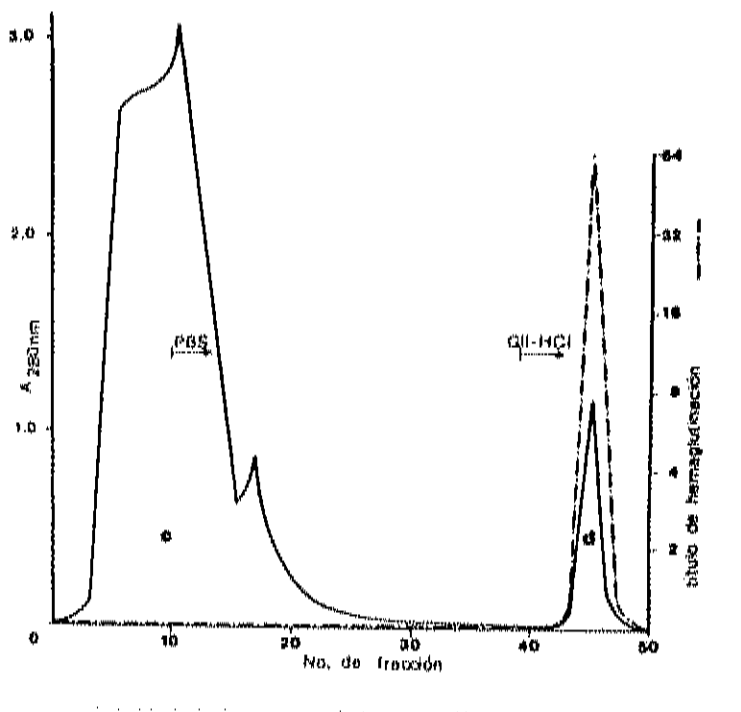


Figura 1.1 Purificación de la lectina de *A. cruentus* por cromatografía de afinidad en Mini Leak-Fetúna. (c) fracción no enlazada (d) lectina purificada.

TABLA 1.2. Rendimientos en la extracción y purificación de la Lectina de *A. cruentus* en Mini Leak-Fetúna.

Fración ^a	Título	Proteína (mg/ml)	Actividad específica	Proteína (%)	Factor de Purificación
Extracto crudo (b)	32	5.69	5.62	100	1
Fración no enlazada (c)	0	1.72	0	95.45	0
Fración enlazada (d)	64	0.63	101.59	4.32	18.07

^a De 4 g de semilla

Como muchas otras lectinas, la de amaranto es termolábil al tratamiento con calor húmedo; no se ha estudiado su resistencia a calor seco, pero es característica común de las lectinas de muchos cereales como maíz y arroz el mantenerse activas bajo este tipo de tratamiento (Nachbar y Oppenheim, 1980).

El indicador utilizado para medir la estabilidad de la lectina, fue la capacidad de hemaglutinación, ésta se mantiene mejor abajo de 30°C, a mayor temperatura la actividad se pierde gradualmente (Tabla 1.3).

TABLA 1.3. Efecto del tratamiento con calor húmedo sobre la estabilidad de la lectina de amaranto.

Temperatura (°C)	Título
4	32
30	32
40	16
45	4
55	4
60	0

La Tabla 1.4 muestra la influencia del pH en la actividad de la lectina, los títulos de hemaglutinación mas altos a pH's arriba y abajo de 5, son debidos probablemente a la inactivación que sufre la lectina en su punto isoeléctrico. Se sabe que la lectina de A. leuocarpus tiene un punto isoeléctrico cercano al pH 5 (Calderón de la Barca et al, 1985b).

TABLA 1.4. Efecto del pH sobre la actividad de la lectina de A. cruentus.

pH	Título
3.5 - 4.5	32
5.0 - 5.5	8
6.0	16
7.5 - 8.5	32

El conocimiento sobre las condiciones de almacenamiento, es importante porque las lectinas son ampliamente usadas como instrumentos para el aislamiento y purificación de glicoproteínas, así como en la determinación de estructuras carbohidrato. Se encontró que la lectina de A. cruentus retiene su actividad biológica al menos 7 días en buffer de acetatos a 4° C (se ha mantenido activa por mas de 3 meses en este buffer); el buffer de carbonatos la inactiva en 2 días y el de PBS y el de Glicina-HCl la hacen perder parcialmente su actividad después de dos días (ver Tabla 1.5). Es útil saber de la estabilidad temporal de la lectina a pH's extremos, porque para inmovilizar lectinas en un gel de afinidad o acoplarlos a marcadores radioactivos y de fluoresceína, se requiere pH cercano a 9 por cortos períodos de tiempo.

TABLA 1.5. Efecto del buffer de almacenamiento sobre la estabilidad de la lectina de A. cruentus

Buffer	pH	Título de hemaglutinación día		
		2	4	7
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	9.0	32	2	0
Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	7.2	32	16	16
CH ₃ COONa/CH ₃ COOH	4.8	32	32	32
Glicina - HCl	2.5	32	16	16

Es posible concentrar la lectina de A. cruentus hasta 10 veces por ultrafiltración sin reducción de su actividad biológica, como se muestra en la Tabla 1.6. Este procedimiento es mejor que liofilizarla o precipitarla con sulfato de amonio, métodos por los cuales hay pérdida de actividad (no se muestran datos). Además, la ultrafiltración es un método rápido y que se puede utilizar para cambiar de buffer.

TABLA 1.6. Estabilidad de la lectina de A. cruentus después de la ultrafiltración en Amicon PM-10

Veces que se concentró ^a	Proteína (mg/ml)	Título
Control	0.71	64
2	1.32	128
4	2.52	256
10	6.23	512

^aSolución de lectina de amaranto purificado por cromatografía de afinidad.

La Fig. 1.2 presenta el gel de electroforesis en poli-acrilamida con SDS (dodecil sulfato de sodio) del extracto crudo (b) y las fracciones de la cromatografía (c y d) de afinidad; la muestra (d) presenta una sola banda correspondiente a 32,500 daltons, la cual se puede observar en el extracto crudo (b), pero no aparece en la fracción no ligada al gel (c), indicando la eficiencia del proceso de purificación, el cual prácticamente se realizó en un solo paso por cromatografía de afinidad.

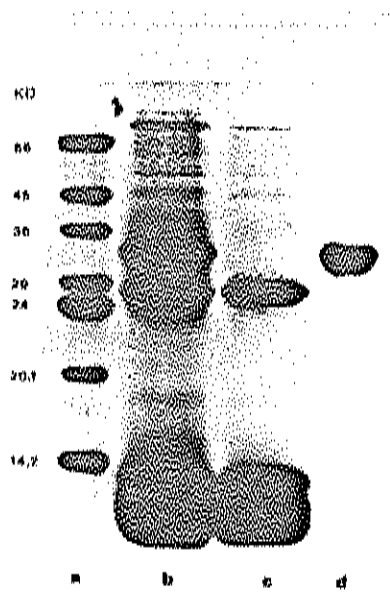


Figura 1.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS, de la purificación de la lectina de A. cruentus.
 a) Estándares de peso molecular, b) Extracto crudo,
 c) Fracción no enlazada, d) lectina purificada.

En esta forma es posible aislar, purificar y mantener activa la lectina de A. cruentus. Conociendo los parámetros medidos aquí, se puede continuar el trabajo del efecto fisiológico de la lectina sobre el tracto gastrointestinal.

CAPITULO 2.

INTERACCION DE LA LECTINA DE Amaranthus cruentus CON LA MUCOSA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL IN VITRO

Introducción

El tracto gastrointestinal está anatómicamente adaptado para sus funciones, los órganos que lo conforman tienen paredes estratificadas en la siguiente distribución general: la capa serosa, la muscularis y la submucosa, rodeando una capa interna de mayor importancia nutricional llamada mucosa.

La mucosa del estómago, tiene una estructura distintiva dependiendo de la región que recubra; al borde del esófago están las glándulas del cardias, alargadas y muy juntas. En la región distal a la mucosa del cardias (fundus) y en el cuerpo, se encuentran las glándulas oxínticas ocupando el 80% de la superficie de la mucosa gástrica, estas glándulas tienen células parietales u oxínticas que secretan ácido y factor intrínseco en humanos y las células principales o pépticas que secretan pepsinógeno. La porción distal del estómago, el antrum, incluye glándulas pilóricas con células endócrinas que desprenden gastrina en la sangre. Las células superficiales de la mucosa gástrica completa, secretan moco, bicarbonato y otro pepsinógeno (grupo II). El estómago también contiene otras células endócrinas, en particular células de somatostatina en el antrum (Walsh 1984).

La mucosa del intestino delgado recubre sus tres regiones: el duodeno en la parte superior, el yeyuno en la media y el íleon en el bajo abdomen. Desde la mucosa hacia el lumen se extienden los pliegues circulares con protuberancias alargadas llamadas vellosidades, que están cubiertas con un epitelio de una célula de grueso de dos tipos principales; caliciformes, que secretan una mucosidad protectora y células absortivas para digestión y absorción de nutrimentos; las vellosidades tienen en su interior vasos sanguíneos y linfáticos que transportan los nutrientes hacia el cuerpo. La estructura más distintiva de las células absortivas es un borde estriado (borde de cepillo), compuesto de pequeñas microvellosidades cuyo interior está constituido por un conjunto de fibras estructurales y una membrana celular muy rica en carbohidratos, llamada el glicocalix, con extensiones de membrana en forma de fibras finas (Moog, 1981), que imparten movimiento para incrementar la absorción de nutrientes por medio de la agitación (Lehninger, 1982).

Para estudiar un tejido en el microscopio se preparan cortes del mismo por diversos métodos, siendo el de la parafina el más común. El tejido debe tomarse y fijarse lo antes posible después de la muerte del animal, luego se deshidrata con alcoholes, se aclara con xilol y se incluye en parafina (Ham, 1967).

