



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**“Marcaje con QDs de una lectina recombinante obtenida en *Pichia pastoris*”.**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**Licenciada en Medicina Veterinaria Zootecnista**

Presenta

**Lizet Angélica Núñez Corona**

**Dirigida por**

Dr. Ricardo Cervantes Jiménez

**SINODALES**

Dr. Ricardo Cervantes Jiménez

Presidente

\_\_\_\_\_

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Secretaria

\_\_\_\_\_

Dr. Alejandro Blanco Labra

Sinodal

\_\_\_\_\_

Dra. Dulce María Palmerín Carreño

Sinodal

\_\_\_\_\_

Dra. Xóchitl Zambrano Estrada

Sinodal

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Dr. José Guadalupe Gómez Soto  
Director de la Facultad de Ciencias Naturales

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro  
México, Mayo 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Marcaje con QDs de una lectina recombinante  
obtenida en *Pichia pastoris*

**por**

Lizet Angélica Núñez Corona

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** CNLIN-261749

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA  
CELULAR Y MOLECULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE  
LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO BAJO LA DIRECCIÓN DEL  
DR RICARDO CERVANTES JIMÉNEZ**

## **Agradecimientos**

A mi familia. Les agradezco por demostrarme su amor en los momentos que más los necesité. Les agradezco todo el esfuerzo que hicieron para que yo pudiera hacer posible las oportunidades que se presentan en mi vida, por siempre confiar en mí, por los consejos que me han brindado, les agradezco todo eso y mucho más.

A mi mamá abuelita por ayudarme desde que tengo uso de memoria, por su calidez y amor todos estos años.

A mis amigos de toda la vida, por su amistad incondicional, por sus consejos, por las risas y los hermosos momentos compartidos todos estos años.

A David. Gracias por impulsarme y creer en mí, por motivarme y confiar en este proceso. Poniendo la mano en el corazón, quisiera decirte que eres mi compañero de aventuras, mi confidente y el amor de mis amores. Gracias por ser mi luz en los momentos más oscuros, por ser mi alegría constante y por tu amor incondicional.

A todos los doctores y/o maestros que formaron parte de mi educación, que me aportaron conocimientos, experiencias, aprendizajes, consejos, dudas y mucho más. En especial a la doctora Araceli Barreyro que fue más que un docente en mi vida, que me apoyó y brindó ayuda cuando estaba por rendirme.

Al laboratorio de biología molecular y celular por las facilidades prestadas para la realización del presente trabajo. A todas las personas del laboratorio que me apoyaron desde el inicio. A los doctores Josué, Dulce, Kuri, Paola y mis compañeras Bárbara y Daniela por todos los conocimientos y experiencias que obtuve gracias a este proyecto.

A mis sinodales por su orientación y guía durante mi estancia. En especial a Ricardo Cervantes Jiménez. Gracias por abrirme este camino, por confiar en mí desde el inicio, por tu paciencia, tus conocimientos y palabras, muchas gracias por tu apoyo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo con el proyecto FOPER 2020-FCN01777. Gracias por hacer posible este proyecto e impulsar el desarrollo de la investigación en nuestro país.

## Resumen

Las lectinas son glicoproteínas de origen no inmune que tienen la capacidad de reconocer de forma específica y reversible a carbohidratos. Estas uniones permiten identificar células de diferentes linajes, así como células cancerígenas. El presente trabajo se enfocó en obtener una lectina recombinante (Lr) de la levadura *Pichia pastoris*, la cual se acopló a Quantum Dots (QD) por la técnica de microfluídica. Esta técnica permitió la formación de complejos homogéneos denominando (Lr-QD), cuya visualización se logró usando microscopía Multifotón y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). El análisis del complejo Lr-QD mostró una emisión espectral de 570 nm. Estos resultados muestran que el acoplamiento no produjo cambios significativos en la longitud de onda de emisión de fluorescencia, por lo tanto, la lectina recombinante no altera las propiedades ópticas deseadas de los Quantum Dots. Los resultados obtenidos con la microscopía electrónica de transmisión (MET) mostraron diferencias entre Lr sola y el complejo Lr-QD. Al acoplar la lectina al QD se observaron clústers similares a icosaedros. El potencial zeta disminuyó en relación a la lectina recombinante sin etiquetar, lo que implica la presencia de grupos carboxilo en los QD acopladas a la lectina, lo que otorga una carga negativa disminuyendo este dato obtenido. La Lr acoplada a QD es una opción viable que puede ser utilizada en el futuro como un agente potencial para visualizar el seguimiento de lectinas en condiciones normales y patológicas.

**Palabras clave:** Proteínas, lectinas recombinantes, levadura *Pichia pastoris*, Quantum dot, microfluídica.

## **Abstract**

Lectins are glycoproteins of non-immune origin that have the ability to specifically and reversibly recognize carbohydrates. These unions allow the identification of cells of different lineages, as well as cancer cells. The present work focused on obtaining a recombinant lectin from yeast *Pichia pastoris*, this protein was named Lr, which was coupled to Quantum Dots (QD) by the microfluidic technique, this technique allowed the formation of homogeneous complexes named (Lr-QD), whose visualization was achieved using Multiphoton microscopy and Transmission Electron Microscopy (TEM). The analysis of the Lectin Recombinant (Lr) complex with Quantum Dots (QD) showed a spectral emission of 570 nm. These results show that the coupling did not produce significant changes in the fluorescence emission wavelength, therefore, the recombinant lectin does not alter the desired optical properties of the Quantum Dots. Results obtained with transmission electron microscopy (TEM) showed differences between recombinant lectin alone (Lr) and the Lr-QD complex. Upon coupling the lectin to the QD, icosahedron-like clusters were observed. The zeta potential decreased relative to the unlabeled recombinant lectin, implying the presence of carboxyl groups on the Quantum Dots coupled to the lectin, which gives a negative charge producing a decrease in its z value. The recombinant lectin coupled to quantum dots is a viable option that can be used in the future as a potential agent to visualize lectin tracking in normal and pathological conditions.

**Keywords:** Proteins, recombinant lectin, *Phaseolus acutifolius*, yeast *Pichia pastoris*, Quantum dot, microfluidic.

## Índice

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes .....	2
2.1 Proliferación celular.....	2
2.2 Cáncer .....	3
2.2.1 Cáncer de colon.....	4
2.3 Proteínas.....	11
2.3.1 Lectinas .....	13
2.4 Marcaje de proteínas .....	18
2.4.1 Técnicas de marcaje.....	19
2.5. Quantum Dots .....	24
2.5.1 Marcaje con Quantum Dots .....	28
3. Justificación.....	30
4. Hipótesis.....	30
5. Objetivos.....	31
5.1 Objetivo General .....	31
5.2 Objetivos Específicos.....	31
6. Materiales y Métodos .....	31
6.1 Producción de la lectina recombinante (LR).....	31
6.2 Extracción y purificación de la lectina recombinante (Lr) .....	33
6.3 Perfil electroforético .....	34
6.3.1. Tinción de Coomasie .....	34
6.3.2 Tinción de ácido Peryódico de Shiff (PAS) .....	34
6.4 Actividad aglutinante.....	35
6.5 Acoplamiento por microfluídica .....	35
6.6 Determinación de la emisión de fluorescencia Lr, Lr-QD, mediante microscopía multifotón .....	37
6.7 Análisis en Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).....	37
6.8 Determinación de potencial Z y tamaño de partícula de Lr y Lr-QD.....	38
6.9 Análisis estadísticos.....	38

7. Resultados .....	38
7.1 Cuantificación de proteína.....	38
7.2 Caracterización de lectina recombinante .....	39
7.3 Análisis por Microscopía Multifotón.....	40
7.4 Análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) .....	41
8. Discusión.....	44
9. Conclusiones.....	48
10. Referencias .....	49

### Índice de Cuadros

<b>Cuadro 1. Efecto de lectinas en línea celulares cancerígenas.....</b>	<b>14</b>
<b>Cuadro 2. Quantum Dots y su interacción con proteínas.....</b>	<b>29</b>
<b>Cuadro 3. Concentración de proteína expresada en µg/ml. Concentración de proteína mediante una curva patrón de proteína, empleando albúmina sérica de bovino (ASB). La concentración de proteína se expresa en ug/ml.....</b>	<b>39</b>

### Índice de figuras

Figura 1. Tasa de Defunciones por tumores malignos registrados por año, defunciones por cada 10 mil habitantes (imagen tomada de INEGI, 2022).	5
Figura 2. Vía de señalización WNT.	7
Figura 3. Clasificación de Cáncer de colon (CCR). Correlación de los subtipos SMC con el mecanismo molecular.	9
Figura 4. Características de los Quantum Dots.	25
Figura 5. Microchip de polidimetilsiloxano	36
Figura 6. Electroforesis de Lr. SDS PAGE al 10% y tinción para glicoproteínas.	40
Figura 7. Actividad aglutinante de lectina recombinante.	40
Figura 8. Lectina recombinante (Lr) sin marcaje vista en microscopía multifotón.	41
Figura 9. Complejo Lr-QD vista en microscopía multifotón. .	41
Figura 10. Microscopía electrónica de transmisión para la Lr sin marcaje.	42
Figura 11. Complejo Lr-QDS vista en microscopía electrónica de transmisión (MET)	42
Figura 12. Potencial Z del complejo Lr-QD.	43

## 1. Introducción

Las lectinas son glicoproteínas de origen no inmune que tienen la capacidad de reconocer y enlazar de forma específica y reversible a carbohidratos (Ferriz-Martínez y col., 2010). Con el tiempo, se ha comprobado que este grupo de proteínas no solo se encuentran en los cotiledones y endospermos de las plantas (Lucius, 2020), sino que se distribuyen de manera ubicua, en todos los reinos taxonómicos (Sharon 1998; Kumar y col., 2012). Con la intención de que las lectinas se conviertan en una herramienta útil y valiosa en nuestra actualidad, se ha manifestado la necesidad de desarrollar métodos innovadores que puedan conjugarse y maximizar sus funciones, ya sea como una herramienta visual de diagnóstico o molecular, contra diversos tipos celulares o agentes endógenos, dirigidos a distintas áreas de ciencias biológicas.

Los puntos cuánticos (QD), han destacado de entre los diferentes tipos de marcaje en diferentes áreas por su composición tipo nanocristales. Son semiconductores fluorescentes que tienen un diámetro promedio de 2-10 nm y pueden interactuar con diversas moléculas (Barve y col., 2010; Gudivada y col., 2020). Ashree y col., (2018) destacan sus propiedades ópticas y electrónicas como fotoestabilidad, superficie químicamente activa, larga vida útil y resistencia al fotoblanqueo, así como propiedades fisicoquímicas como tamaño, morfología, composición y funcionalización a moléculas orgánicas o inorgánicas (Schiffman y Balakrishna, 2018). Los QD pueden conjugarse con una gran variedad de biomoléculas, entre ellas las lectinas. Se han realizado distintas investigaciones *in vivo e in vitro* utilizando lectinas enlazadas con QD (Cunha y col., 2018b), con potencial para ser utilizados como medicamentos para prevenir metástasis (Ashree y col., 2018) o como marcadores de reconocimiento. (Cunha y col, 2018a). El marcaje de lectinas con Quantum Dots ha mostrado ser un sistema eficiente donde ambas partes conservan sus propiedades fisicoquímicas y funcionales, con lo que se abre la puerta al conocimiento de sus funciones en los organismos vivos.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Proliferación celular.**

El ciclo celular es el proceso que guía al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas (Ramírez, 2007). En el ser humano, existen dos tipos de división celular: la mitosis, en el caso tanto de células somáticas como germinales y la meiosis que solo se realiza en las células germinales durante una parte de la formación de gametos (Peralta-Zaragoza, 1997) . Para su estudio, el ciclo celular se encuentra dividido en dos fases: interfase y fase M. Durante la interfase ocurren todos los procesos celulares y bioquímicos necesarios para que la mitosis se pueda llevar a cabo adecuadamente, dicha fase se encuentra dividida en tres etapas subsecuentes : G1, S y G2. Las células en G0 pueden ser propulsadas hacia G1 a través de varios estímulos (Ramírez, 2007).

Las fases G1 y G2 (gap o intervalo) requieren una actividad metabólica para el crecimiento en masa de la célula. Por su parte la fase S (síntesis) consiste en la replicación del ADN para heredar a cada célula hija la misma carga genética. La fase M (mitosis) o de división celular, es la división de todo el material celular para originar dos células hijas (Costanzo, 2000). Las células pueden estar circulando o inmóviles, aquellas que se replican de manera continua como las células de mucosa intestinal o las células progenitoras hematopoyéticas. Cuando la célula no está en actividad proliferativa, es decir, que ha salido del ciclo celular, se le conoce como estado de quiescente o G0, un ejemplo clásico de estas células son las neuronas (Guyton y Hall, 2006).

El ciclo celular es un proceso altamente regulado. Para alcanzar esto, existen moléculas dentro y fuera de la célula que regulan y controlan la división celular y el ciclo celular. Extrínseca e intrínsecamente existen ciertos factores de crecimiento y otras moléculas de señalización juegan un papel importante en el control del crecimiento y la proliferación celular (Ramírez, 2007). Entre estas moléculas externas se encuentran el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la eritropoyetina, el 17-estradiol, el factor de crecimiento hepático (HGF), el factor de crecimiento

vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF), entre otros (Fragoso y col., 2004).