La hematoxilina es el reactivo de tinción más utilizado en histología en dos formas básicas de tinción; una de ellas, la

progresiva, emplea una solución que contiene un exceso de sales de aluminio o de ácido, incrementando así la selectividad por el núcleo, después de teñidos. En el método regresivo, las secciones son sobreteñidas en una solución neutra de hematoxilina, lavadas con una solución ácida de alcohol, y neutralizadas con una solución alcalina; en esta forma el citoplasma se colorea bien y las sustancias nucleares son claramente visibles (Luna, 1968).

Para estudiar componentes celulares que no se diferencian con los métodos convencionales de tinción se utilizan frecuentemente los métodos inmunohistoquímicos, estos métodos están basados en la reacción de los anticuerpos con los antígenos, formando complejos muy estables (Cooper, 1977), los cuales pueden ser detectados por microscopía de fluorescencia si el anticuerpo fue conjugado con una sustancia fluorescente.

En los últimos años, se han utilizado las lectinas en estudios histoquímicos como reactivos específicos y sensibles (Lis y Sharon, 1986), ya sea directamente con la lectina conjugada con biotina, fluoresceína, oro coloidal o peroxidasa; o con un método indirecto, marcando los anticuerpos preparados contra la lectina específica.

Las lectinas se usan también en estudios bioquímicos de los glicoconjugados presentes en los tejidos. El método consiste en extraer los glicocomponentes, separarlos en un gel de poliacrilamida y detectar componentes específicos basándose en su reactividad con ciertas lectinas marcadas, o indirectamente



uniendo primero la lectina y después incubando el gel con una solución de anticuerpos marcados. La sensibilidad del método puede incrementarse y la manipulación facilitarse, si se hace una transferencia electroforética de los componentes en el gel de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa (blotting), haciendo la detección de glicoproteínas específicas sobre este último (Uehara et al, 1986).

La metodología diseñada en esta parte del estudio tenía como finalidad: preparar anticuerpos y lectina marcados para el análisis histoquímico y de receptores, y estudiar las células (y sus receptores específicos) de la mucosa gastrointestinal que reaccionan con la lectina de A. cruentus.

Materiales y Métodos

Preparación de anticuerpos antilectina de A. cruentus.

La lectina parcialmente purificada (1 mg) y emulsificada en solución completa de Freund, fue inyectada intramuscularmente en un conejo de 3 Kg, siguiendo un protocolo típico para producción de anticuerpos descrito por Maurer y Callahan (1980), un mes después se le inyectaron otros 0.5 mg de la lectina para amplificar la respuesta. A 10 días de la última inyección, se empezó a sangrar el animal por la vena de la oreja, se separó el suero por centrifugación a 3000 rpm (Damon CRU-5000) durante 10 min. y se determinó la actividad de los anticuerpos obtenidos por inmunodifusión doble en gel de agarosa al 1%, tiñendo las bandas de precipitación con azul de Coomassie, por el método de Ouchterlony, como se describe por Johnson (1986).

Conjugación con fluoresceína

La lectina de A. cruentus purificada y los anticuerpos antiamaranto fueron conjugados con fluoresceína por la técnica de Hurn y Chantler (1980), se ensayó de nuevo la actividad por inmunodifusión doble, así como actividad hemaglutinante de la lectina marcada.

Preparación de los cortes histológicos del tracto gastrointestinal.

Se sacrificaron 4 ratas macho de 200 g de peso dietadas 24 h, anestesiándolas con éter y cortando la yugular, se disectaron y se les extrajo el tracto gastrointestinal completo, se tomaron secciones del cuerpo del estómago, duodeno, yeyuno e íleon que fueron fijados durante 24 h en formalina al 4%, embebidos en parafina y cortadas en secciones de 4 μ m de grueso (Hamm, 1967).

Tinción de cortes histológicos con hematoxilina-eosina (HE).

Una vez desparafinizados, los cortes de la mucosa gastrointestinal, fueron teñidos por el método regresivo de Harris con hematoxilina y eosina HE, como se describe por Luna (1968) y se montaron para observarlos al microscopio óptico.

Tinción de cortes histológicos en la lectina de A. cruentus.

Los cortes de mucosa gastrointestinal preparados por el método antes descrito, fueron desparafinizados e incubados durante 18 h a 4°C tanto con la lectina marcada como con la lectina sola; en el caso del procedimiento indirecto, los cortes

tratados con la lectina sola fueron incubados durante 30 min a temperatura ambiente, con los anticuerpos anti-lectina marcados con fluoresceína. Se lavaron 3 veces las preparaciones con PBS conteniendo 1% de albúmina bovina, antes de hacer el montaje y observar al microscopio de fluorescencia (Peschke y Kuhlmann, 1985). Se hicieron controles de la lectina en presencia de fetuina y con anticuerpos marcados en cortes sin la lectina.

Extracción de glicoproteínas y electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Extracción de glicoproteínas. Muestras frescas de estómago, duodeno, yeyuno e ileon de 3 ratas macho de 250 g de peso, tratadas en la misma forma que para cortes histológicos, fueron lavadas con NaCl al 0.9 % y raspada la mucosa con un bisturí. Los raspados de mucosa fueron suspendidos en 10 vol. de buffer de extracción (Tris 10 mM, CaCl₂ 1 mM, NaCl 0.9% pH 7.3, conteniendo tritón X-100 al 1%, fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) 2 mM y 1% de etanol) y fueron tratados posteriormente de acuerdo al procedimiento usado por Fischer (1983), con la única modificación de añadir PMSF 2 mM cada 30 min para inhibir proteólisis.

Electroforesis en gel de poliacrilamida. Los extractos de la mucosa fueron precipitados con acetona 1:10 en frío y después de 18 h, resuspendidos en buffer para muestras de Laemmli y cargados en un gel de poliacrilamida al 15% para electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970). En la mitad

del gel se cargaron 4 muestras correspondientes a mucosa de estómago, duodeno, yeyuno e íleon y un marcador de pesos moleculares, en la otra mitad, se repitió el mismo orden. Al terminar la electroforesis, el gel fue cortado en dos partes y una de ellas teñida con azul de Commassie por la técnica de rutina (Laemmli, 1970).

Detección de receptores protéicos para la lectina. La mitad del gel sin teñir del apartado anterior, una vez lavado con PBS + 1% de albúmina, fue puesto a incubar con la lectina marcada con fluoresceína durante una noche a 4°C, lavado con PBS + 1% de albúmina y observado en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP mod TL-33).

Resultados y Discusión

Preparación de anticuerpos

La Fig. 2.1 corresponde a las placas de inmunodifusión doble de Ouchterlony para el antisuero antiamaranto (A), contra la lectina de amaranto en concentración de 0.8, 0.4, 0.2 y 0.1 mg/ml correspondientes a los pozos (1), (2), (3) y (4) o contra el extracto crudo de amaranto (5), la fracción no enlazada (6) y la que sí se enlaza a la columna cromatográfica (7). Se observan dos líneas de precipitación con el extracto crudo, una que se fusiona completamente con la línea formada contra la fracción cromatográfica no enlazada y otra que se fusiona con la de la lectina purificada, no hubo continuidad entre 6 y 7 lo que indica la falta de identidad inmunológica entre la lectina y las demás proteínas del extracto crudo.

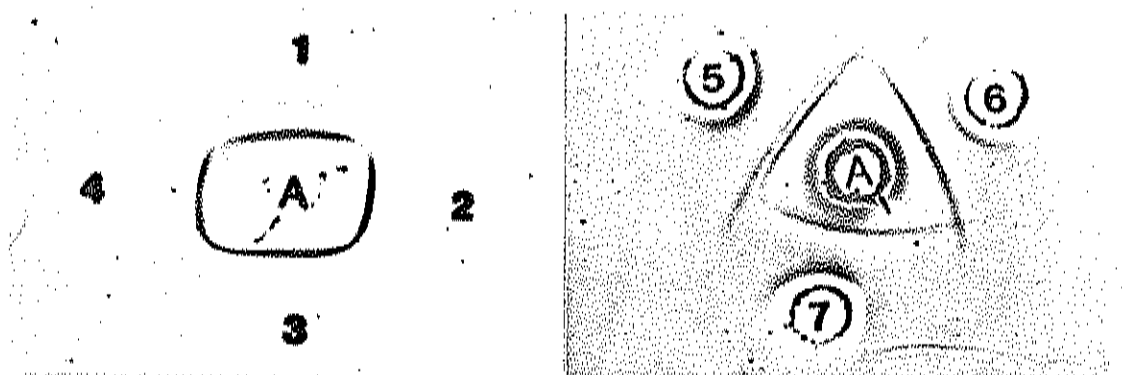


Figura 2.1 Patrón de inmunodifusión doble del antisuero antiamaranto (A), contra la lectina purificada en concentraciones de 0.8, 0.4, 0.2 y 0.1 mg/ml (pozos 1, 2, 3 y 4) y contra el extracto crudo (5), la fracción no enlazada (6) y la lectina (7) obtenida por cromatografía de afinidad.

Con el antisuero preparado es posible detectar hasta 1.0 μ g de la lectina y no pierde la actividad inmunológica al ser conjugado con fluoresceína. Así mismo, la lectina conserva su propiedad hemaglutinante después del acoplamiento a fluoresceína.

Células que enlazan la lectina de A. cruentus en la mucosa del tracto gastrointestinal.

El patrón característico del enlace de la lectina de A. cruentus a los diversos tipos celulares de la mucosa gástrica normal de las ratas está resumido en la Tabla 2.1, comparándose con el de otras lectinas cuya especificidad es para grupos galactosilo y galactosaminilo.

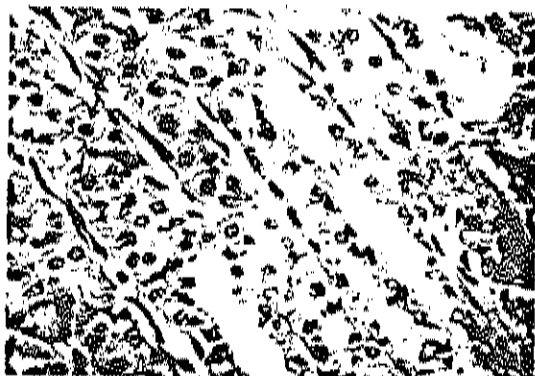
En la mucosa gástrica, el citoplasma de las células parietales se observa fuertemente teñido (Fig. 2.2) debido a la

TABLA 2.1. ESTUDIOS HISTOLOGICOS DE LA MUCOSA GASTRICA CON LECTINAS ESPECIFICAS PARA GRUPOS GALACTOSILO Y GALACTOSAMINILO

FUENTE DE LECTINA	ESPECIFICIDAD	CELULAS DE LA MUCOSA GASTRICA						CITA
		Superficiales	Istmo folicular	Cuello	Parie-tales	Princi-pales	Glándula pilórica	
<u>Aureanthus cruentus</u>	DGal NAC	-	-	+	+++	-	-	+
<u>Arachis hypogaea</u>	β-DGal	-	++	++	+++	+++	-	A
	DGal NAC	-	-	++	+++	++	-	B
	DGal	+	-	++	++	-	+	C
<u>Dolichus biflorus</u>	α-DGal NAC	-	-	+	+	-	-	D
	α-DGal	-	-	-	+++	++	++	B
	α-DGal NAC	-	-	+	-	-	+	C
	α-DGal	+	-	+	++	+	-	E
<u>Bandeiraia simpli-cifolia</u>	α-DGal	-	-	-	+++	-	-	B
	α-DGal NAC	-	-	-	+++	-	-	B
<u>Ricinus communis</u>	β-DGal	+++	++	+	+	+++	-	A
	α-DGal	+	-	+	++	+	-	E
	DGal NAC	-	-	+	++	-	-	C
<u>Glycine max</u>	α-DGal NAC	-	-	-	+++	-	-	B
	α-DGal	-	-	+++	+++	+++	+++	C
	β-DGal NAC	++	-	+	+	+	-	E
<u>Helix pomatia</u>	α-DGal NAC	+++	+	+	+++	-	+	A
	α-Glc NAC, α-gal	-	-	-	-	-	-	-

A: Fischer et al, 1983 (humanos) B: Kesslian et al, 1986 (humanos)
 C: Suganuma et al, 1984 (ratas) D: Peschke y Kuhnmann, 1985 (ratas)
 E: Ito et al, 1985 (humanos) *: Resultados de este estudio (ratas)
 En los apartados en donde no hay indicación, significa que no fueron estudiadas esas secciones.
 El número de (+) indica la intensidad de la tinción y (-) indica que se estudió y no se encontró positividad

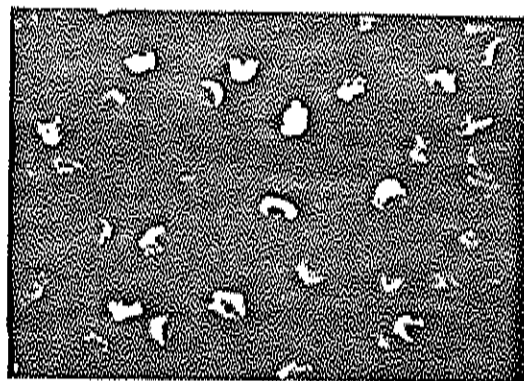
presencia de gran cantidad de receptores para la lectina de amaranto, así como lo reportan varios autores (Tabla 2.1), para otras lectinas de especificidad similar; mientras que en las mismas glándulas gástricas hay células del cuello menos teñidas. La mucosa del intestino delgado presenta un patrón de tinción mas debil definiendo el epitelio columnar (Fig. 2.3), esta distribución también corresponde a la encontrada para otras lectinas biespecíficas como Dolichus biflorus, Arachis hypogaea y Ricinus comunis (Fischer et al, 1983; Peschke y Kuhlmann, 1985).



320x

Figura 2.2a

Microfotografía mostrando las glándulas fúndicas de la mucosa gástrica de rata. Se señala en el lado izquierdo de la figura una célula parietal típica con citoplasma gris y núcleo oscuro.



320x

Figura 2.2b

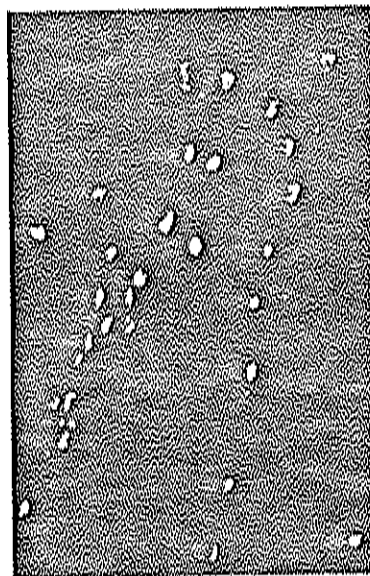
El citoplasma de las células parietales se destaca en tono claro sobre el fondo oscuro, después de incubarlo in vitro con la lectina de amaranto fluoresceínada.



320x

Figura 2.3a

Microfotografía de una sección de yeyuno de rata que muestra las vellosidades delimitadas por una capa de células epiteliales.



320x

Figura 2.3b

Algunas de las células del epitelio columnar del yeyuno, fluorescen después de incubar el tejido con la lectina de amaranto conjugada y se observan aquí sobre el fondo oscuro.

Extracción y caracterización de receptores.

En la Fig. 2.4 se pueden observar las bandas correspondientes a la mucosa gastrointestinal teñidas con azul de Coomassie, en la mucosa estomacal (a), hay una gran cantidad de glicoproteínas secretoras tal y como lo reportan Fischer y colaboradores (1983). Para duodeno (b), yeyuno (c) e ileon (d), la distribución va cambiando hasta quedar casi solo glicoproteínas de bajo peso molecular.

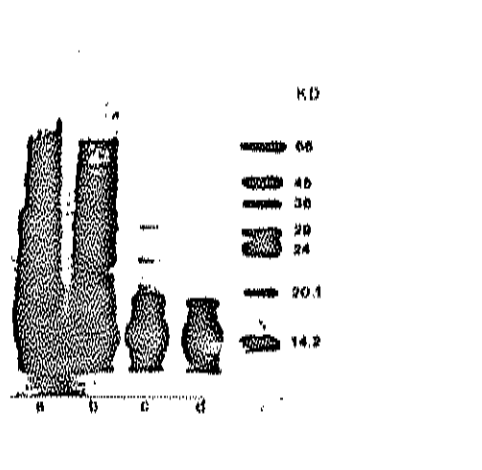


Figura 2.4 Patrón electroforético de las proteínas de la mucosa gastrointestinal, en gel de poliacrilamida al 15% en SDS, teñidas con azul de Coomassie.
 a) Mucosa de estómago, b) duodeno, c) yeyuno, d) íleon y e) marcadores de peso molecular.

Cuando la otra mitad del gel fue incubado con la lectina fluoresceinada, esta solo interacciona con la mucosa gástrica y específicamente con una banda de aproximadamente 17 KD (Fig. 2.5). No se puede decir que esta glicoproteína sea la única estructura de enlace para la lectina de amaranto en la mucosa gastrointestinal, ya que el método utilizado no es lo suficientemente sensible para detectar otros glicoconjugados que se encuentren en menor concentración.

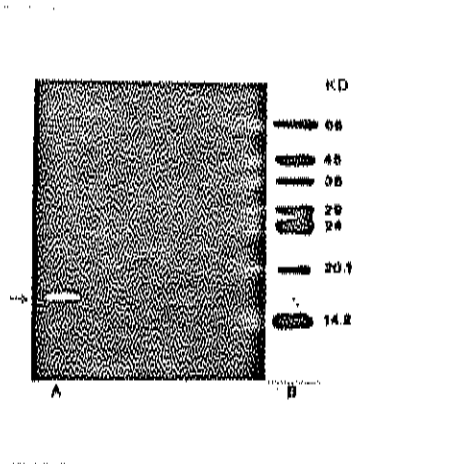


Figura 2.5 Glicoproteínas de mucosa gastrointestinal, receptoras específicas para la lectina de amaranto. La banda en A (señalada con una flecha), corresponde a una glicoproteína de mucosa gástrica unida a la lectina. En B, están las proteínas marcadoras de peso molecular.

En esta forma el objetivo planteado en este capítulo ha sido alcanzado: se obtuvieron anticuerpos que pueden detectar las proteínas del extracto crudo, incluyendo la lectina de amaranto, aun cuando esta se encuentre en muy baja concentración y que pueden ser utilizadas como herramientas para detectar la presencia de solo la lectina. Se prepararon conjugados de lectina y anticuerpo con fluoresceína y fueron éstos utilizados con efectividad, para detectar in vitro células y sus glicoproteínas receptoras específicas para la lectina, en el tracto gastrointestinal.

CAPITULO 3.

EFEECTO DE LA LECTINA DE Amaranthus cruentus SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE PROTEINAS in vitro.