El progreso de una célula a través del ciclo proliferativo depende de dos clases importantes de moléculas reguladoras, las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclina (CDK). Ambas moléculas forman una serie de complejos de dímeros que impulsan la proliferación celular. Cuando las células son estimuladas para dividirse (mediante factores de crecimiento), las ciclinas de tipo D se activan primero y forman un complejo de dos CDK (4 y 6). Estos complejos D-CDK son clave para la inactivación de la proteína del retinoblastoma (pRb). Junto con los complejos de ciclina E-CDK2, conducen a la célula hasta la fase S. Otras ciclinas, A y luego B, se unen a CDK (1 y 2) y ayudan a completar el ciclo (Cerqueira, 2009)

Las diferentes familias de inhibidores de CDK (CKI) regulan la proliferación celular y juntas representan un mecanismo importante contra la carcinogénesis. Sin embargo, existen mutaciones de CKI en varios tipos de cánceres humanos. Estos actúan principalmente uniéndose a complejos binarios de ciclina-CDK o uniéndose a CDK, evitando así la activación de CDK inducida por ciclina D. Entonces, las INK4 bloquean la progresión del ciclo celular en G1. Hay varias proteínas INK4: p15, p16, p18 y p19 (Bendris y col., 2015).

## **2.2 Cáncer**

El cáncer es una de las principales patologías que afectan a las poblaciones a nivel mundial y se define como una enfermedad crónico degenerativa causada por alteraciones en la proliferación, diferenciación y muerte celular (Rubin y col., 2015). El término "neoplasia" proviene del griego neo, "nuevo" y plasma "cosa formada", se define como un crecimiento autónomo de tejido más allá de los límites normales que permite la proliferación celular (Chacón, 2009). Cuando se descubrió el genoma humano, fue necesario explicar los cambios genéticos en la carcinogénesis. Esta patología requiere dos clases de genes: protooncogenes, que están implicados en el crecimiento y proliferación de células normales, y oncogenes para aquellos genes que se ya presentan mutaciones dominantes, es decir, que sólo es necesario que

uno de los alelos sufra una mutación para que la proteína que codifica, obtenga funcionalidad (Guyton y Hall, 2006), por otro lado están los genes supresores de tumores definido como aquellos que inhiben el desarrollo y propagación de algunos tipos de tumores (Lee y col., 2010). Inclusive hay supresores tumorales que, en algunas circunstancias, al mutar toman un rol como oncogén tal es el caso de p53 (Iurlaro y col., 2014) y WT1 (Jones y col., 2009).

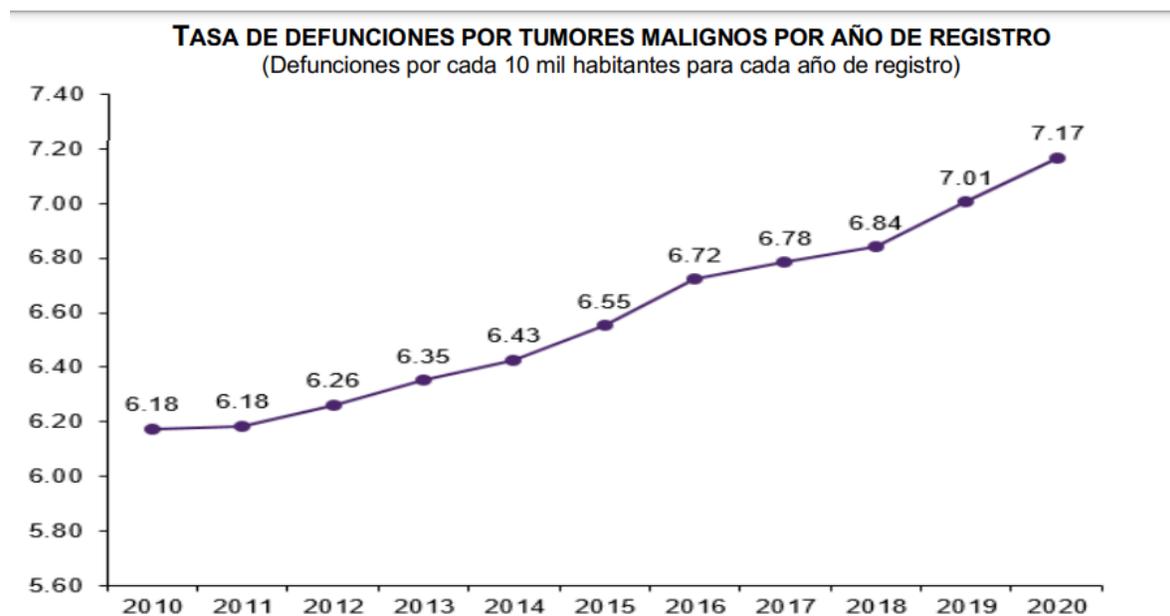
Por su parte, las células tienen mecanismos complejos e importantes para reparar cambios o daños en el ADN que involucran genes de reparación del ADN (Itzkowitz y Yio, 2004). Alrededor de 153 genes están directamente involucrados en la reparación del ADN, cuyos mecanismos principales incluyen la reparación de errores de emparejamiento, la reparación por escisión de bases o nucleótidos, la unión de extremos no homólogos y la recombinación homóloga. Algunos ejemplos de estos genes son BRCA1 o 2 y MSH2, MLH1 y MSH6. Sin embargo, en células normales, existen aproximadamente 20,000 casos de daño en el ADN y aproximadamente 10,000 errores de replicación por día (Shah y Itzkowitz, 2022). El cáncer se produce cuando las mutaciones del ADN se acumulan en las células. Si se generan suficientes mutaciones y están presentes factores de riesgo favorables para su desarrollo, las células escapan al control del crecimiento y eventualmente incrementan los errores y, con ello, adquieren mutaciones adicionales, lo que permite la invasión local y la posterior propagación a otros tejidos (Mantuano y col., 2020).

### **2.2.1 Cáncer de colon**

El cáncer colorrectal por sus siglas en inglés (CCR) es el tercer cáncer más frecuente en los hombres y el segundo en las mujeres, causando aproximadamente 700,000 muertes cada año (Berg y Soreide, 2011). El cáncer de colon es una de las neoplasias malignas mejor caracterizada desde el punto de vista genético-molecular tanto en sus formas esporádicas como las hereditarias poliposas y no poliposas (Alonso y col., 2006). Se trata de una enfermedad heterogénea que incluye múltiples alteraciones de señalización. Casi el 60-80 % de los CCR se desarrollan sobre la

base de una activación anormal de la vía de señalización de Wnt a través de su molécula central, la  $\beta$ -catenina (Fodde y col., 2001). Sin embargo, una vez que los tumores comienzan a invadir los tejidos locales o hacen metástasis en sitios distantes, las tasas de supervivencia a los 5 años caen al 71 % y al 14 %, respectivamente. El 70-80% de los casos de CCR son esporádicos, mientras que aproximadamente el 20-30% tienen un componente hereditario, ocasionado por síndromes de susceptibilidad de alto riesgo poco comunes o poco frecuentes, tal como el síndrome de Lynch (3-4%) y la poliposis adenomatosa familiar (FAP), que corresponde a menos de 1%. Una pequeña fracción de aproximadamente el 1-2% de los casos de CCR es causada por la enfermedad inflamatoria intestinal (Al-Sohaily y col., 2012).

De acuerdo con el INEGI (2022), en México se registraron 1,086,743 muertes en 2020, de las cuales 8% fueron tumores malignos (90,603 casos). Además, las estadísticas muestran que la tasa de mortalidad por tumores malignos ha aumentado durante la última década de 6.18 muertes por cada 10,000 personas en 2010 a 7.17 muertes por cada 10,000 personas en 2020 (Figura 1).



**Figura 1.** Tasa de Defunciones por tumores malignos registrados por año, defunciones por cada 10 mil habitantes (imagen tomada de INEGI, 2022).

Entre los hombres de 30 a 59 años destacaron las defunciones por tumor maligno del colon, recto y del ano, con una tasa de 0.55 defunciones por cada 10 mil varones, seguido de los tumores malignos del estómago con una tasa de 0.47 por cada 10 mil hombres (INEGI, 2022).

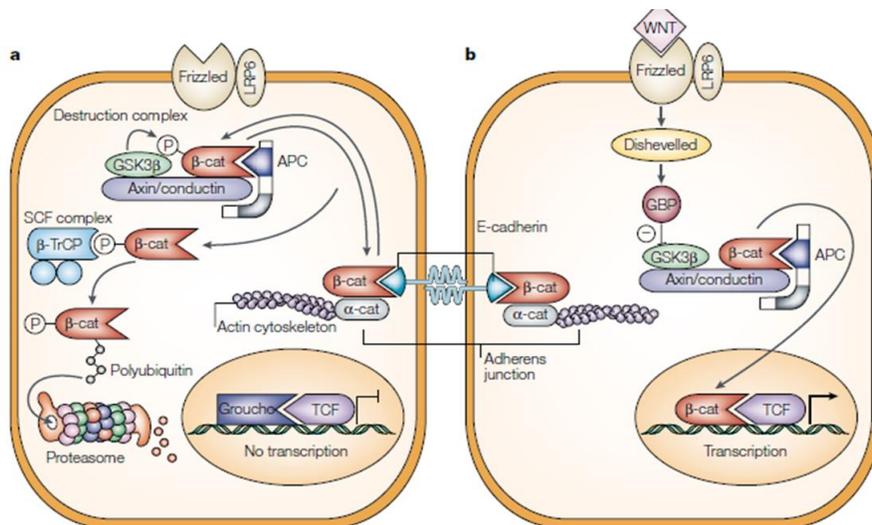
### **a) Cambios celulares**

El proceso comienza con una mucosa histológicamente normal, progresa a un estadio precursor adenomatoso y finaliza con un carcinoma invasivo. El CRC es una inestabilidad genética que puede surgir a través de al menos dos mecanismos diferentes: inestabilidad cromosómica e inestabilidad de microsatélites (Yaeger y col., 2016).

**1. Inestabilidad cromosómica** (84% de los casos de CCR): caracterizada por cambios drásticos en el número y la estructura de los cromosomas, como deleciones, translocaciones y otros reordenamientos cromosómicos. Las mismas vías moleculares principales causan CCR (CCRs) esporádico, ya que la inestabilidad cromosómica, la inestabilidad de microsatélites (MSI) y el fenotipo de metilación de islas CpG (CIMP) contribuyen al desarrollo de CCR. Por lo tanto, muchos de los mismos genes son genes causantes como APC, KRAS, P53, PIK3CA, SMAD4, ARID1A, MYC y otros, es importante tener en cuenta la importancia de cada gen (Schirripa y Lenz, 2016).

**2. Vía Wnt.** Las Wnt son una familia de 19 glicolipoproteínas que pueden activar la señalización de manera sinérgica. La señalización de Wnt (Figura 2) se puede clasificar como canónica, es decir, dependiente de  $\beta$ -catenina o no canónica (independiente de  $\beta$ -catenina). La vía de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina regula procesos como la regeneración de tejidos, la diferenciación de células madre y la proliferación celular (Mantilla y col., 2015). La  $\beta$ -catenina juega un papel importante en la integridad epitelial, interactúa con E-cadherina y forman un complejo que mantiene la adhesión de célula a célula (Matly y col., 2021). Con ello, el movimiento y el crecimiento de las células tumorales están restringidos. La pérdida de E-cadherina se asocia con un aumento de la motilidad celular debido a la pérdida de

adhesión celular, liberando  $\beta$ -catenina en el citoplasma que se se trasloca al núcleo celular, lo que resulta en la activación de los genes diana aguas abajo que causan anomalías. proliferación, migración, invasión y metástasis (Zhong y col., 2021). Además, tanto la  $\beta$ -catenina, citoplásmica como la nuclear, es un efector principal de la vía de señalización canónica de Wnt (Wangford y col., 2013). El gen APC es un importante regulador negativo de la vía Wnt, formando el complejo Axin-APC, caseína quinasa 1 (CK1) y glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3 $\beta$ ) que promueve la degradación proteasomal del efector Wnt  $\beta$ -catenina (Fodde y col., 2001). Si este complejo es defectuoso por una inactivación mutacional de APC, el exceso de  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo llevando a cabo la unión a la familia de factor de células T/factor potenciador de linfoides y a la activación de Ciclina D1. C-Myc y CD44 (Noe y col., 2021). La alteración de la vía Wnt conlleva a la desregulación de la proliferación y la diferenciación en el desarrollo de criptas displásicas, donde progresan a adenomas. Las anomalías de la vía Wnt son características de la mayoría de los cánceres colorrectales esporádicos. Más del 80 % de los adenomas y CCR tienen mutaciones en APC, y otro 5% a 10% tiene mutaciones o cambios epigenéticos en otros componentes de la señalización de WNT (Schirripa y Lenz, 2016).