Introducción

Cuando las lectinas son ingeridas por vía oral pueden causar toxicidad solo si resisten la digestión; las diferencias en susceptibilidad a la digestión, pueden estar relacionadas a las variaciones en su acción tóxica (Jaffé, 1980). Por otra parte, si las proteínas dietarias o los productos de su digestión parcial llegan hasta las células epiteliales del intestino, pueden modificar las funciones absortivas o secretoras e interferir con la utilización nutricia de la dieta. Cuando una lectina es resistente a proteólisis puede enlazarse al glicocalix o glicoproteínas de membrana, inhibiendo las dipeptidasas o la enteroquinasa que activa los zimógenos producidos por el pancreas (Pusztai, 1985).

El proceso de digestión normal de proteínas en el tracto gastrointestinal comienza cuando éstas entran al estómago, entonces se estimula la secreción de la hormona gastrina, que a su vez estimula la producción de ácido clorhídrico en las células parietales de las glándulas gástricas y del pepsinógeno en las células principales (Walsh, 1984). El jugo gástrico tiene un pH entre 1.5 y 2.5 que actúa como un antiséptico y además desnaturaliza a las proteínas globulares, en forma tal, que los enlaces peptídicos internos puedan quedar accesibles a la

hidrólisis enzimática. El pepsinógeno, por autocatálisis, es convertido en pepsina la cual hidroliza los enlaces peptídicos de las proteínas ingeridas, a nivel estómago. Cuando el contenido gástrico acidulado pasa al intestino, su pH estimula la secreción de la secretina en la sangre, esta hormona estimula al páncreas a secretar bicarbonato al intestino delgado, para neutralizar el HCl gástrico; el pH sube entonces de 2 a 7. La entrada de proteínas al duodeno estimula la secreción de enzimas proteolíticas y peptidasas, cuyo pH óptimo está entre 7-8. Las células exócrinas del páncreas producen los zimógenos de tripsina, quimiotripsina y carboxipeptidasa. Cuando el tripsinógeno penetra al intestino delgado, es convertido en tripsina por la enteroquinasa. También la tripsina producida puede transformar al tripsinógeno y al quimiotripsinógeno en sus formas activas. Debido a que la pepsina, la tripsina y la quimiotripsina tienen diferente especificidad para hidrolizar enlaces peptídicos, la degradación es bastante completa. Además en el intestino, los péptidos cortos son hidrolizados a aminoácidos libres por otras peptidasas como carboxipeptidasa y aminopeptidasas (Lehninger, 1982). Este último tipo de enzimas, se encuentra fija a la membrana microvellosa del borde de cepillo como glicoproteínas integrales (Moog, 1981).

Los péptidos pequeños como di y tripeptidos producidos, por la digestión enzimática, son absorbidos directamente por las células epiteliales del intestino, mientras que los aminoácidos libres cuentan con cuatro sistemas de transporte activo, de

acuerdo a su configuración, son reconocidos por un acarreador y transportados hacia el interior de las células contra un gradiente de concentración que requiere energía (Moog, 1981). Finalmente a través de los vasos capilares de las microvellosidades, son transportados al hígado (Lehninger, 1982).

Thompson y colaboradores (1986), demostraron que hay lectinas que tienen una acción directa sobre las enzimas digestivas. Al digerir con pepsina y pancreatina mezclas de caseína o de albúmina bovina conteniendo lectina de frijol; ellos encontraron que la lectina puede disminuir la digestibilidad de las proteínas independientemente de la composición de aminoácidos. En forma independiente, Erickson y colaboradores (1985) y Higuchi et al (1984), reportan que las lectinas de frijol y germen de trigo disminuyen la actividad de las aminopeptidasas asociadas a membrana del borde de cepillo cuando estas enzimas son extraídas y ensayadas in vitro.

Debido a que la digestibilidad es un factor importante que afecta la disponibilidad de los aminoácidos y los métodos para evaluarla in vivo son lentos y costosos, se han desarrollado procedimientos in vitro rápidos y confiables (Mozersky y Panettieri, 1983). Akesson y Stahmann (1964), aplicaron una técnica para evaluar la calidad de las proteínas in vitro utilizando pepsina y pancreatina; otros autores han trabajado con diversas enzimas proteolíticas para digerir proteínas animales o vegetales por separado o en mezclas (Satterlee et al, 1981). Entre los métodos de mayor aceptación está el de Satterlee y

colaboradores (1979), en donde la digestibilidad de las proteínas se calcula del pH obtenido después de la digestión in vitro del sustrato inicialmente a pH 8, con enzimas pancreáticas, intestinales y bacterianas. Este método correlaciona bien con los resultados in vivo solo para algunas clases de alimentos, ya que la caída del pH depende de otros factores diferentes a la hidrólisis producida (Mozersky y Panettieri, 1983), tales como la composición de aminoácidos y su capacidad de buffer al ser liberados en la hidrólisis por sus diferentes pK's influenciando el medio en donde continúa la proteólisis (Rothenbutler y Kinsella, 1985). El método de Stahmann (1975) utiliza pepsina y pancreatina seguido de un análisis de los aminoácidos hidrolizados, tomando así en cuenta la digestibilidad y la disponibilidad de los aminoácidos que se han hidrolizado vía digestión, parámetros básicos para evaluar la calidad nutricional de una proteína (Satterlee et al, 1981). En algunos laboratorios se realiza la digestión in vitro a pH constante y se mide el consumo de álcali para mantenerlo o la cantidad de nitrógeno α -amino producido, la cual es directamente proporcional al número de enlaces peptídicos rotos (Rothenbutler y Kinsella, 1985).

Los objetivos de esta fase experimental fueron: cuantificar la susceptibilidad de la lectina de A. cruentus a la digestión por las enzimas gastrointestinales y detectar si la lectina afecta la digestión de las proteínas dietarias en el tracto gastrointestinal.

Materiales y Métodos

Digestibilidad in vitro de caseína ANRC en presencia de la lectina de A. cruentus.

Se prepararon mezclas de caseína ANRC (87% proteína) con 0.072, 0.72 y 7.2 mg de lectina de A. cruentus, para hacer 72 mg totales correspondientes a 10 mg de nitrógeno con 0.1, 1.0 y 10% del mismo proveniente de la lectina, se prepararon controles con el buffer en que se encontraba la lectina y con caseína en las cantidades de 71.88, 71.38 y 65.75 correspondientes a las utilizadas en las mezclas caseína-lectina. Se procedió con la técnica de digestibilidad in vitro de Satterlee et al, tal como se describe en AOAC (1984).

Las medias de los valores de digestibilidad (%), fueron analizadas por una prueba de hipótesis para medias, a través de "t" con una confiabilidad $\alpha = 0.05$.

Antes y después de la proteólisis se midió la actividad aglutinante de las soluciones conteniendo la lectina, con el método descrito en el Capítulo 1.

Los productos (10 μ l) de cada una de las 3 digestiones fueron corridos en inmunodifusión doble de Ouchterlony contra 10 μ l del antisuero anti-amaranto diluido 5 veces con PBS.

Análisis electroforético de la proteólisis in vitro de albúmina, en presencia de la lectina de A. cruentus.

La proteólisis de albúmina bovina (Merck) in vitro con pepsina, así como de las mezclas de albúmina con 10% de la

lectina activa o con 10% de la lectina inactivada con calor (10 min, 90°C), se hizo con 110 mg de sustrato proteico y 1.5 mg de pepsina (de mucosa de estómago porcino 4500 U; Sigma) en 10 ml de HCl 0.1 N (pH 1.75), incubándose a 37.5°C en baño de agua, tomándose alícuotas de 200 μ l a los 90, 180 y 270 min, que fueron precipitadas en frío con acetona, centrifugadas y redisueltas en buffer para muestras y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 15% en SDS (como se describe en el Cap. 1). Se prepararon controles con albúmina sola, también con pepsina sola para comparar los patrones electroforéticos.

Para la proteólisis in vitro las proteínas fueron digeridas con pepsina durante 90 min como en el párrafo anterior seguida por la adición de 2 ml de NaOH 0.1N y 7.5 ml de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 8, conteniendo 4 mg de pancreatina (grado VI, 4x U.S.P. de páncreas de puerco; Sigma) y se incubaron a 37.5°C durante 3 h; tomándose al final una muestra de 200 μ l para análisis electroforético. Este modelo de proteólisis in vitro es básicamente el de Akeson y Stahmann (1984), con la modificación de que en éste se miden al final el incremento de grupos amino, y aquí se hace un análisis electroforético cualitativo.

Antes de empezar la digestión, a un tiempo de 3 h y al final de la proteólisis con pancreatina; se midió la actividad aglutinante de las mezclas, con eritrocitos tratados con glutaraldehído (para evitar la lisis), como se describe en el Capítulo 1 para aglutinación a pH's extremos.

Resultados y Discusión

Digestibilidad in vitro de caseína en presencia de la lectina de A. cruentus.

Debido a que la técnica de digestibilidad in vitro de Satterlee, et al (AOAC, 1984), indica utilizar sustratos conteniendo 10 mg de nitrógeno; se disminuyó la cantidad de caseína correspondiente (72 mg), a 71.88, 71.38 y 65.75 mg para que al añadirle la lectina en proporciones de 0.1, 1.0 y 10% sumara 10 mg de nitrógeno total. Como no se sabía en qué grado se hidrolizaba la lectina y por tanto cual era su aportación para el cambio de pH, se determinó la variación de pH proporcionada por las tres diferentes cantidades de caseína sola, para detectar si había un efecto debido a la concentración. No se encontraron diferencias significativas (prueba de hipótesis para medias con $\alpha = 0.05$), entre valores de la digestibilidad de caseína en cantidad menor a 72 mg y el de 90.68% encontrado cuando este sustrato es 72 mg (Tabla 3.1). Este hecho es explicable considerando que el método estima la digestibilidad en función del cambio en pH, el cual se da debido a los diferentes pK's de los aminoácidos liberados y como se trata del mismo sustrato (caseína); la proporción entre aminoácidos, ácidos y básicos será la misma, independientemente de la cantidad de sustrato utilizado.