**Figura 2.** Vía de señalización Wnt. a) Ausencia de señal Wnt, el nivel de  $\beta$ -catenina intracelular libre se minimiza enviándola a degradación en el proteasoma (complejo APC, axina/y glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )). b) En presencia de Wnt se

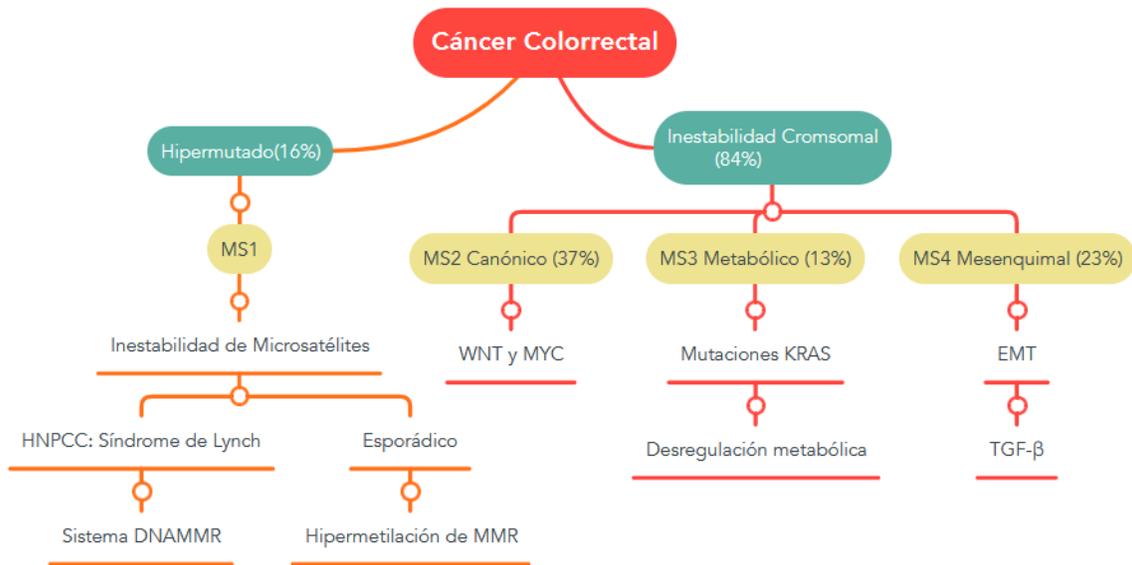
activa su receptor, Frizzled, en complejo con LRP6. Esto conduce a una cascada de señalización. En consecuencia, la  $\beta$ -catenina no puede ser destruida y queda libre para difundirse en el núcleo, donde actúa como coactivador de los genes que responden al TCF (imagen tomada de Fodde y col., 2001).

### **3. Inestabilidad de Microsatélites** (del 13 al 16% de los CCR esporádicos):

Los microsatélites son secuencias repetitivas cortas en tándem de 1 a 6 nucleótidos extendidas por todo el genoma humano. Los sitios de microsatélites son propensos a errores de replicación del ADN debido al deslizamiento del ADN polimerasa durante el proceso de replicación, ocasionado la inserción de bases adicionales o su eliminación (Reiter y col., 2019). La reparación de errores de ADN (MMR), son clave de la integridad del genoma. El sistema MMR está compuesto por al menos diez proteínas, MSH2-MSH6 o MSH3 forma complejos MutS $\alpha$  y MutS $\beta$ ; MLH1-PMS2, PMS1 o MLH3 forma MutL $\alpha$ , complejos MutL $\beta$  o MutL $\gamma$ , respectivamente (Diao y col., 2021). Durante la replicación del ADN, los heterodímeros MSH2/MSH6 (MutS $\alpha$ ) y MSH2/MSH3 (MutS $\beta$ ) son responsables del reconocimiento de desajustes y bucles de inserción-delección. Cuando se presentan mutaciones de línea germinal o somáticas en uno de los genes, encontramos un MMR deficiente (dMMR ocasionado una condición) (Schirripa y Lenz, 2016). Otro factor importante es el silenciamiento epigenético del promotor del gen MLH1 a través de la metilación de la isla CpG que bloquea la expresión de MLH1 y conduce al fenotipo dMMR/MSI en el 90% de los cánceres colorrectales esporádicos (CRC) asociados con MSI (Ishida y col., 2018). Las mutaciones de la línea germinal en los genes MMR (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) conducen a un síndrome hereditario autosómico dominante denominado CCR hereditario sin poliposis o síndrome de Lynch. Los tumores inestables de microsatélites comparten características clínicas y patológicas específicas, como la ubicación primaria en el lado derecho, poca diferenciación celular, lesiones con presencia de mucina y aumento del número de linfocitos (Berg y Soreide, 2011).

De acuerdo con la clasificación de CCR, hay cuatro subtipos moleculares que permiten comprender el comportamiento, pronóstico y la respuesta al tratamiento (Figura 3) (Shah y Itzkowitz, 2022). Existe una relación estrecha entre la

localización, histopatología, grado de diferenciación celular y extensión neoplásica con el pronóstico de los pacientes con cáncer de colon. Para determinar el diagnóstico preciso, es fundamental considerar el dictamen anatomopatológico (Machado y col., 2011).



**Figura 3.** Clasificación de Cáncer de colon (CCR). Correlación de los subtipos SMC con el mecanismo molecular. Imagen adaptada de Müller y col., 2016).

Los primeros hallazgos de la neoplasia colorrectal son los focos de criptas aberrantes o FCA visibles mediante tinción con azul de metileno o mediante microscopía. Los FCA suelen abarcar pocas criptas y pueden estar compuestos por células de morfología normal (no displásicas), o por células displásicas (Al- Sohaily y col., 2012). Estas últimas tienen más probabilidades de evolucionar y convertirse en un pólipo. Los pólipos, al igual que sus homólogos de la FCA, pueden ser de dos tipos: hiperplásicos (no displásicos) y adenomatosos (displásicos). Los pólipos hiperplásicos conservan una arquitectura y una morfología celular normal. Mientras que los pólipos adenomatosos se caracterizan histológicamente por anomalías en la organización intercelular e intracelular. Se refieren a pólipos de origen epitelial caracterizados por un exceso tubular, veloso o túbulo-veloso; de éstos, los de tipo veloso son los de mayor potencial maligno de células displásicas. El epitelio está

organizado en múltiples capas, los núcleos están agrandados y su alineación en la membrana basal se pierde (Itzkowitz y Yio, 2004).

1. CMS1 (subtipo inmune, 14% de los casos). Este subtipo de CCR se caracteriza por el mecanismo de inestabilidad de microsatélites, hipermutación, hipermetilación y mutaciones BRAFV600, fuerte infiltración de células inmunes y predominio en colon proximal (Alonso y col., 2006). El perfil de expresión génica evidencia una fuerte activación inmune (activación, infiltración de células NK, células Th1 y células T citotóxicas, prominentes linfocitos T citotóxicos, CD8+). Los pacientes con el subtipo CMS1 tienen muy mala tasa de supervivencia después de la recaída. Su patogenia se origina por la reparación defectuosa de los errores de emparejamiento del ADN (MMR), con alto CIMP y frecuentes mutaciones de BRAF (Al- Sohaily y col., 2012).

El 86% restante de los CCRs presentan inestabilidad cromosómica y se clasifican en 3 grupos:

2. CMS2 (subtipo canónico, 37% de los casos). Hay pérdida de genes supresores de tumores y mayor el número de copias de oncogenes que los otros subtipos, existe diferenciación de células epiteliales y mayor expresión de EGFR y HNF4A (Pai y col., 2019). Los pacientes con CMS2 tienen una mejor tasa de supervivencia después de la recaída en comparación con los otros subtipos (Al- Sohaily y col., 2012).

3. CMS3 (subtipo metabólico, 13% de los casos). Su nombre hace referencia a la reprogramación de vías metabólicas, mutaciones KRAS (Pai y col., 2019).

4. CMS4 (subtipo mesenquimal, 23% de los casos). Presenta una transición en el epitelio-mesenquimal con activación predominante del factor de crecimiento transformante beta, existe infiltración muy prominente de células estromales, con infiltración de células inmunitarias con interleucinas (IL) 23 y 17. Mayormente se ha asociado con la localización en el colon distal (Alonso y col., 2006).

## 2.3 Proteínas

Las proteínas son polímeros o macromoléculas conformadas por unidades de aminoácidos, agrupados en serie, formadas por la unión covalente del grupo  $\alpha$ -carboxilo de un aminoácido al grupo  $\alpha$ -amino de otro aminoácido acompañado de la pérdida de una molécula de agua (residuo) obteniendo así un enlace peptídico o enlace amida (Stryer col., 2015), estas moléculas presentan una gran diversidad en su estructura tridimensional y son fundamentales al conformar hasta el 50% del peso seco en las células vivas (Cárdella y col., 2007; Orengo 2013; Blanco 2017).

Las proteínas poseen una cadena polipeptídica formada a su vez por una cadena principal unida a cadenas laterales (cadena R) que da la identidad de una proteína. Debido a esto, el carbono  $\alpha$  es definido como un átomo de centro quiral (Lozano y col., 2006). Cada proteína varía en estructura, carga eléctrica, solubilidad en agua, tamaño y orden de unión de los aminoácidos que la componen (Lehniger, 2018, Stryer y col., 2015). Las actividades estructurales y funcionales de las proteínas dentro de los organismos son como precursores de importantes neurotransmisores, hormonas, coenzimas, metabolitos intermediarios de vías metabólicas, catalizadores, actividades de transporte y almacenamiento de moléculas y protección inmunológica entre otras (Cárdella y col., 2007, Stryer y col., 2015).

Gracias al trabajo de Frederick Sanger en 1953, al determinar la secuencia de aminoácidos de la insulina, una hormona proteica (Cárdella y col., 2007 y Stryer y col.; 2015) se establecieron las bases para la descripción básica y esencial de acuerdo a su estructura proteica:

1. Estructura Primaria. Comprende la descripción de secuencia de todos los residuos de aminoácidos definida con precisión de una proteína (Battaner, 2013). La mayoría de las proteínas contienen entre 50 y 2,000 residuos de aminoácidos (Stryer y col., 2015).
2. Estructura Secundaria. En una misma proteína pueden coexistir regiones con plegamientos de diversos tipos. A la disposición de estos plegamientos o segmentos de polipéptidos cortos en la proteína se le conoce como estructura secundaria.

(Orengo, 2013 y Lehniger, 2018). Los enlaces que mantienen esta estructura son no covalentes (Blanco, 2017). El plegamiento secundario de la cadena peptídica puede adquirir diversas formas, pero las más importantes son hélices y láminas (Battaner, 2013), de las cuales la hélice  $\alpha$  es la más común, más adelante se identificaron otras estructuras como el giro  $\beta$  y el bucle  $\Omega$  (Harvey, 2011 y Stryer y col 2015).

3. Estructura Terciaria. Se considera como la disposición tridimensional y montaje de la proteína (Murray, 2013). Describe todos los aspectos del plegamiento de un polipéptido (Lehniger, 2018). Los enlaces que mantienen esta estructura son: enlace covalente, enlace iónico, enlace por puente de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y enlaces hidrofóbicos (Harvey, 2011 y Blanco, 2017).
4. Estructura Cuaternaria. Se refiere al ordenamiento espacial de dos o más subunidades polipeptídicas y la naturaleza de sus interacciones (Cárdella y col., 2007). La forma más simple de una estructura cuaternaria es un dímero. También son comunes estructuras cuaternarias más complicadas como la hemoglobina (Stryer y col., 2015). En este nivel de organización, las subunidades de proteínas se conservan unidas esencialmente por fuerzas no covalentes, estas interacciones son las mismas descritas en la estructura terciaria (Blanco, 2017).

Las proteínas juegan un papel importante en el mantenimiento y la supervivencia de las células vivas. El plegado adecuado de una cadena de polipéptidos a su estructura nativa, es un requisito previo para su funcionalidad. La estructura tridimensional que obtiene una proteína está determinada por su secuencia de aminoácidos, así como por sus interacciones con las chaperones moleculares, el mecanismo de control de calidad celular y la formación de enlaces disulfuro entre otras. Cuando falla el proceso uno de los elementos en el mecanismo de control de calidad, la proteína permanece en un estado erróneo de plegamiento que conduce a diversas condiciones fisiopatológicas (Prabhu y Sarkar, 2018).

### 2.3.1 Lectinas

Las lectinas se definen como un grupo de proteínas o glicoproteínas de origen no inmune, que poseen la capacidad de unirse de forma reversible y aglutinar selectivamente a carbohidratos, polisacáridos o glucolípidos de células vegetales y/o animales a través de al menos dos sitios de unión (Goldstein y col., 1980). El término 'lectina' se origina en la palabra latina *legere*, que significa elegir o seleccionar eludiendo su capacidad para seleccionar líneas celulares y en su unión en la superficie (Boyd y Shapleigh, 1954). Dichas glicoproteínas son biológicamente activas y se encuentran en todos los reinos y/o subdivisiones taxonómicas. En tejidos vegetativos están principalmente en semillas u órganos de almacenamiento de las plantas (Lis y Sharon, 1986; Lagarda y col., 2017; Hashim y col., 2017).

La ricina fue la primera lectina descubierta en las semillas de la planta de ricino, *Ricinus communis*, en 1888,. De modo similar, la ricina y la abrina fueron parte de los principios básicos de la inmunología ya que fueron objeto de estudio como modelos antígenos en los ensayos inmunológicos (Silva, 2019; Gautam y col., 2020). Por otro lado, la concanavalina A fue la primera lectina que se caracterizó en términos de estructuras primarias y tridimensionales (Hardman, 1972).

En referencia a su estructura general es conveniente destacar algunas características como su especificidad a carbohidratos que se determina a través de los sitios de unión en el perfil de aminoácidos presentes de la estructura tridimensional de las lectinas a través de dominios de reconocimiento de carbohidratos mejor conocidos (por sus siglas en inglés) como CRD. Las interacciones entre lectinas y sus ligandos se consiguen principalmente a través de enlaces de hidrógeno, coordinación de metales, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas e hidrofílicas (Hashim y col., 2017).

Las lectinas desempeñan diversos efectos biológicos y esto depende del organismo en que se encuentre. Las funciones más destacables son: identificación, detección, aislamiento y estudios estructurales de glicoproteínas (Sharon y Lis, 2004), actividades mitogénicas y antiproliferativas en líneas celulares de procesos

patológicos como el cáncer, inhibición de crecimiento bacteriano y fúngico, acción como agentes promotores de la agregación celular, actividades inmunomoduladoras (Gautam y col., 2020), agentes antiparasitarios (Hashim y col., 2017), agentes antivirales (Lusvarghi y Bewley, 2016; Hashim y col., 2017), como promotores de la cicatrización en heridas cutáneas (Brustein y col., 2012) e insecticidas (Gautam y col., 2020). En el Cuadro 1 se muestran ejemplos de lectinas con acción anticancerígena.

Las lectinas son factores antinutricionales que producen efectos adversos dependiendo de su fuente, su concentración y la vía de administración (Savelkoul y col., 1992; Reynoso-Camacho y col., 2003; Ferriz-Martínez y col., 2015). Esto se ha demostrado por la unión de las lectinas al epitelio intestinal que puede interferir con la absorción de nutrientes, la reducción de la retención de nitrógeno, el aumento de la excreción de nitrógeno urinario y la reducción de la producción de insulina en ratas (Pita-López y col., 2020). Las lectinas de leguminosas son capaces de resistir la digestión gástrica e intestinal y pueden permanecer intactas a lo largo del tracto digestivo durante varios días (Pusztai y col. 1996; Ranilla y col., 2007; Ferriz-Martínez y col., 2015).

**Cuadro 1. Efecto de lectinas en línea celulares cancerígenas**

Cáncer	Línea Celular	Lectina	Resultados	Referencia
Colon	HT29	Frijol tépari ( <i>Phaseolus acutifolius</i> )	Apoptosis en las células de cáncer de colon por la participación de p-p53(ser46).	Moreno-Celis y col., 2020.
	SW480, SW48	Guisante ( <i>Pisum sativum</i> )	Inhibición del crecimiento de células transformadas de forma dependiente de la dosis. Activación de inhibidores tumorales. Ocasiona una alteración de la morfología celular, activa las expresiones de p53, p21, caspasa-3 y -9 y suprime la expresión de PARP1	Islam y col., 2018.

	Caco-2	ZG16p (Proteína 16 de los gránulos de zimógeno)	Inhibe la proliferación de las células Caco-2 a través de Asp151	Mito y col., 2018.
Cáncer de mama	MCF-7	Lectina de garbanzo (CAL)	Arresto del ciclo celular en células de cáncer de mama humano MCF-7	Gupta y Bhagyawant, 2018.

A lo largo de los años, los investigadores han buscado formas de clasificar a las lectinas, con base al número y tipo de dominio: Merolectinas, Hololectinas, Superlectinas y Quimerolectinas. Otra clasificación fue de acuerdo a su estructura terciaria: De acuerdo a esta clasificación las lectinas presentan 14 tipos diferentes de pliegues (Silva, 2019), las más relevantes son: Pliegue tipo C, pliegue tipo P, pliegue tipo  $\beta$ -sandwich/jelly-roll, pliegue  $\beta$ -trebol, pliegue  $\beta$ -hélice, pliegue  $\beta$ -prism II, pliegue tipo fibrinógeno, pliegue  $\alpha/\beta$  y pliegue heveína (Gautam y col., 2020).

Más adelante las lectinas entraron a un grupo de clasificación más completo que involucra el plegamiento de las proteínas, los dominios/similitudes estructurales y la relación evolutiva de las proteínas. Esta clasificación parte de su origen:

1. Animal: Galectinas, Lectinas de tipo C (CTL), Pentraxinas, lectinas de tipo I (o siglecs), otras familias como lectinas de tipo X (XTL) y ectinas de tipo F (Gautam y col., 2020).
2. Vegetal: Proteínas de unión a quitina, *amaranthin*, *Cucurbitaceae phloem*, lectinas relacionadas con *Jacalin*, receptores de manosa 6-fosfato, entre otras (Hashim y col., 2017).

### 2.3.1.1 Lectinas de frijol Tépari

El frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) es una especie de cultivo originario de los desiertos de México y del suroeste de Estados Unidos, es considerado una fuente de tolerancia a la sequía y a la sal lo cual es importante para la producción en zonas de precipitaciones marginales (Blair y col., 2012). *Phaseolus* es el género de frijol que se encuentra entre las leguminosas de grano más importantes para uso alimentario (Broughton y col., 2003). Los frijoles se cultivan en todo el mundo, pero

principalmente en América del Sur y Central, África, India y China. (Popelka y col., 2004).

Los primeros estudios en nuestro equipo de trabajo fueron por parte de García-Gasca y col. (2012), donde se estudiaron inhibidores de proteasas y lectinas, estas últimas mostraron actividad aglutinante. En este mismo estudio para determinar el efecto de la lectina sobre las células transformadas humanas, se realizaron curvas dosis-respuesta en células de cáncer de mama (MCF-7 y ZR-75-1), células de cáncer de cérvix (HeLa, SiHa y C33-A) y células de cáncer de colon (CaCo2). Las células de cáncer de colon fueron las más sensibles al efecto antiproliferativo de la lectina, con la menor CL50.

### **2.3.1.2 Purificación de lectinas**

La propiedad esencial de las lectinas de reconocer otras moléculas de forma diferencial convierte esta propiedad en un interés dentro de la investigación para profundizar su purificación. Cuando la lectina se extrae de su fuente natural para purificarla, se debe tener especial cuidado con la reproducibilidad en todos los pasos del procedimiento, desde la colecta de las muestras. Para la purificación de la lectina, las técnicas más utilizadas son la cromatografía de afinidad y la HPLC (Silva, 2019).

El proceso de aislamiento y purificación de las lectinas trae consigo una serie de pasos que deben ser llevados a cabo en condiciones de frío. Se inicia eliminando la grasa utilizando acetona o hexano, para colocar posteriormente la proteína en buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.2 y así realizar diálisis y una o más precipitaciones con sulfato de amonio para remover las proteínas adicionales. Las fracciones que resultan positivas a hemoaglutinación, se cargan a una columna de filtración en gel o de cromatografía de afinidad, y las proteínas sustraídas son posteriormente sometidas a separación por medio de la técnica de electroforesis SDS-PAGE que confirma su peso molecular de 28 kDa 35 kDa aproximadamente en lectina de frijol Tépari (Gautam y col., 2020; Cervantes-Jiménez y col., 2020).

Las técnicas actuales de purificación presentan dificultades para la producción de lectinas en gran escala (Gautam y col., 2020) esto se debe al costo elevado, el uso de reactivos, tiempo prolongado que se requiere para llevar a cabo el procedimiento para obtener un bajo rendimiento, las variaciones en el proceso de purificación, el lote y el proveedor pueden causar variabilidad en la afinidad de unión de la lectina Silva, (2019). Otro inconveniente es la falta de disponibilidad de técnicas de purificación para la producción a gran escala de la mayoría de las lectinas. Por lo general, las lectinas se han purificado mediante precipitación con sales o disolventes orgánicos y utilizando algunas técnicas cromatográficas, todas con dificultades en las aplicaciones a gran escala. Las técnicas alternativas de purificación que cumplen estos criterios son la tecnología de membranas, la precipitación por afinidad y la separación en dos o más fases acuosas inmiscibles (Gautam y col., 2020).

### **2.3.1.3 Lectinas recombinantes**

La producción de lectinas a partir de su fuente original no ofrece buenos rendimientos. Por esta razón se desarrolló la producción de una lectina recombinante obtenida a partir de la levadura *Pichia pastoris* utilizando ingeniería genética (Martínez-Alarcón y col., 2020).

*Saccharomyces* fue un sistema de producción de microorganismos recombinantes por excelencia, sin embargo, en el caso de lectinas leguminosas, tiene la desventaja de producir N-glicanos con alto contenido en manosa y cadenas externas de una longitud típica de 50-150 residuos (~>9 a ~27 kDa), que son altamente antigénicas para los humanos (Demani y Vaishnav, 2009) y ha sido sustituida por la levadura *Pichia pastoris*, que es capaz de producir glicoproteínas en altas concentraciones y también de excretarse, permitiendo la producción de mayores cantidades en el medio de cultivo (Chao y Etzel, 1994). *P. pastoris* además no añade residuos de  $\alpha$ -1-3 manosa, que son responsables de la naturaleza antigénica de las glicoproteínas secretadas por *S. cerevisiae*, además las proteínas pueden recuperarse directamente del medio de cultivo acoplándose al factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, que es un péptido señal que redirige la proteína a la vía secretora y que posteriormente es

escindido en el Golgi por las endopeptidasas de la levadura *Pichia pastoris* (Alarcon y col., 2018). Con ello en los últimos años, este procedimiento ha abierto una gama de posibilidades para la expresión de glicoproteínas en *P. pastoris* y ha demostrado ser un sistema excelente para producir algunos tipos de lectinas que podrían dirigirse a una vía secretora (Martínez-Alarcón y col., 2018).

Las modificaciones derivadas de la expresión heteróloga de la una lectina de frijol Tépari no afectaron a su plegamiento ni a su comportamiento biológico (Palmerín-Carreño y col., 2021). Otro ejemplo es en la lectina de *Nicotiana tabacum*, también llamada Nictaba, una lectina vegetal. Para mejorar y facilitar la purificación de la lectina del tabaco, clonaron el gen Nictaba en un vector optimizado para la expresión de la proteína en la levadura *Pichia pastoris*. La caracterización posterior de la lectina recombinante reveló propiedades de aglutinación y de unión a carbohidratos similares a la lectina nativa del tabaco (Lannooy col; 2007). En La frutalina, para mejorar y facilitar la disponibilidad de la lectina, clonaron una secuencia madura de la frutalina de codificación optimizada en el vector de expresión pPICZaA. Este vector de expresión, diseñado para la expresión de proteínas en la levadura *Pichia pastoris*, las diferencias fueron estadísticamente poco significativas (Oliveira y col., 2008). La lectina *Phaseolus vulgaris* fitohemaglutinina forma E (PHA-E) fue expresada y secretada por la levadura *Pichia pastoris* y similar a la proteína sintetizada en las plantas con respecto a la estructura y la actividad biológica (Baumgartner y col., 2002).

## **2.4 Marcaje de proteínas**

La capacidad del marcaje de proteínas abre un amplio panorama para poder identificar la localización, las interacciones con otros elementos y vías de señalización de dichas proteínas en el organismo lo cual sostiene la comprensión de procesos fisiológicos y patológicos (Li y col., 2013).

## **2.4.1 Técnicas de marcaje**

### **2.4.1.1 Marcaje de proteínas con anticuerpos**

La conjugación de anticuerpos también conocida como marcaje es un proceso necesario para la visualización y medición de resultados en inmunoensayos. En el cáncer se producen distintos antígenos en su superficie celular que se pueden clasificar en tres grupos principales: (i) Receptores sobreexpresados. (ii) Antígenos de diferenciación con distintos patrones de expresión en la superficie de las células maduras y (iii) Antígenos asociados a tumores (TAA) expresados en células que han tenido una transformación neoplásica. Estos antígenos permiten la unión selectiva de anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos, cada uno de ellos para una variedad de mecanismos anticancerígenos. La identificación de estos marcadores da lugar a muchas aplicaciones en el campo de la localización del cáncer, como son los métodos de marcado celular y la citotoxicidad específica. Los anticuerpos tienen una región determinante complementaria (CDR), responsable de las características antes mencionadas, y un dominio marco responsable de la estructura y la integridad (Schaedel y Reiter, 2006).

En la actualidad, el uso de anticuerpos monoclonales (MAbs) como portadores de entidades tumorales es un tema de interés (Govindan y Goldenberg, 2010). Para que esto ocurra, la fracción de la proteína efectora debe ser específica (Schaedel y Reiter, 2006). El método tradicional de producción de anticuerpos monoclonales ha sido la técnica del hibridoma, en la que los antígenos humanos eran examinados por anticuerpos de ratón, sin embargo, a través de los años los anticuerpos se han fijado en membranas (Wildt y col., 2005), vidrio derivado (MacBeath y Schreiber, 2000) e hidrogeles (Arenkov, 2000). Los antígenos unidos se han detectado utilizando isótopos radiactivos (Reichert y col., 2005), fluorescencia (Haab, 2003) y quimioluminiscencia (Lakowicz y col., 2004). Para el etiquetado las formas más utilizadas son directo o tipo sándwich (Haab, 2003).