La actividad biológica de la lectina de A. cruentus es mejor preservada en buffer de acetatos (Capítulo 1), por esto al añadir la lectina al sustrato se agregaron también pequeñas

cantidades de iones acetato; así, se trabajaron tres controles conteniendo las tres cantidades de caseína utilizadas en el experimento con las concentraciones molares de acetato correspondientes. Al comparar cada promedio de digestibilidad estimada, cuando están presentes los acetatos, con la media de digestibilidad para caseína sola, se encuentra que son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$); indicando con esto, la interferencia de los acetatos en el cambio de pH dado por los aminoácidos liberados (Tabla 3.1). De nuevo, la explicación está en que el estimador de la digestibilidad es el pH y este puede ser afectado por diversos tipos de iones presentes en el sustrato. Este problema también se puede dar al probar por el método de Satterlee et al (AOAC, 1984) proteínas provenientes de diversas fuentes conteniendo diferentes iones con capacidad de buffer, en forma nativa.

En resumen, del análisis de resultados de la Tabla 3.1, se puede inferir que la lectina de A. cruentus no afectó la digestibilidad in vitro de la caseína con las enzimas proteolíticas provenientes del páncreas y que actúan a nivel del intestino delgado.

TABLA 3.1. Digestibilidad in vitro de caseína en presencia de lectina de A. cruentus.¹

CASEINA (mg)	ACETATOS (m Moles)	CONC. DE LECTINA (%)	pH FINAL	DIGESTIBILIDAD ² (%)
72.00	0.00	0.0	6.39	90.68 ^a
71.88	0.00	0.0	6.40	90.46 ^a
71.38	0.00	0.0	6.41	90.23 ^a
65.75	0.00	0.0	6.39	90.68 ^a
71.88	0.03	0.0	6.45	89.33 ^b
71.38	0.18	0.0	6.47	88.88 ^c
65.75	1.79	0.0	6.82	80.98 ^d
71.88	0.03	0.1	6.42	90.00 ^b
71.38	0.18	1.0	6.45	89.33 ^c
65.75	1.79	10.0	6.77	82.11 ^d

¹ Promedio de dos réplicas por determinación.

² Diferentes letras indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con una prueba de hipótesis a través de "t".

Es interesante constatar que la tripsina, la quimotripsina, la peptidasa y la proteasa con las que se realizó la proteólisis, no tienen ningún efecto sobre la lectina de amaranto puesto que es posible detectar la actividad aglutinante completa al final del experimento de digestibilidad. Además de la actividad aglutinante, en la Fig. 3.1 pueden observarse las bandas de precipitación formadas por los productos de digestión que contenían inicialmente 0.1% (A), 1% (B) y 10% (C) de lectina de amaranto en relación a la caseína presente, contra los anticuerpos antiamaranto; indicando que la lectina conservó la actividad inmunológica después del tratamiento enzimático.

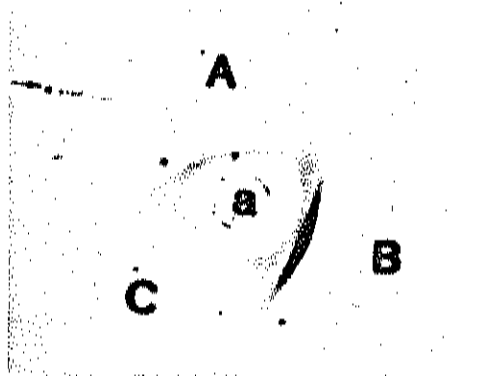


Fig. 3.1 Inmunodifusión doble de los hidrolizados de caseína conteniendo 10% (A), 1% (B) y 0.1 (C) de lactina, contra los anticuerpos anti-caroteno (a).

Análisis electroforético de la proteólisis in vitro.

Al analizar una electroforesis preliminar de caseína ANRC, se encontró que este producto además de estar parcialmente hidrolizado, presenta bandas correspondientes a pesos moleculares mayores que los de las caseínas de leche, que pueden ser agregados de éstas, o restos de otro tipo de proteínas que forman parte de la leche. Por tal motivo se modeló la digestibilidad para analizar por electroforesis, con una proteína purificada; la albúmina de suero bovino. Se cambió también la técnica de digestión debido a que se quería conocer el efecto de la pepsina que empieza la digestión de proteínas a nivel estómago y la técnica anterior no la considera.

La Fig. 3.2 muestra las bandas correspondientes a las mezclas de albúmina y pepsina (b), albúmina, lectina y pepsina (c), pepsina sola (d) y lectina + pepsina (e), después de 3h de digestión a 37°C. Aunque hay bandas que indican hidrólisis de la albúmina en (b y c) no se observa diferencia entre la mezcla que contiene lectina (c) y la que no la contiene (b); tampoco se vieron diferencias en degradación de albúmina entre los tiempos 1:30 h, 3:00 h y 4:30 h (no se muestra el gel). Se sabe que la digestión de proteínas en el estómago es parcial, aunque Thompson et al (1986) al cuantificar grupos amino liberados a las 3 h de una digestión de albúmina con pepsina encontraron un incremento del 38% con respecto a la cantidad inicial; a pesar de que la técnica de electroforesis no es para cuantificar, una proporción de hidrólisis del 38% es lo suficientemente grande para que se observe en electroforesis. Como dichos autores utilizaron una técnica colorimétrica solo con fines comparativos posiblemente haya habido interferencias que incrementaran la intensidad de la coloración, ocasionando valores altos. Aparentemente de acuerdo a los resultados de este análisis la albúmina se hidroliza muy poco con pepsina; aunque completamente con la acción secuenciada de pepsina y pancreatina, ya que desaparece en la electroforesis, al final del experimento; así se puede probar que su hidrólisis no se ve afectada por la lectina. En el experimento de Thompson et al antes mencionado hubo una pequeña depresión en la velocidad de digestión de la albúmina por pepsina en presencia de una lectina de frijol común. En esto último sí se puede coincidir ya

que una diferencia así (5%) no sería observable en electroforesis.

Por otro lado, para analizar el efecto de las enzimas sobre la lectina, en función de lo que muestra la Fig. 3.2. (líneas d y e), hay problemas de interpretación debido a que la pepsina y la lectina tienen prácticamente el mismo peso molecular (33 KD) y no se puede discernir una de otra, la única observación posible es la falta de bandas de bajo peso molecular en la línea correspondiente a la lectina, indicando la ausencia de productos de degradación. Esta última observación está apoyada por la determinación de la actividad aglutinante: tanto a las tres como a las seis horas de iniciado el experimento, la actividad biológica de la lectina se conserva.

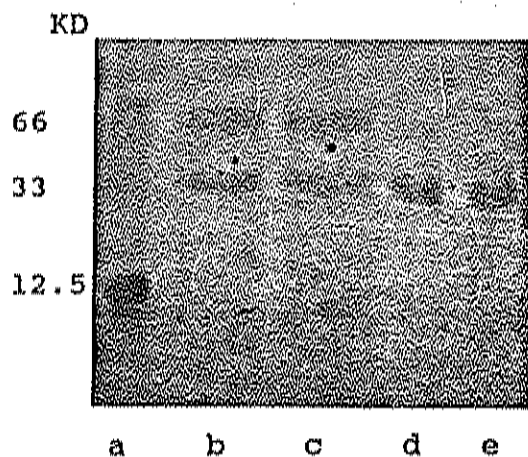


Fig. 3.2 Patrón electroforético de los productos de la digestión con pepsina a) estándar de pesos moleculares, b) albúmina y pepsina, c) albúmina, lectina y pepsina, d) pepsina sola y e) lectina y pepsina.

En conclusión, la lectina de A. cruentus no afecta la proteólisis de las proteínas dietarias y además las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal no tienen efecto sobre la lectina mezclada con otras proteínas en una proporción máxima del 10%; ya que la lectina se mantiene activa bajo tratamiento proteolítico por intervalos largos (6 h), bajo condiciones de pH y temperatura similares a los fisiológicos; haciendo factible una interacción como la que se modeló in vitro (Capítulo 2) consistente en el enlace de la lectina a ciertos tipos celulares que contienen las estructuras glicoconjugadas en la mucosa gastrointestinal.

CAPITULO 4.

EFECTO DE LA INGESTION DE LA LECTINA DE Amaranthus cruentus EN LA UTILIZACION DE PROTEINA Y LA MORFOLOGIA DE LA MUCOSA GASTROINTESTINAL DE RATAS.

Introducción

El patrón de aminoácidos de una proteína es el factor mas importante de su calidad, mientras que la biodisponibilidad de estos aminoácidos constituye la segunda variable en importancia. Para medir biodisponibilidad se utilizan los métodos de balance de nitrógeno clásicos (Kies, 1981). En los ensayos basados en el balance de nitrógeno, se determinan la ingesta y la excreción de nitrógeno en ratas alimentadas con la proteína de prueba o una dieta libre de proteína, para así calcular indirectamente la retención de nitrógeno. Estos ensayos, conllevan determinación de nitrógeno urinario, urinario endógeno, nitrógeno fecal y fecal del metabolismo; de forma tal, que es posible calcular digestibilidad aparente (DA), digestibilidad verdadera (DV), utilización neta de proteína (NPU) y valor biológico (BV) (Pellett y Young, 1980). La digestibilidad es la relación entre nitrógeno absorbido y nitrógeno ingerido, en la práctica la digestibilidad verdadera es mayor que la aparente, debido a que en la primera el valor de nitrógeno fecal se ve disminuido al restarle el nitrógeno fecal metabólico (Hopkins, 1981). El NPU se estima con la relación entre nitrógeno retenido y nitrógeno ingerido; y el valor biológico es nitrógeno retenido entre nitrógeno absorbido (Pellett y Young, 1980). En algunos casos,

el nitrógeno urinario puede ser usado como un indicador indirecto de la calidad proteica, ya que la excreción de nitrógeno en orina varía en forma proporcional con la ingesta de proteínas y se ha comprobado que el NPU correlaciona inversamente con nitrógeno urinario total y de urea en orina (Jansen, 1981).

Algunos de los factores antifisiológicos que acompañan a las proteínas dietarias de origen vegetal, provocan problemas en los métodos basados en la retención de nitrógeno; por un lado, los inhibidores de proteasas estimulan la secreción de jugo pancreático (Jaffé, 1980), por otro, las lectinas que se enlazan al borde de cepillo intestinal, lo desorganizan dando como resultado un recambio acelerado de células absortivas que contribuye apreciablemente a la pérdida de nitrógeno endógeno (Pusztai, 1985); debido a este problema la dieta libre de proteína no se puede utilizar para calcular digestibilidad ni valor biológico verdaderos (Oliveira et al, 1986).

A nivel microscópico, se han observado algunos fenómenos que explican la pérdida excesiva de nitrógeno endógeno, cuando se ha alimentado a animales experimentales con dietas conteniendo lectinas; Jindal y colaboradores (1984), observaron un número incrementado de células caliciformes y atrofia de las vellosidades en el duodeno de ratas alimentadas con soya; en la estructura mas fina, Rossi et al (1984) y Pusztai et al (1979), observaron que las microvellosidades de las células absortivas del yeyuno de ratas, eran mas escasas, cortas e irregulares, cuando sus dietas contenían lectina de frijol común.

Los objetivos planteados en esta última parte del estudio fueron: determinar el efecto de la ingestión de lectina de A. cruentus, sobre el tracto gastrointestinal de la rata, a nivel macroscópico con la estimación de NPU, y observar el efecto causado por la lectina en la mucosa gastrointestinal, con un análisis microscópico en cortes de tejido teñidos con HE (Capítulo 2) extraídos al término de la dieta.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 14 ratas macho Sprague Dawley de aproximadamente 200 g de peso, las cuales fueron enjauladas individualmente en jaulas metabólicas (NALGENE) en un bioterio a 26 C con luz regulada automáticamente para 12 h de luz alternadas con 12 h de oscuridad. Fueron alimentados ad libitum con dieta stock (LAB-BLOX de Wayne) antes de iniciar el experimento. La composición de la dieta basal se hizo de acuerdo al AOAC (1984), para lograr dietas equicalóricas conteniendo 10% de proteína (Tabla 4.1).

Balance de nitrógeno

Las ratas fueron divididas al azar en tres grupos de 5, 5 y 4 animales cada uno, al primer grupo se le dió la dieta basal y agua ad libitum, al segundo la dieta experimental cuya composición fue la de la basal mas 0.17% de la lectina de Amaranthus cruentus (que corresponde a la proporción de la lectina contenida en una dieta formulada al 10% de proteína, a partir de la semilla cruda de amaranto) y al último una dieta libre de N y agua

ad libitum, durante 6 días; se colectaron diariamente orina, heces y restos de las dietas. A la orina se le añadió HCl 2N hasta bajar el pH a 3 y se almacenó a 0°C. Las heces fueron secadas en estufa a 110°C y almacenadas en refrigeración a 4°C. Al séptimo día, las ratas fueron anestesiadas con eter y sacrificadas por corte de la yugular; se extrajeron estómago e intestino delgado, se tomaron secciones histológicas de estómago, duodeno, yeyuno e ileon y fueron fijadas en formalina al 4%.

Tabla 4.1 Composición de la dieta basal para evaluación in vivo de formulaciones experimentales.

Ingredientes	%
Aceite de maíz	8.0
Premezcla de vitaminas ¹	1.0
Premezcla de minerales ²	5.0
Celulosa	1.0
Agua	5.0
Caseína ANRC para hacer 10% de la dieta, almidón y sacarosa en partes iguales para hacer 100%	

¹ La premezcla de vitaminas provee g/Kg de dieta: ácido ascórbico 0.45, biotina 0.0002, pantotenato de calcio 0.03, colina 0.833, ácido fólico 0.0000, inositol 0.05, menadiona 0.02, niacina 0.04, PABA 0.05, piridoxina 0.01, riboflavina 0.01, tiamicina 0.01, vitamina A 8000 IU, vitamina B 120.01 mg, vitamina D 1000 IU y vit E 25 IU.

² La premezcla de minerales provee g/Kg de dieta: Al 0.0005, Ca 11.0065, Cl 4.7035, Cu 0.0175, I 0.0030, Fe 0.385, Zn 0.0637, Mg 0.3812, Mn 0.0055, P 2.5305, K 5.0020, Na 1.3000 y S 0.1162.

Detección de la lectina en heces.

Una rata de la dieta experimental y otra de la dieta basal, fueron utilizadas para detección de la lectina en heces, éstas fueron colectadas diariamente y homogenizadas con 1:5 partes (p/v) de solución salina al 0.9%, después de 6 hrs a 4°C, se filtraron en papel de fibra de vidrio y los extractos obtenidos fueron ensayados para actividad aglutinante con eritrocitos tratados con glutaraldehído e inmunodifusión doble contra el antisuero anti-lectina.

Procedimientos analíticos

Se determinó nitrógeno total en heces, orina y dietas por el método de Kjeldahl (AOAC, 1984), para calcular NPU.

Análisis histológico

Se prepararon secciones de tejido de estómago, duodeno, yeyuno e íleon de las ratas sacrificadas después de terminado el bioensayo, para tinción con hematoxilina-eosina (HE), en la forma que se describe antes en el Capítulo 2.

Análisis estadístico

Se probó homogeneidad de varianza antes de la selección de los procedimientos paramétricos o no paramétricos, prueba t de student o de Mann-Whitney (Zar, 1974).

Resultados y Discusión

Balace de nitrógeno

La Tabla 4.1 corresponde al balance de nitrógeno y valores de NPU de las ratas alimentadas con caseína sola y con caseína conteniendo 0.17% de lectina de A. cruentus. No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en consumo de proteína entre una dieta y otra, así el método utilizado reflejó solamente el efecto sobre la calidad de la proteína. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los valores de NPU entre una y otra dieta.

TABLA 4.2 Balance de nitrógeno y valores de NPU de ratas Sprague Dawley alimentadas con caseína sola y con caseína conteniendo 0.17% de lectina de A. cruentus.^a

Fuente de proteína	N-Ingerido (mg)	N-Fecal (mg)	N-Urinario (mg)	Balace de nitrógeno (mg)	NPU (%)
Caseína (ANRC)	2070.3 ± 60.1 ^b	238.0 ± 38.5 ^b	707.5 ± 8.68 ^b	1337.8 ± 60 ^b	72.2 ± 5.3 ^b
Caseína+lectina	2110.0 ± 106.2 ^b	265.8 ± 30.1 ^b	701.0 ± 200.8 ^b	1052.5 ± 112 ^b	67.5 ± 7.8 ^b

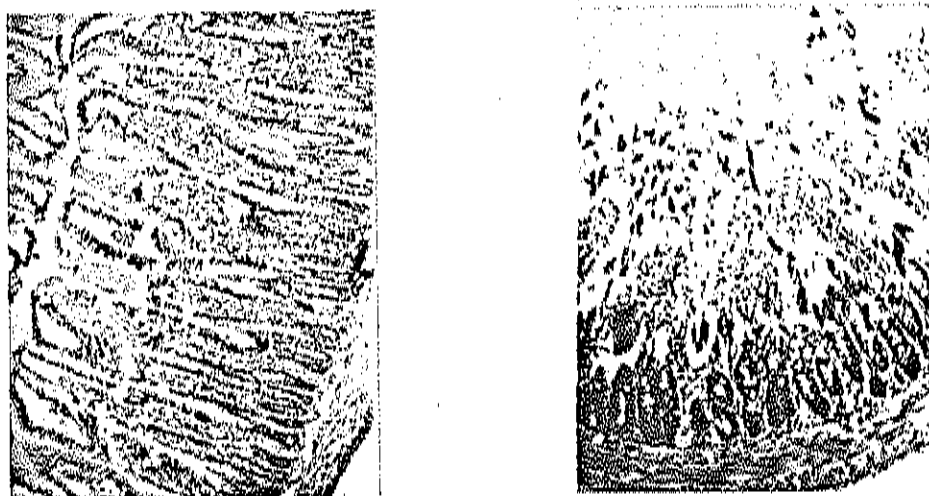
^a Promedio de 4 ratas ± desviación estándar.

^b No hay diferencias significativas ($p > 0.05$) con una prueba t

Análisis histológico

Al comparar mucosa de estómago, duodeno, yeyuno e íleon de ratas cuyas dietas contenían la lectina de A. cruentus, con el control; se encontró que no hubo diferencias morfológicas en la mucosa de estómago e íleon, mientras que el duodeno y yeyuno de las ratas alimentadas con lectina, mostraron anomalías

morfológicas como el desarrollo de ensanchamiento en los lados de las vellosidades, disminución de altura y un incremento excesivo de la exfoliación celular en la punta de las mismas, como se observa al comparar las vellosidades de las secciones de yeyuno de ratas alimentadas con la dieta control (Fig. 4.1a) con las de la dieta conteniendo la lectina (Fig. 4.1b). Se han observado cambios morfológicos similares al alimentar ratas con una dieta conteniendo lectina de Psophocarpus tetragonolobus (Higuchi et al, 1984), y en ratas alimentadas con lectina de soya (Jindal y colaboradores, 1984); así mismo, estas alteraciones citotóxicas fueron detectadas por Lorenz-Meyer et al (1985) al incubar yeyuno de ratas in vivo con las lectinas de germen de trigo y Canavalia ensiformis, quienes comentan la similitud entre estos cambios morfológicos y los ocasionados por la enfermedad celiaca.