El etiquetado directo es un método que mide proteínas en una mezcla compleja. Todas las proteínas se etiquetan con un fluoróforo o con un hapteno como la biotina.

Por lo general, el etiquetado se realiza mediante la reacción con los grupos aminos de las proteínas, utilizando moléculas como la N-hidroxisuccinimida o el isotiocianato acoplados al fluoróforo o a la etiqueta (Van y col., 2002). Las mezclas de proteínas etiquetadas se incuban en un *microarray* de anticuerpos, técnica que permite que los anticuerpos puedan inmovilizarse para capturar y cuantificar la presencia de proteínas específicas. La detección se produce a través de la etiqueta de cada proteína. El etiquetado directo tiene varias ventajas: todas las proteínas se etiquetan de la misma manera, por lo que no hay que realizar una nueva optimización del etiquetado; se pueden etiquetar diferentes muestras con diferentes etiquetas e incubar las muestras en las mismas matrices. Una desventaja de este método es debido a que todas las proteínas de una muestra están marcadas, incluidas las proteínas de alta concentración como la albúmina del suero, la unión o adsorción no específica de estas proteínas a los anticuerpos o al sustrato del *microarray* podría causar una interferencia medible. La unión de fondo podría reducir la sensibilidad de detección o la precisión de los datos. Una segunda desventaja del método es la posibilidad de que se interrumpan las interacciones anticuerpo-antígeno si la reacción de etiquetado altera el sitio de unión de un antígeno (Haab, 2003).

El inmunoensayo de sándwich de doble anticuerpo, en donde básicamente el primer anticuerpo captura el antígeno de la muestra que es detectado a través del conjugado anticuerpo-enzima o amplificado con un conjugado dirigido contra el segundo anticuerpo. Este método es más sensible que el método de etiquetado directo porque el fondo se reduce mediante la detección específica de dos anticuerpos en lugar de uno. El método de ensayo en sándwich no es tan fácilmente escalable como el método de etiquetado directo porque es más difícil encontrar pares emparejados de alta calidad que encontrar anticuerpos individuales contra objetivos particulares. El desarrollo y la validación de los ensayos que miden muchas dianas en paralelo es difícil debido al mayor potencial de reactividad cruzada y precipitación cuando se utilizan muchos anticuerpos de detección (Haab, 2003).

La conjugación química es un paso crítico para unir un trazador detectable a un anticuerpo o fragmento. Lo ideal es que el marcaje sea rápido y eficaz, con una proporción establecida entre el marcador y el anticuerpo, y que el inmunoc conjugado sea estable en condiciones *in vivo*. La precisión con la que los anticuerpos pueden identificar sus objetivos ha estimulado un amplio desarrollo de aplicaciones, especialmente en oncología. Los actuales métodos de diagnóstico por imagen, aunque son prácticos y eficaces, aún pueden mejorarse. La obtención de imágenes *in vivo* mediante el uso de anticuerpos proporciona un enfoque versátil para la identificación y caracterización de tumores para el diagnóstico, la estadificación y el manejo de la enfermedad. La detección y cuantificación no invasiva de biomarcadores es cada vez más necesaria para perfilar la enfermedad en pacientes específicos, y puede ser esencial para abordar la heterogeneidad *in vivo* (Freise y Wu, 2015).

La información de los experimentos de "perfilado de proteínas" puede revelar asociaciones entre proteínas o grupos de proteínas y estados de enfermedad o condiciones experimentales. Por ejemplo, a través de la medición de múltiples proteínas en muestras de suero de pacientes con cáncer y controles, se podrían identificar combinaciones de proteínas asociadas con el estado de la enfermedad (Haab, 2003).

#### **2.4.1.2 Marcaje de proteínas con proteína verde fluorescente**

La proteína verde fluorescente conocida por sus siglas en inglés como GFP, tiene una historia científica anterior a 1960 (Remington, 2011). La fluorescencia de la proteína fue aislada originalmente de una medusa de aguas profundas, *Aequorea victoria* por Shimomura y colaboradores, los cuales purificaron y caracterizaron la primera proteína productora de luz, descubrieron que la aequorina activada generaba luz azul, en lugar de verde (Villa y col., 2017). El color verde se producía en *A. victoria* por la excitación de una proteína intrínsecamente fluorescente (Chalfie, 1995). La proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa *Aequorea victoria* se clonó en 1992 (Chudakov y Lukyanov, 2003). Aunque se han examinado

varias GFP, las más estudiadas son las de *Aequorea* (A-GFP) y *Renilla* (R-GFP), (Chalfie, 1995).

Las proteínas fluorescentes son herramientas con una diversa gama de aplicaciones en muchos sistemas biológicos diferentes. En la última década, la proteína verde fluorescente se ha utilizado como marcador donde se vincula genéticamente a una variedad de proteínas con el objetivo de estudiar su distribución celular y su dinámica, así como visualizar el compartimento de células enteras en un organismo (Müller y Anderson, 2007). Los biosensores de proteínas fluorescentes se han utilizado para monitorear la actividad celular en tiempo real a través de las interacciones de los analitos con la proteína (Villa y col., 2017). Otros estudios se han enfocado en el ajuste de las propiedades intrínsecas, como el brillo, la longitud de onda de emisión, el tiempo de maduración, entre otros (Müller y Anderson, 2007).

Los primeros trabajos se centraron en comprender la naturaleza del fluorocromo y en mejorar sus propiedades. Se reveló la determinación de la estructura de la proteína la cual comprende un barril muy estable formado por 11 hebras beta que protegen el fluoróforo interno, formado por la ciclación de tres aminoácidos: Ser65, Tyr66 y Gly67 (Patterson y col., 1997). La estructura que rodea al fluoróforo de la proteína verde influye en gran medida en las propiedades fluorescentes de dicha proteína (Müller y Anderson, 2007). Además, el barril de la proteína verde está estabilizado por múltiples interacciones no covalentes que promueven su alta estabilidad a la desnaturalización térmica o química, así como su resistencia a la proteólisis. El cromóforo es sin duda la parte más interesante de una proteína fluorescente (Chudakov y col., 2010). El cromóforo de la proteína verde puede existir como aniónico o neutro, lo que explica la observación espectroscópica de dos bandas de absorbancia y excitación coincidentes. La forma neutra protonada o A absorbe en el ultravioleta (UV) a unos 395 nm, mientras que la forma aniónica o B absorbe a unos 475 nm (Remington, 2011).

Por otro lado, las propiedades de fluorescencia de la proteína verde se han modificado a través de mutagénesis, la mutante más utilizado, la GFP mejorada mejor conocido como eGFP por sus siglas en inglés, presenta un mayor brillo, una mayor fotoestabilidad y un único pico de excitación a 488-490 nm (Patterson y col., 1997). Con un alto nivel de iluminación, el fluoróforo de la GFP puede ser fotoblanqueado, y la intensidad de la luz utilizada para el fotoblanqueo no perturba notablemente las células vivas. Existen al menos dos variaciones principales de la técnica de fotoblanqueo: FRAP y FLIP:

- FRAP. La técnica FRAP mejor conocida como “recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo” se basa en la destrucción fotoquímica de un fluoróforo. Una región de una célula viva es irradiada por una luz intensa, haciendo que la proteína verde no sea fluorescente. Esta técnica da información sobre la velocidad de difusión y la fracción de proteína móvil (Chudakov y col., 2003).
- FLIP. La técnica FLIP mejor conocida como “pérdida de fluorescencia en el fotoblanqueo” se basa en la pérdida de fluorescencia fuera de la región blanqueada. Una región seleccionada en una célula viva se irradia repetidamente o durante un largo tiempo. Esta técnica proporciona información sobre la tasa de intercambio de fluoróforos entre las zonas blanqueadas y no blanqueadas (Chudakov y col., 2003).

#### **2.4.1.3 Marcaje de proteínas con metales**

Hasta la fecha existen numerosos métodos para la síntesis de nanopartículas (NPs), que incluyen métodos físicos, químicos y biológicos e híbridos (Magesh, y col., 2019). Se ha informado de síntesis de nanopartículas metálicas mediadas por plata, oro, hierro, cobre, zinc y titanio. Entre ellas, las nanopartículas de plata se han mostrado prometedoras como agente terapéutico, especialmente en la terapia del cáncer, la seguridad alimentaria y la purificación del agua (Kumar y Mamidyala 2011). El uso de nanopartículas de plata ha causado apoptosis, alterado la morfología celular, reducido la viabilidad de las células y generado estrés oxidativo,

lo que ha provocado la peroxidación lipídica de las membranas biológicas y el daño de las proteínas estructurales y el ADN (Foldbjerg y col., 2009). Estas nanopartículas se han utilizado para la obtención de imágenes por tomografía (Liu y col., 2013), como biosensor (Singh y col., 2014), para la detección ambiental (Saha et al. 2012), para la purificación del agua (Pradeep 2009), para el etiquetado del ADN y para aplicaciones de detección de vapor (Magesh, y col., 2019)

El comportamiento antioxidante de las nanopartículas de plata y oro las ha hecho útiles en la terapia de muchas enfermedades, incluido el cáncer. También se están investigando como portadores de fármacos (Fredman y col., 2015; Magesh, y col., 2019). Entre las nanopartículas metálicas, de oro (AuNP) se utilizan cada vez más en aplicaciones biomédicas debido a su naturaleza inerte, baja dispersión de tamaño (distribución de tamaño), alta estabilidad, síntesis comparativamente fácil, naturaleza no citotóxica y biocompatibilidad. Las nanopartículas de oro tienen propiedades ideales para su uso como nano material de contraste dirigido para la obtención de imágenes del cáncer (Fredman y col., 2015).

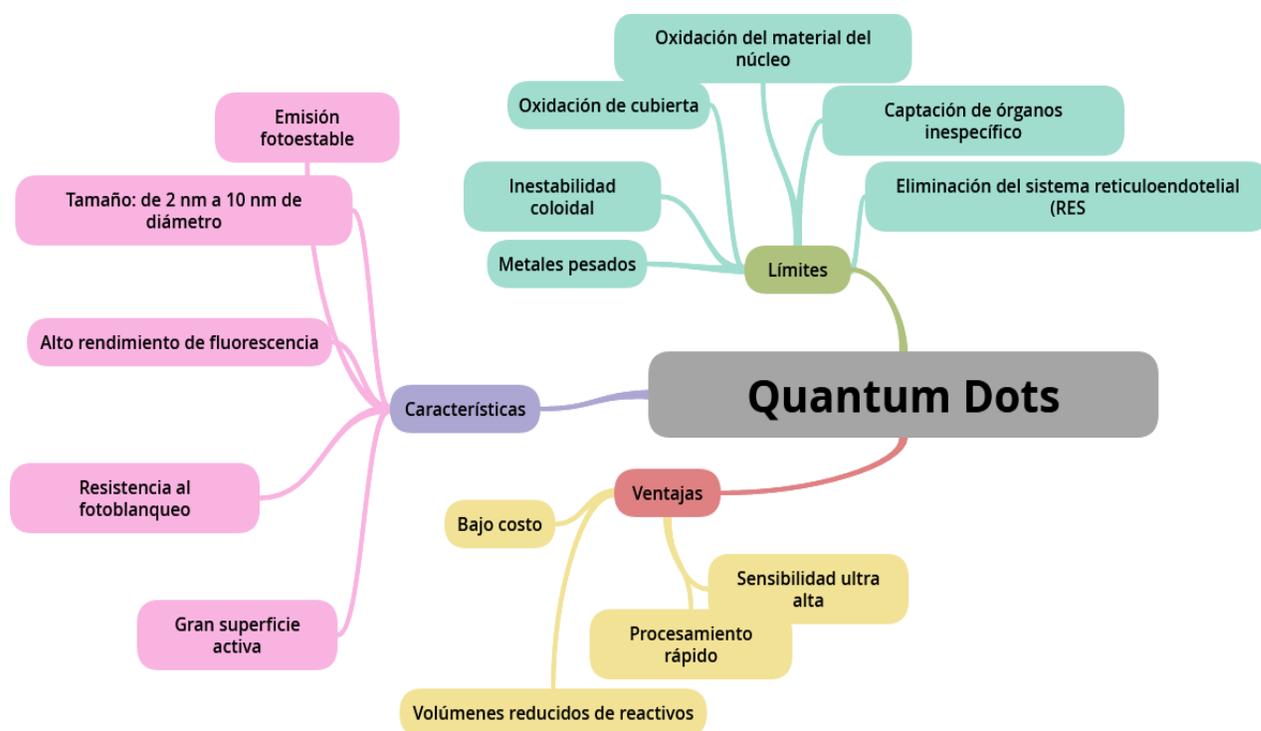
Por un lado, la estabilidad química, la biocompatibilidad y la tasa de reproducción de síntesis de las nanopartículas de oro es significativamente mayor que la de las nanopartículas de plata (González y col., 2021). En un estudio hecho por Sivakamur y col. (2019) se demostró que las nanopartículas de oro y plata dañan el ADN y activan las vías inflamatorias y apoptóticas, tras su capacidad de penetrar en las células a través de los canales iónicos, lo que provoca daños en la membrana celular.