4.1a Morfología normal de las vellosidades (HE, 50.4x) 4.1b Anormalidades morfológicas después de la dieta con lectina (HE, 50.4x)

Figura 4.1 Microfotografías de secciones transversales del yeyuno de ratas alimentadas con la dieta control o con la dieta conteniendo la lectina de A. arvensis.

Detección de la lectina en heces.

La Fig. 4.2 muestra antigenicidad detectada en las heces de las ratas que ingirieron la dieta con lectina, estas líneas de precipitación entre A, B, C, E y F (extractos de heces días 2-6) contra Ab (antisuero), se fusionan completamente con la formada por la lectina purificada (D). indicando la identidad inmunológica de cada antígeno. Se ha detectado la presencia en heces de las lectinas de Canavalia ensiformis (Nakata y Kimura, 1985) por electroforesis en SDS y de Psophocarpus tetragonolobus (Higuchi et al, 1984) por el método de doble inmunodifusión aquí utilizado.

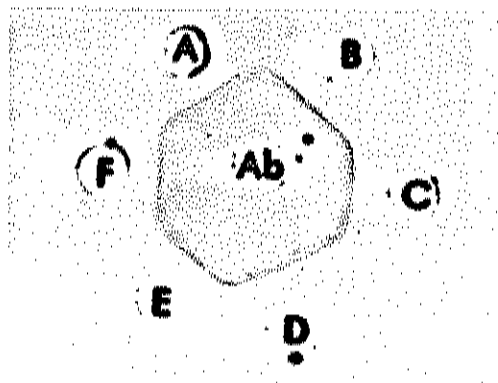


Figura 4.2 Inmunodifusión doble de los extractos de heces de rata con dieta conteniendo la lectina de A. oryzae contra el antisuero antiamaranto. El antisuero (Ab) contra A, B, C, E y F; extractos de las heces de los días 2-6 y en D: la lectina purificada.

Para explicar los resultados aparentemente contradictorios entre un balance equilibrado de nitrógeno (NPU) y las anomalías morfológicas encontradas en la mucosa del intestino delgado; es conveniente referirse a un estudio realizado por Jindal y colaboradores (1984), que alimentaron ratas con una dieta conteniendo lectina de soya y encontraron anomalías morfológicas a nivel de mucosa intestinal, aunque no se afectaron cuantitativamente la digestibilidad y la absorción de nitrógeno. Estos autores midieron además la actividad de disacaridasas y proteasas ligadas a membrana celular en el epitelio intestinal de las ratas alimentadas con la lectina, y encontraron la actividad enzimática deprimida con respecto al control. La posible explicación de estos hechos, dicen, es que un incremento en el tiempo de digestión y absorción pueda estar compensado por la disminución en la actividad enzimática y así la biodisponibilidad de los nutrientes permanece sin cambio, ocasionando que los efectos no sean observables a nivel macroscópico.

En esta última parte del estudio se ha probado que la lectina de A. cruentus es resistente a las condiciones de pH, temperatura y proteólisis en el tracto intestinal produciendo anomalías morfológicas en la mucosa del intestino; aunque este problema no se reflejó en la utilización de proteína (NPU).

CONCLUSIONES

La lectina de Amaranthus cruentus es específica para N-acetilgalactosamina y reconoce a este monosacárido en estructuras carbohidrato complejas como la de la fetuina. La lectina interacciona in vitro con la células del epitelio superficial del duodeno y yeyuno. Esta interacción se debe a que las células contienen glicoconjugados receptores específicos en su membrana externa.

La lectina de A. cruentus no pierde actividad por variaciones de pH, aunque presenta mayor actividad aglutinante a pH's extremos; así mismo, es resistente a la digestión proteolítica con las enzimas gastrointestinales in vitro por largos períodos. La estabilidad de la lectina in vivo, fue confirmada con la detección de actividad biológica en las heces de las ratas que fueron alimentadas con una dieta conteniendo la lectina.

La lectina de A. cruentus al interaccionar con las células epiteliales de la mucosa gastrointestinal in vivo, provocó cambios morfológicos en la estructura de las vellosidades de duodeno y yeyuno, así como pérdida excesiva de células del epitelio superficial. No se observaron cambios morfológicos en la mucosa gástrica, aunque no se excluye la posibilidad de alguna transformación no observable en el microscopio óptico; ya que tanto las células parietales del estómago como las del epitelio superficial del intestino contienen un glicoconjugado receptor común para la lectina en estudio.

No se encontraron diferencias significativas entre los valores de NPU de las ratas alimentadas con la dieta conteniendo lectina y las de la dieta control. Una posible explicación es que el efecto de la lectina sobre la utilización de proteína, se observe solo en un tiempo mas largo que los seis días que duró el experimento, o cuando la relación ente la cantidad de lectina ingerida y el peso de las ratas sea mayor; como se vió en el estudio anterior con Amaranthus hypochondriacus, con ratas mas pequeñas alimentadas durante veintiocho días con la dieta conteniendo la lectina (Calderón de la Barca et al, 1985a).

De este trabajo se puede inferir la importancia del manejo de diversas técnicas de bioquímica, inmunología e histología que unidas a un bioensayo pueden explicar la forma en que se da un efecto fisiológico negativo, como reducción de peso, balance negativo de nitrógeno o baja digestibilidad de un alimento dado. Con el manejo de dichas técnicas se puede incluso detectar lo que no se observaría por medio de NPU ó PER, en un período de tiempo corto (5 ó 6 días) y con niveles tan bajos del factor antifisiológico como los que se usaron en el presente estudio.

Para que la información sobre el mecanismo de acción de la lectina de amaranto en la utilización de las proteínas fuera mas concluyente; sería necesario realizar estudios mas finos encaminados a la búsqueda del receptor glicoconjugado para la lectina, por electroforesis seguida de "blotting", el cual también se podría utilizar en el análisis y diferenciación de

fragmentos provenientes de la lectina, de las proteasas o del sustrato proteico mismo, después de una digestión in vitro.

Otro aspecto en el que se puede profundizar, es el estudio histológico de mucosa gastrointestinal al final del bioensayo, con técnicas de microscopía electrónica, para detectar cambios mas leves en la morfología de las estructuras celulares expuestas a la lectina.

BIBLIOGRAFIA

- Akeson, W.R. and Stahmann, M.A. 1964. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *J. Nutr.* 83: 257-261.
- AOAC. 1984. Official Methods of Analysis. S. Williams Ed. Association of Official Analytical Chemists. USA. pp. 156, 879.
- Auricchio, S; De Tirtis, G.; De Vineezi, M., and Silano, V. 1985. Toxicity mechanisms of wheat and other cereal in celiac disease and related enteropathies. *V. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 4:923-930.
- Banwell, J.G.; Boldt, D.H.; Meyers, J.; Weber, F.L. 1983. Phytohemagglutinin derived from red kidney bean (Phaseolus vulgaris): A cause for intestinal malabsorption associated with bacterial overgrowth in the rat. *Gastroenterology* 84:506-15.
- Begbie, R. and King, T.P. 1985. The interaction of dietary lectin in porcine small intestine and the production of lectin specific antibodies. *Lectins, Vol. IV.* Walter de Gruyter. Berlin, pp. 15-27.
- Calderón de la Barca, A.M.; Ochoa, J.L. and Valencia, M.E. 1985. Effect of the extraction of a hemagglutinin on the nutritive value of Amaranthus leucocarpus seeds. *J. Food Sci.* 50(6), 1700-1702.
- Calderón de la Barca, A.M.; Zenteno, E.; Ochoa, J.L.; Valencia, M. and Carbajal, R. 1985. The removal of Amaranthus leucocarpus lectin affects the nutritional value of the seed meal. In: *Lectin Vol. IV*, Editors: T.C. Bog-Hansen, J. Breborowicz. Walter de Gruyter. Berlin. pp. 531-536.
- Caron, M. and Faure, A. 1983. The use of polyacrylamide gradient gel electrophoresis for the quality control of lectins. *Electrophoresis* 4, 257-258.
- Concon, J.M.; Newburg, D.S. and Eades, S.N. 1983. Lectins in wheat gluten proteins. *J. Agric. Food Chem.* 31, 939-941.
- Cooper, T.G. 1977. Immunochemical techniques. In: *The Tools of Biochemistry.* J. Wiley & Sons. USA. pp. 256-307.
- Erickson, R.H.; Kim, J.; Sleisenger, M.V. and Kim, Y.S. 1985. Effect of Lectins on the Activity of brush border membrane-bound enzymes of rat small intestine. *J. Pediatric Gastroenterol. Nutr.* 4:984-991.

- Fischer, J.; Klein, P.J.; Vierbuchen, M.; Fischer, R. and Uhlenbruck, G. 1983. Histochemical and biochemical characterization of glycoprotein components in normal gastric mucosa, intestinal metaplasia and gastric cancers with lectins. In: Lectins, vol. II. Walter de Gruyter & Co. Berlin. pp. 167-177.
- ✓ Goldstein, I.J. 1981. Lectins: Carbohydrate-binding proteins in search of a function. In: Food Carbohydrates. Lineback, D.R., Inglett, G.E. Eds. Avi Publishing Co. USA. pp. 206-216.
- Goldstein, I.J. and Hayes, C.E. 1978. The Lectins: carbohydrate-binding protein of plants and animals. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 35:127-340.
- Ham, A.W. 1967. Tratado de Histología. 5a. Edición. Editorial Interamericana. México. pp. 6-13, 25, 34, 626-641.
- ✓ Higuchi, M.; Tsuchiya, I. and Iwai, K. 1984. Growth inhibition and small intestinal lesions in rats after feeding with isolated winged bean lectin. Agric. Biol. Chem. 48(3), 695-701.
- Hopkins, D.T. 1981. Effects of variations in protein digestibility. In: Protein Quality in Humans: Assessment and in vitro Estimation. Avi Publishing, USA. pp. 169-191.
- Hurm, A.L. and Chantler, S.M. 1980. Production of reagent antibodies. In: Methods in Enzymology. Vol. 70. Immunochemical Techniques Part A. H.V. Vunakis and J.J. Langone, Eds. Academic Press, USA. pp. 104-141.
- Ito, M.; Takata, K.; Saito, d.; Aoyagi, T. and Hirano, H. 1985. Lectin-binding pattern in normal human gastric mucosa. A light and electron microscopic study. Histochemistry 83:189-193.
- ✓ Jaffé, W.G. 1980. Hemagglutinins (Lectins). In: Toxic Constituents of Plants Foodstuffs. E. Liener Ed. Academic Press, London. pp. 73-98.
- ✓ Jaffé, W.G. y Camejo, G. 1961. La acción tóxica de caraotas negras aisladas (Phaseolus vulgaris) sobre la absorción intestinal en ratas. Acta Cient. Venez. 12:59-63.
- Jansen, R.G. 1981. Biochemical parameters and protein quality. In: Protein Quality in Humans. Assessment and in vitro Estimation AVI Publishing, USA. pp. 118-143.

- ✓ Jindal, S.; Soni, G.L. and Singh, R. 1984. Biochemical and histopathological studies in albino rats fed on soybean lectin. *Nutr. Rep. Int.* 29(1): 95-106.
- Johnson, A.M. 1986. An Introduction to Immunodiffusion Techniques. Edited by Atlantic Antibodies, USA. pp. 3, 11-15.
- Kessimian, N.; Langner, B.J.; McMillan, P.N. and Jauregui, H.O. 1986. Lectin binding to parietal cells of human gastric mucosa. *J. Histochem. Cytochem.* 34(2): 237-243.
- Kies, C. 1981. Bioavailability: a factor in protein quality. *J. Agric. Food Chem.* 29:435-440.
- Laemmli, U.K. 1970. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature* 227, 680.
- Lehninger, A.L. 1982. Digestion, transport, and the integration of metabolism. In: *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers USA. pp. 683-690.
- ✓ Liener, I.E. 1981. The nutritional significance of the plant lectins. In: *Antinutrients and Natural Toxicants in Foods*. L. Ory Ed. Food Nutrition Press. USA. pp. 143-157.
- ✓ Lis, H. and Sharon, N. 1986. Lectins as molecules as tools. *Ann. Rev. Biochem.* 55:35-67.
- ✓ Lorentz-Meyer, H.; Roth, H.; Elsasser, P. and Hahn, U. 1985. Cytotoxicity of lectins on rat intestinal mucosa enhanced by neuraminidase. *European J. Clin. Invs.* 15:227-234.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.I.; Farr, L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- Luna, L.G. 1968. Routine Harris hematoxylin end eosin stain. In: *Manual Histologic Satining Methods of the Armed Forced Institute of Pathology*. Third Ed. McGraw Hill, USA. pp. 38-39.
- Maurer, P.H. and Callahan, H.J. 1980. Proteins and polypeptides as antigens. In: *Methods in Enzymology*. Vol. 70. Immunochemical Techniques Part A. Edited by H.V. Vunakis and J.J. Langone. Academic Press. USA. pp.64-65.
- Moog, F. 1981. The lining of the small intestine. *Scientific American* 245(5):116-130.

- Mozersky, S.M. and Panettieri, R.A. 1983. Is pH drop a valid measure of extent of protein hydrolysis? *J. Agric. Food Chem.* 31:1313-1316.
- Nachbar, M.S. and Oppenheim, J.D. 1980. Lectins in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *Am. J. Clin. Nutr.* 33:2338-2345.
- Nakata, S. and Kimura, T. 1985. Effect of ingested toxic bean lectins on the gastrointestinal tract in the rat. *J. Nutr.* 115:1621-1629.
- Newburg, D.S. and Concon, J.M. 1985. Lectins in rice and corn endosperm. *J. Agric. Food Chem.* 33:685-687.
- Ochoa, J.L. and Kristiansen, T. 1982. Purification and partial characterization of an agglutinin from Phaseolus coccineus. var. alubia. *Biochimica et Biophysica Acta.* 705:396-404.
- Oliveira, A.C. and Sgarbieri, V.C. 1986. The influence of rat endogenous nitrogen excretion on the assessment of bean protein quality. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 32:425-436.
- Ory, R.L.; Bog-Hansen, T. and Mod. R.R. 1981. Properties of hemagglutinin in rice and other cereal grains. In: *Antinutrients and Natural Toxicants in Food*. Edited by R.L. Ory. Food and Nutrition Press. USA. pp. 159-167.
- Pellet, P.L. and Young V.R. 1980. Techniques for protein quality evaluation: background and discussion. In: *Nutritional Evaluation of Protein Foods*. The United Nations University. pp. 41-55.
- Peschke, P. and Kuhlmann, W.D. 1985. Rat gastrointestinal glycoconjugates. Histological studies with lectins and monoclonal antihuman blood group antibodies. *Lectins Vol.IV*. Walter de Gruyter Berlin. pp. 169-178.
- Pusztai, A. 1985. Constraints on the nutritional utilization of plant proteins. *Nutrition Abstracts and Reviews (series B) Commonwealth Agricultural Bureaux.* 55:363-369.
- Pusztai, A.; Clarke, E.M.A.; King, T.P. and Stewart, J. 1979. Nutritional evaluation of kidney beans (Phaseolus vulgaris): chemical composition, lectin content and nutritional value of selected cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 30:843-848.
- Rea, R.L.; Thompson, L.V.; David, J.A., and Jenkins, D.M. 1985. Lectins in food and their relation to starch digestibility. *Nutr. Res.* 5:919-929.

- Rossi, M.A.; Mancini Filho, J. and Lajolo, F.M. 1984. Jejunal ultrastructural changes induced by kidney bean (Phaseolus vulgaris) lectin in rats. Br. J. Exp. Pathol. 65:117-123.
- Rothenbuhler, E. and Kinsella, J.E. 1985. The pH-stat method for assessing protein digestibility: an evaluation. J. Agric. Food Chem. 33:433-438.
- Ruskin, F.R. 1984. Amaranth modern prospects for an ancient crop. National Research Council Staff. National Academy Press. USA. pag. 1.
- Sánchez Marroquín, A. 1980. Potencialidad agroindustrial del amaranto. Centro de Estudios Econom. y Soc. del Tercer Mundo. México. pp. 121.
- Satterlee, L.D.; Marshall, H.F. and Tennyson, J.M. 1979. Measuring protein quality, J.A.O.C.S. 56:103.
- Satterlee, L.D.; Kendrick, J.G.; Jewell, D.K. and Brown, W.D. 1981. Estimating apparent protein digestibility from in vitro assays. In: Protein Quality in Humans: Assessment and in vitro Estimation. Ed. Bodwell, C.E.; Adkins, H.S. and Hopkins, D.T. Avi Publishing, USA. pp. 316-339.
- Sharon, N. and Lis, H. 1972. Lectins: cell agglutinating and sugar-specific proteins. Science 177:949-959.
- Stahmann, M.A. and Woldegiorgis, G. 1975. Enzymatic methods for protein quality determination. In: Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds: Part I. Assay methods-biological, biochemical and chemical. M. Friedman Ed. Marcel Dekker USA. p. 211.
- Suganuma, T.; Tsuyama, S.; Suzuki, S. and Murata, F. 1984. Lectin-peroxidase reactivity in rat gastric mucosa. Arch. Histol. Jap. 47(2): 197-207.
- Thompson, L.U.; Tenebaum, A.V. and Hui, H. 1986. Effect of lectins and the mixing of protein on rate of protein digestibility. J. Food Sci. 51(1): 150-152.
- Uehara, F.; Muramatsu, T. and Ohba, N. 1986. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of lectin receptors in the bovine interphotoreceptor matrix. Exp. Eye Res. 43:227-234.
- Wilson, A.B.; King, T.P.; Clarke, E.M.W. and Pusztai, A. 1980. Kidney bean (Phaseolus vulgaris) lectin-induced lesions in rat small intestine: 2. Microbiological studies. J. Comp. Path. 90:597-602.

Walsh, J.H. 1984. Gastric secretion. In: the role of the gastrointestinal tract in nutrient delivery. Eds. Green and Greene. Academic Press. USA. pp. 107-117.

Zar, J.H. 1984. Bioestatistical Analysis. Second Ed. Prentice-Hall, USA. pp. 150-181.

Walsh, J.H. 1984. Gastric secretion. In: the role of the gastrointestinal tract in nutrient delivery. Eds. Green and Greene. Academic Press. USA. pp. 107-117.

Zar, J.H. 1984. Bioestatistical Analysis. Second Ed. Prentice-Hall, USA. pp. 150-181.

Walsh, J.H. 1984. Gastric secretion. In: the role of the gastrointestinal tract in nutrient delivery. Eds. Green and Greene. Academic Press. USA. pp. 107-117.

Zar, J.H. 1984. Bioestatistical Analysis. Second Ed. Prentice-Hall, USA. pp. 150-181.

Walsh, J.H. 1984. Gastric secretion. In: the role of the gastrointestinal tract in nutrient delivery. Eds. Green and Greene. Academic Press. USA. pp. 107-117.

Zar, J.H. 1984. Bioestatistical Analysis. Second Ed. Prentice-Hall, USA. pp. 150-181.