## **2.5. Quantum Dots**

A lo largo de los años, la nanotecnología ha permitido el desarrollo de diferentes nanoestructuras que, a través de diversas técnicas de acoplamiento, se ha logrado conjugar proteínas, anticuerpos, lectinas y entre estos Quantum Dots, creando bioconjugados gluco funcionalizados (Cunha y col., 2018b; Ashree y col., 2019). Los Quantum Dots son una tendencia que revoluciona la biomedicina desde 1998, cuando se demostró su biocompatibilidad para imágenes de cáncer *in vitro*. Estos

nanomateriales son productos de Louis E. Brus desde los años 80 (Bera y col., 2010).

Los Quantum Dots se definen como nanocristales semiconductores en los que los excitones están confinados en las tres dimensiones espaciales, con un diámetro que va de un rango de 2 a 10 nm (Li y col., 2013). Hoy en día se han impulsado estudios sobre estos átomos artificiales por sus propiedades únicas en la biomedicina (Figura 4). Poseen una emisión de tamaño ajustable, alta fotoestabilidad, su superficie es químicamente activa, estabilidad, alto rendimiento de fluorescencia, se ha comprobado que sus propiedades ópticas son superiores a comparación de colorantes y proteínas fluorescentes convencionales (Olshansky y col., 2015; Prabhu y Sarkar, 2018).



**Figura 4.** Características de los Quantum Dots. Características, ventajas y limitantes de los Quantum Dots. Imagen adaptada de Zhang y col., 2022).

El principal interés de estos nanomateriales es la biocompatibilidad que ofrece cuando se conjuga con biomoléculas como las lectinas. Una preocupación inicial era la disminución del efecto por parte de cada biomolécula. Sin embargo, estudios

han demostrado que en éste la citotoxicidad y la fluorescencia no se ven alterados posterior al acoplamiento (Cervantes-Jiménez y col., 2020).

Los Quantum Dots presentan una alta relación superficie/volumen y por ello pueden ser biocompatibles con moléculas como las lectinas. Esto es debido al recubrimiento, el cual puede ser grupos amino, carboxilo o gluco nanomateriales que actúan como un andamio multivalente que transporta moléculas de carbohidrato, teniendo así la afinidad de unión con los receptores de reconocimiento (Jeong y col., 2012).

A pesar de las características físicas y ópticas únicas que promueven a los Quantum Dots también se propone como nuevas sondas de imagen y monitoreo para células cancerígenas y tejidos transformados (Cervantes-Jiménez y col., 2020). La limitación de estas nanopartículas surge inicialmente del material de su elaboración y su tamaño, generando inestabilidad coloidal y oxidación del material del núcleo (Ashree y col., 2019). Para disminuir esto se han tratado de cambiar sus componentes, modificado los tamaños, materiales y el recubrimiento de superficie, mejorando de buena manera su estabilidad y fluorescencia. Es importante comprender que las capas de recubrimiento no solo deben proteger el núcleo de la oxidación, sino que también no debe interferir en la interacción de la molécula acoplada con su receptor o lugar de (Cunha y col., 2018b).

Los QD de silicio son candidatos excepcionales y han mostrado resultados prometedores en la reducción de la citotoxicidad. Además, el silicio es un oligoelemento común en el cuerpo humano, el ácido silícico administrado al ser humano se excreta eficientemente a través de la orina (Ashree y col., 2019). Choi y col. (2018) han definido los requisitos para la filtración renal y la excreción urinaria de QD utilizando roedores como sistema modelo. Con este trabajo concluyó que el tamaño del QD debe controlarse por debajo de 5.5 nm para lograr una excreción urinaria eficiente y la eliminación de los QD. Estos hallazgos también han sido confirmados por Lv y col. (2019).

**Capa externa:** La capa externa de los puntos cuánticos generalmente presenta una característica hidrofílica, para que la nanopartícula sea soluble en agua. Se implementaron técnicas como el recubrimiento con silicio, intercambio de ligandos y encapsulación de polímeros anfifílicos (con un extremo soluble en agua y en el otro hidrófobo), para hacer que los puntos cuánticos sean solubles en agua (Prabhu y Sarkar, 2018), también se han desarrollado recubrimientos biodegradables que mejoren su eliminación (Jeong y col., 2012).

**Clasificación-Tipos:** Estos nanocristales se encuentran principalmente como composiciones binarias de materiales semiconductores y se clasifican como II-VI, III-V o IV-VI, en relación con sus familias de la tabla periódica. La síntesis de QD para fines biológicos generalmente se lleva a cabo mediante la formación controlada de nanopartículas coloidales en medios hidrófobos e hidrófilos (Ashree y col., 2019).

**QD Orgánicos:** Los puntos de carbono (puntos C) son puntos cuánticos que tienen carbono como material principal. Son menos dañinos y pueden ofrecer beneficios farmacológicos con alto potencial. Estos puntos C tienen fotoluminiscencia fuerte y sintonizable, toman la delantera en términos de solubilidad, inercia química, facilidad de funcionalización, alta resistencia al fotoblanqueo, menor toxicidad y biocompatibilidad. Además, presentan un enorme alcance de síntesis a partir de varias fuentes novedosas (Cunha y col., 2018b).

Aunque se observó que los QD de CdSe/ZnS no inducían una toxicidad apreciable en las ratas Sprague-Dawley durante su estudio (Hauck y col., 2010), otros autores observaron toxicidad significativa de los QD de CdSe/ZnS en ratas Wistar (Tiwari y col., 2011), que incluía un aumento de las enzimas hepáticas y de la inflamación del hígado. En un estudio realizado por Roberts y col. (2013), se informó de lesiones e inflamación pulmonares tras la administración de QD de CdSe/ZnS en ratas. Asimismo, Ho y col. (2013) observaron inflamación persistente y la formación de granulomas en el pulmón de ratones tras la administración de QD a base de cadmio. Además, se observó hiperplasia e hinchazón del endotelio capilar glomerular en las secciones del riñón. A fin de abordar las preocupaciones sobre la toxicidad del

contenido de cadmio, se ha hecho un esfuerzo considerable para fabricar QD sin cadmio, como se ha examinado recientemente (Xu y col., 2016). Se ha desarrollado una variedad de QD libres de cadmio con núcleos compuestos de materiales como el sulfuro de plata ( $\text{Ag}_2\text{S}$ ), seleniuro de plata ( $\text{Ag}_2\text{Se}$ ), indio-sulfuro de plata ( $\text{AgInS}_2$ ) y sulfuro de cobre-indio ( $\text{CuInS}_2$ ) (Xu y col., 2016). También se han desarrollado varios tipos de QD basados en fosfato de indio (An y col., 2018).

Yao y col. (2018) presentaron un estudio detallado de la toxicología y la biodistribución de los puntos cuánticos basados en el indio en ratas tras la inyección intravenosa de cola. Tras su administración, los QD se acumularon principalmente en el hígado y el bazo y se excretan del cuerpo gradualmente, este estudio indicó acerca de la degradación de los QD se producía en el hígado. En el pulmón, se ha informado de que los QD causan inflamación, formación de granulomas y disfunción pulmonar (Ho y col., 2013; Roberts y col., 2013; Tang y col., 2013).

### **2.5.1 Marcaje con Quantum Dots**

Debido a las propiedades únicas de los Quantum Dots, los mecanismos de unión o conjugación con biomoléculas pueden ser una herramienta poderosa para el diagnóstico molecular de enfermedades. Por lo tanto, es indispensable que la estrategia de conjugación sea optimizada para cada combinación QD-estabilizador-biomolécula. A lo largo de los años se han desarrollado diversos mecanismos de unión de un Quantum Dots a un sustrato o proteína (Cuadro 2), en este punto depende mucho los grupos reactivos presentes en la superficie del Quantum Dot (Cunha y col., 2018b). A pesar de la diversidad de mecanismos, existen principalmente cuatro estrategias utilizadas para conjugar QDs a un sustrato:

1. Adsorción: Se basa en las interacciones no covalentes entre el Quantum Dots con las biomoléculas, tales interacciones como electrostáticas e hidrofóbicas-hidrofóbicas.
2. Enlace covalente: Cuando los grupos funcionales de la superficie del Quantum Dot están unidos covalentemente a la biomolécula formando, por ejemplo, un enlace amida, amina o disulfuro.

3. Intercambio del estabilizador: Cuando el grupo que contiene biomoléculas que contiene un tiol (-SH) se agrega a los QD y se produce un intercambio del estabilizador.
4. Biotina QDs-Estreptavidina vinculante o QDs: Consiste en la modificación de la superficie con moléculas de PEG (polietilenglicol) para investigar la distribución y expresión de carbohidratos / lectinas en células y tejidos (Cunha y col., 2018a).

**Cuadro 2. Quantum Dots y su interacción con proteínas**

Quantum Dots	Conjugado	Objetivo	Longitud de onda de excitación	Longitud de onda de emisión	Referencia
CdTe	Cramoll	Bioconjugados como sondas de para la investigación de células de <i>Candida albicans</i>	488 nm	560 nm	(Cunha y col., 2018a).
CdTe QDs	Anticuerpos monoclonales anti-A o anti-B UEA 1	Análisis complementario y versátil para cuantificar la expresión del antígeno H de los glóbulos rojos	365 nm	548 nm y 610	(Cabral y col., 2015).
QD CdTe	ConA	Detección de microorganismos	450 nm	550 nm	(Ebrahim y col., 2015).
CdTe QDs	Aglutinina de estramonio de Datura (DSA) Aglutinina de Lens culinaris (LCA),	Evaluar perfiles de GalNAc y GlcNAc/manosa en células de carcinoma hepatocelular (HepG2)	488 nm	550 y 618 nm	(He y col., 2017).
CdSe/ZnS	DC-SIGN y DC-SIGNR (VIH y del virus del Ébola (EBOV-GP)	Sondas multifuncionales para diseccionar el reconocimiento multivalente de las proteínas y predecir la inhibición de las gliconanopartículas de la infección por virus a nivel celular.	546 nm	554 nm y 626 nm	(Guo y col., 2018).
QD	TBL	Acoplamiento entre TBL-IE2 con QD por medio de microfluídica	570 nm	560 y 574 nm	(Cervantes-Jiménez y col., 2020)
CdTe	Mercaptosuccinic acid (MSA), Cramoll	Evaluar los perfiles de glucosa/manosa en tres especies de <i>Cándida</i>	488 nm	571 nm	(Oliveira y col., 2020).

CdTe-MSA QDs	Con A	Etiquetado de estructuras ricas en sacárido en la superficie celular de candida albicans	488 nm	600 nm	(Tenório y col., 2015).
CuInS2	Quitosano carboximetílico (CM-CHIT),	Biosensor de fluorescencia sin etiqueta para "apagar" la lectina detección	656 nm		(Liu y col., 2016)

### 3. Justificación

El marcaje de proteínas recombinantes con Quantum Dots ha sido un modelo de trabajo poco explorado, siendo las lectinas nativas los modelos más explorados presentando alta visibilidad por microscopía de fluorescencia.

Se han acoplado diversas lectinas con nanopartículas, aunado a esto se han desarrollado diferentes técnicas de marcaje de proteínas que presentan potencial farmacológico, distintas proteínas acopladas a QDs han mostrado baja fluorescencia y poca homogeneidad en el marcaje, por ende, es necesario mejorar los métodos de marcaje y su eficiencia.

Lectinas de frijol Tépari nativas han sido marcadas exitosamente con QDs, cuyo potencial apunta a su aplicación diagnóstica. Actualmente se cuenta con una lectina recombinante a partir del frijol Tépari, por lo que es necesario estandarizar el marcaje para avanzar en el desarrollo de una molécula de este tipo marcada que permita su aplicación biomédica.

### 4. Hipótesis

Es posible marcar una lectina recombinante de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) con Quantum Dot por el método de microfluídica y caracterizar este complejo Lr-QD. Tras su observación y análisis en microscopía, dicho complejo mantendrá la actividad biológica de la lectina recombinante y las propiedades ópticas de los Quantum Dots.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo General

Obtener una lectina recombinante de la levadura *Pichia pastoris* y marcarla por el método de microfluídica para su posterior observación y análisis en microscopía.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Obtener una lectina recombinante de la levadura *Pichia pastoris*.
- Estandarizar el marcaje de la lectina recombinante (Lr) por el método de microfluídica a diferentes pH.
- Caracterizar el complejo Lr-Quantum Dots (Lr-QD).

## 6. Materiales y Métodos

### 6.1 Producción de la lectina recombinante (LR)

Para la obtención de la lectina recombinante a partir de la levadura *Pichia pastoris* previamente modificada genéticamente en el vector pGAPαZB se empleó la técnica estandarizada por Palmerín-Carreño y col. (2021). Brevemente, se prepararon 1.4 L de medio basal utilizando 1.18 g/L de sulfato de calcio $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O, 18.2 g/L de sulfato de potasio, 14.9 g/L de sulfato de magnesio $\cdot$  7H<sub>2</sub>O, 4.13 g/L hidróxido de potasio, 40g/L glicerol, 26.7 mL/L ácido fosfórico, 4.35 mL/L oligoelementos y 15 mg/L antiespumante VRF-30. El sistema se llevó a cabo con una alimentación de 50% v/v glicerol con medio basal y 2 mL/min oligoelementos. Se ajustó el pH del medio a 5 con una solución de amoníaco al 32% (v/v). Se preparó una solución de antiespumante VRF-30 y una solución de medio basal con glicerol ambas a 0.5% v/v de concentración. Seguido de esto se preparó una solución de amoníaco a una concentración de 32% v/v.

Con el fin de conservar la cepa productora de Lr, se prepararon tubos de cultivo con glicerol al 15% (v/v). Se prepararon 200 mL de glicerol al 30 % (v/v) se esterilizó a 121 °C, 15 psi durante 20 min. Seguido de esto se preparó un matraz bafleado de

250 mL con 100 mL de medio basal, se esterilizó de igual forma a 121 °C, 15 psi durante 20 min. El matraz se inoculó con una asada del cultivo de *P. pastoris* proveniente de caja o del cepario del Laboratorio de Biología celular, donde se incubó durante 24 a 48 h a 30 °C, 200 rpm. Se extrajo 1 mL del cultivo, realizando una dilución (1:10) con agua destilada. Con ello, se midió la absorbancia a una longitud de 600 nm, corroborando una absorbancia de 0.2 a 0.4. Por otro lado, se prepararon 10 tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL adicionándoles 500 µL de glicerol al 30% (v/v), seguido de esto a los tubos se les adiciona 500 µL del cultivo de *P. pastoris*. Su conservación fue a -80 °C.

Se empleó un biorreactor tipo tanque agitado Applikon de 3L con 2 impulsores tipo Rushton de 6 aspas planas, 4 baffles y un distribuidor de aire en forma de "L". Se vaciaron 1.4 L de medio de cultivo al biorreactor donde se colocaron los sensores de pH y oxígeno disuelto. Después de calibrar el sensor de pH se empleó buffer de pH 4.0 y 7.0, el biorreactor se esterilizó a 121 °C, 15 psi durante 20 min, seguido de esto se conectó con botellas de adición al controlador "in-control". Las condiciones de operación se programaron a 30 °C, 700 rpm, 1 vvm. Tras su operación, se adicionaron 3 mL de antiespumante VRF-30. Se dejó polarizando el sensor de oxígeno durante 12 h. Antes de la inoculación del biorreactor, se calibró el sensor de oxígeno a 100%. Finalmente se realizó el monitoreo en línea de los datos con el software Lucullus-lite.

Se preparó el preinóculo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio basal estéril. Seguido de esto, se inocularon los matraces con 100 µL de un cultivo en glicerol (15% v/v) de la cepa *P. pastoris* pGAPαZB, almacenado a -80 °C. Los matraces se incubaron a 30 °C a 200 rpm durante 24-48 h. Se realizó una dilución 1:10 con agua destilada a partir de 1mL del preinóculo. Posteriormente, se midió la absorbancia a una longitud de 600 nm y se corroboró a una absorbancia de 0.2-0.4 (1x10<sup>6</sup> UFC/mL). Más adelante el reactor se inoculó con el 10% v/v de preinóculo. Los controles se prepararon en matraces Erlenmeyer de 500 mL de medio estéril y se inocularon con 10 mL del preinóculo, los controles se incubaron a 30 °C, 200 rpm durante 7 días. Por otro lado, en el caso del biorreactor, se desarrolló la cinética a

30 °C con un flujo de aire de 1 vvm y con control variable de la agitación que fue de 700 a 1000 rpm, en función del oxígeno disuelto en el medio al 30-50%. Se controló la adición de la base con un pH de 5, según se requiriera. Más adelante, el muestreo del biorreactor se realizó en forma periódica a las: 0, 4, 8, 24, 32, 48, 56, 72, 80 y 96 h, tomando 8 mL de muestra. Con ello, se midió la densidad óptica a 600 nm, oxígeno disuelto, la producción de biomasa (peso seco) y la producción de proteína total.

La producción de biomasa se determinó de dos formas: por medición de la densidad óptica a 600 nm y por biomasa por peso seco. En el primer caso de la densidad óptica, se realizaron diluciones de las muestras para contar con lecturas de absorbancia en un rango de 0.1-0.8. De otra manera, en biomasa por peso seco, se midieron 2 mL del cultivo y se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min. Al descartar el sobrenadante, se suspendió la pastilla celular con 500 µL de agua estéril, donde se transfirió la pastilla a una charola de aluminio para el registrar su peso. El peso de la muestra con charola se registró y por diferencias gravimétricas, se obtuvo el peso de biomasa y se consideró el volumen de la muestra para determinar la concentración de biomasa producida.

## **6.2 Extracción y purificación de la lectina recombinante (Lr)**

La extracción de la lectina recombinante se realizó en el orden del siguiente procedimiento: preparación de buffer BB8x, pH 7.4, NaCl- 187.01 g/L y fosfato de sodio dibásico-22.7 g. Tanto para la muestra de biorreactor como de matraz, se midió 1 L de cultivo y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min. Sus análisis se realizaron por triplicado. La pastilla celular se descartó y se conservó el sobrenadante, filtrando el sobrenadante 2 veces con papel Whatman No. 11. Finalmente adicionamos 125 mL de buffer BB8X al medio.

La purificación de la lectina recombinante se realizó utilizando una columna de afinidad al níquel (GE Healthcare) que proporciona una capacidad de unión y un rendimiento excepcional para la purificación de proteínas recombinantes. Por fines prácticos por cada 250 mL de muestra: se pasaron 50 mL de agua destilada por la

columna, 50 mL de buffer BB1X, 250 mL de muestra en su medio crudo, 50 mL de buffer BB1X, 50 mL de Imidazol a 200 Mm. Con el procedimiento descrito, se recuperó la muestra con Imidazol, se pasaron 50 mL de agua destilada por la columna seguidos de 20 mL de etanol al 20% v/v y se resguardó la columna a 4 °C. El Imidazol recuperado con la Lr se sometió a un proceso de diálisis. Una vez obtenidas las muestras dializadas se congelaron con hielo seco y acetona en vasos de precipitado. Las muestras permanecieron durante 5 días para un volumen aproximado de 1 L, finalmente el polvo recuperado es almacenado a 4 °C. A través del método de Bradford (1976) se determinó la cantidad de proteína en función de la absorbancia (595 nm), empleando albúmina sérica de bovino (ASB) como curva estándar. Su concentración se calculó considerando la ecuación de la recta de la curva patrón.

### **6.3 Perfil electroforético**

#### **6.3.1. Tinción de Coomasie**

Los perfiles electroforéticos de las fracciones obtenidas se obtuvieron mediante SDS-PAGE, en geles de poliacrilamida al 10% (Laemmli, 1970). Se colocaron 6 µg de proteína por gel. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo Mini-Protean Tetra Electrophoresis Cell de Bio-Rad. Los geles se corrieron a 120 Volts, con la finalidad de observar el patrón de bandeo. Se tiñeron los geles con azul de Coomassie durante todo el día y se retiró el exceso de colorante con la solución metanol/ácido acético/agua (40%, 10%, 50% v/v/v).

#### **6.3.2 Tinción de ácido Peryódico de Shiff (PAS)**

Se fijaron los geles con etanol al 50% por 30 min, con agua destilada se lavó 2 veces por 10 min, se incubaron con una solución compuesta de ácido periódico al 1% (v/v), 3% ácido acético (v/v), por 30 min, posteriormente se lavaron los geles 6 veces por 5 min con agua destilada. Se utilizó metabisulfito de sodio al 0.1% con ácido clorhídrico para lavar los geles 2 veces por 10 min. Se incubaron los geles con reactivo Schiff 1 h en ausencia de luz.

## 6.4 Actividad aglutinante

Se determinó la actividad aglutinante específica en placas de 96 pozos. La actividad aglutinante se realizó en 3 placas diferentes, donde se colectaron 100  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) o agua destilada como control negativo en el primer pozo, brevemente en el siguiente pozo se agregó concentración de proteína conocida de lectina T1(1) 22.85  $\mu\text{L}$  con 77.15  $\mu\text{L}$  de PBS como control positivo, en el tercer pozo se agregaron por triplicado 100  $\mu\text{L}$  de lectina recombinante. Posteriormente se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de PBS a toda la placa y se realizaron diluciones triples seriadas comenzando en los primeros pozos y pasando a los siguientes (1A, 1B, 1C...,1L). Finalmente, a cada pozo se le agregaron 50  $\mu\text{L}$  de eritrocitos humanos A<sup>+</sup> al 2% previamente fijados con glutaraldehído (Turner y Liener, 1975) y se incubaron a 37° C durante 2 h. La placa se leyó en un microscopio invertido y la actividad aglutinante se determinó utilizando una escala arbitraria y apreciativa. La actividad específica se cuantificó mediante la ecuación descrita por Jaffé, (1980):

La actividad específica se cuantificó mediante la ecuación.

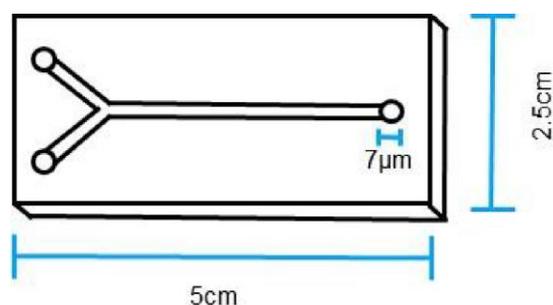
$$AE = \frac{2^n}{mg}$$

Donde: AE=Actividad específica aglutinante (U/mg) expresada en unidades por mg de proteína inicial, n=Última dilución con aglutinación apreciable al microscopio, mientras que mg es la cantidad de proteína presente en la muestra.

## 6.5 Acoplamiento por microfluídica

El procedimiento de acoplamiento se realizó de acuerdo a Cervantes-Jiménez y col (2020) con un microchip de polidimetilsiloxano (PDMS) con tamaño de poro 7 micras, fabricado por la Dra. Natalia Hassan en la Universidad Metropolitana de Chile (Figura 5). El microchip se lavó con una combinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: HCL: H<sub>2</sub>O en una proporción 1:1:5 (v/v/v) a una velocidad de flujo de 1.2 mL/h usando dos bombas de

jeringa de infusión (KDS 100 Legacy, KD Scientific, Holliston, MA, EE. UU). Después del enjuague con 1 ml de agua miliQ a un caudal de 6 ml/h. Seguido de esto, se inyectaron 300  $\mu$ L de trimetil octadecil silanol a 20  $\mu$ L/mL mediante los canales a una velocidad de flujo de 1.8 o 2.4 mL/h, posteriormente se realizó un enjuague secuencial con 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 2 mL de miliQ y 2 mL de acetona. Se aplicó aire a presión para secar el microchip y se usaron mangueras Tygon® de 15 cm de largo. Posteriormente, se preparó una solución de lectina disolviendo 200  $\mu$ g de lectina en 10 ml de tampón MES 0,1 M pH 7. La solución inicial de Quantum Dots se preparó disolviendo 10 mg de polvo CdTe-QD en 1 ml de agua desionizada (pH 6). El producto se recogió en microtubos de polipropileno de baja unión a proteínas y se dializó a través de una membrana de 3.5 kDa para eliminar la QD no acoplada, seguido de esto se realizaron las pruebas de caracterización correspondientes. Para comparar la eficiencia de los microfluídicos, se usaron las mismas diluciones de lectina y QD al mismo pH para el acoplamiento por enlace covalente (un método no microfluídico), usando glutaraldehído como agente de acoplamiento, que se mantuvieron en agitación continua durante 15 min y se dializó.



**Figura 5.** Microchip de polidimetilsiloxano. Distancia longitudinal 5cm, ancho 2.5cm. Se pueden observar de lado izquierdo las entradas de flujo por medio de los canales internos, en la parte derecha se muestra la salida de los flujos combinados, tamaño de poro 7 micras (Tomado de Cervantes-Jiménez y col., 2020).

## **6.6 Determinación de la emisión de fluorescencia Lr, Lr-QD, mediante microscopía multifotón**

La lectina recombinante (Lr), y el complejo Lr-QD se analizaron mediante microscopía multifotónica. Las muestras se montaron de forma independiente en portaobjetos de vidrio con cubreobjetos Zeiss de alto rendimiento ( $D = 0.17 \text{ mm} \pm 0.005 \text{ mm}$  índice de refracción =  $1.5255 \pm 0.0015$ , número de Abbe =  $56 \pm 2$ ) y se observaron bajo un microscopio (LSM 880 NLO, Zeiss, Alemania) equipado con un láser multiphoton Ti: Sapphire (Chameleon vision II, COHERENT, Escocia, Reino Unido) capaz de sintonizar entre rangos de 690 a 1060 nm. Las condiciones de operación en todos los experimentos fueron operadas con láser Chameleon a 1.0% de potencia y con un orificio abierto. Las áreas completas para las observaciones se llevaron a cabo con el objetivo de utilizar aceite de inmersión  $60\times/1.3, NA_{\infty}-0.17$ , Zeiss Plan Neofluar. Las imágenes se adquirieron separando la emisión en tres canales, región azul o UV (371–440 nm), región verde/amarilla (488–550 nm) y región roja (560-730 nm). Para la detección espectral, el software ZEN lite blue 2.5 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena; Alemania) utilizó el "modo lambda", escaneando las emisiones de 400 a 700 nm para todas las muestras, tomando una lectura cada 2 nm. Las imágenes se obtuvieron por excitación en dos longitudes de onda a 780 nm y 850 nm. Todas las imágenes se capturaron en formato CZI a  $1131\times 1131$  píxeles, versión Zen Blue 2.5. Se preparó una solución de lectina disolviendo 200  $\mu\text{g}$  de lectina en 10 ml de tampón MES 0.1 M a un pH de 7.

## **6.7 Análisis en Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)**

La morfología del complejo Lr-QD se examinó con un microscopio electrónico de transmisión (Morgagni M 268, Philips/FEI, Países Bajos) Para el análisis de la morfología, se colocaron 7  $\mu\text{L}$  de la muestra en rejillas de cobre revestidas con formvar/carbono de 200 mallas (Ted Pella; Redding, CA EU y se incubaron durante 10 min. El secado de la muestra se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 5 min. Las muestras se contrastaron con acetato de uranilo al 2.5% (Electron Microscopy Science; Hatfield, PA Holanda y se incubaron durante 15 min. Las condiciones de

funcionamiento en todos los experimentos fueron 80 kV de alto voltaje (en alta ampliación 1,000 180,000 X, presión de trabajo:  $5 \times 10^3$  Pa ( $5 \times 10^5$  Torr)). Las micrografías se capturaron en formato TIFF con un tamaño de 1376 x 1032 píxeles y se capturaron en escala de grises. En este formato, 0 se asignó a negro y 255 a blanco en la escala de grises.

## **6.8 Determinación de potencial Z y tamaño de partícula de Lr y Lr-QD**

El potencial Z y el diámetro del complejo Lr-QD se determinaron mediante dispersión dinámica de luz en un (nanoanalizador Zetasizer ZSP, Malvern Instruments) en un ángulo de dispersión de 90° en modo lizs, se utilizó agua desionizada para estabilizar la medición de la carga eléctrica superficial del complejo Lr-QD y reducir el ruido de los iones en solución. Las mediciones se realizaron por triplicado para cada ensayo en una celda zeta capilar plegada (DTS1027, Malvern Instruments).

## **6.9 Análisis estadísticos**

Con los datos obtenidos de la lectina y Lr-QD se realizó un análisis de varianza para determinar si existían diferencias significativas entre los diferentes ensayos y el control empleando un alfa de 0.05, además de una prueba de rango post hoc Tukey para la comparación de pares de medias.

# **7. Resultados**

## **7.1 Cuantificación de proteína**

Se cuantificó la proteína liofilizada mediante el método de Bradford (1976), se llevó a cabo una curva patrón de proteína, empleando albúmina sérica de bovino (ASB) que permitió determinar la cantidad de proteína en función de la absorbancia que presenta a 595 nm (Cuadro 3). Para la muestra control tomamos una fracción concentrada de lectina (FCL) e Inhibidores de Proteasas (IP), denominada LIP-60.

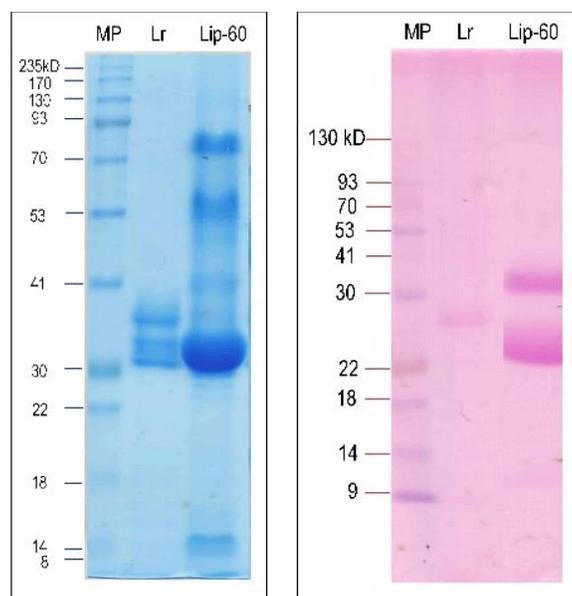
**Cuadro 3. Concentración de proteína expresada en µg/ml.**

Proteína	ug/mL
Lectina control	63.697
Lectina Recombinante a	58.106
Lectina Recombinante b	59.800

Concentración de proteína mediante una curva patrón de proteína, empleando albúmina sérica de bovino (ASB). La concentración de proteína se expresa en ug/mL. Fracción concentrada de lectina recombinante muestra a y b.

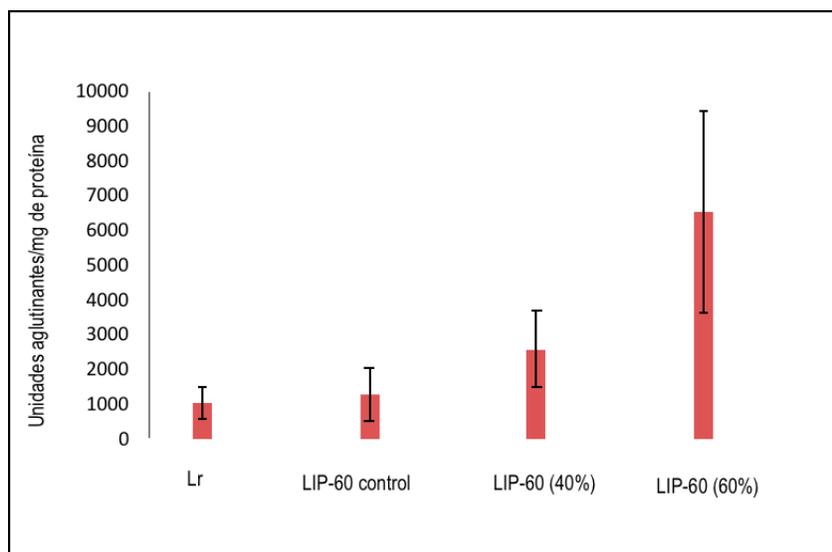
### 7.2 Caracterización de lectina recombinante

La lectina recombinante se analizó mediante SDS PAGE y los geles se tiñeron para determinar la presencia de proteína (Figura 6) la detección de carbohidratos usando tinción de ácido Peryódico de Schiff (PAS). Mediante la tinción de proteínas se determinaron tres bandas de proteína en la muestra de Lr alrededor de los 30 kDa y mediante tinción con reactivo de Tinción de ácido Peryódico de Schiff (PAS) se identificó que se trata de una glicoproteína. Esta glicoproteína, posteriormente denominada Lr, se seleccionó para acoplarse a nanopartículas Quantum Dot.



**Figura 6.** Electroforesis de Lr. SDS PAGE al 10% y tinción para glicoproteínas. Peso molecular (MP). Lectina recombinante (Lr) y fracción rica en lectinas e IP de frijol Tépari (Lip-60). En el carril uno se colocaron 3  $\mu$ L de marcador de peso molecular (MP) Blue Strain Protein Ladder (Cat No. P007), en el carril dos se colocaron 6  $\mu$ g de proteína lectina recombinante, así como en el carril tres se colocaron 6  $\mu$ g de una muestra control Lip-60.

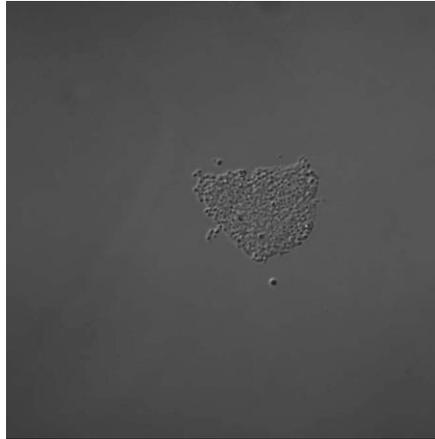
Todas las fracciones fueron sometidas a un análisis de actividad aglutinante, tras el cual analizamos actividad de aglutinación. La actividad aglutinante se muestra en la Figura 7, en donde se observa que la Lr presenta baja aglutinación. Respecto al frijol Tépari poseen una actividad biológica en aglutinación con eritrocitos A+.



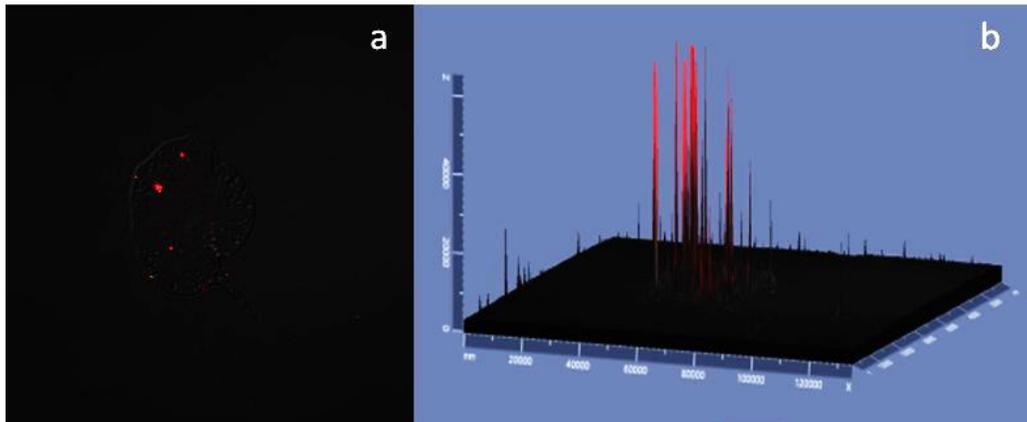
**Figura 7.** Actividad aglutinante de lectina recombinante. Lectina recombinante (Lr) fracción rica en lectinas e IP de frijol Tépari control (Lip-60 control) y, fracciones ricas en lectinas e IP de frijol Tépari al 40% (Lip-60 40%) y 60% (Lip-60; 60%).

### 7.3 Análisis por Microscopía Multifotón

El acoplamiento de la Lr-QD con microfluídica se observó mediante microscopía multifotón (Figuras 8 y 9). Se analizaron cuatro variables: luz visible, fluorescencia a 570 nm, combinado luz visible y fluorescencia 570 nm y análisis de lambda.



**Figura 8.** Lectina recombinante (Lr) sin marcaje vista en microscopía multifotón. (LSM 880 NLO, Zeiss, Alemania). No hay presencia de fluorescencia, como se muestra en las micrografías.



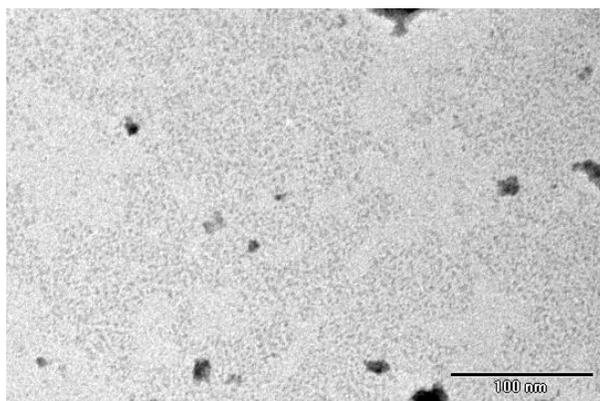
**Figura 9.** Complejo Lr-QDs vista en microscopía multifotón. a) Microscopía del complejo LecR-QDs. Se pueden observar las nanopartículas fluorescentes en color rojo. b) Análisis de fluorescencia en 3D del complejo LecR-QDs. Donde se puede observar en el gráfico un grupo de picos de 560 a 570 nm.

#### **7.4 Análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)**

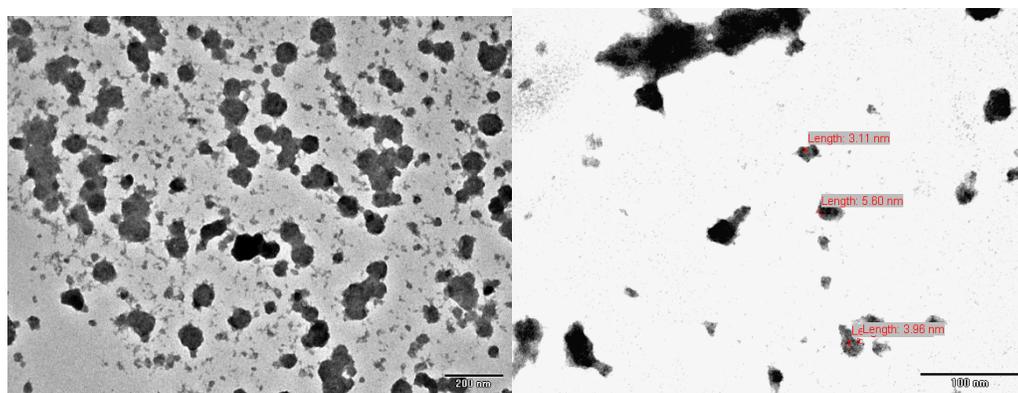
Los resultados obtenidos con la microscopía electrónica de transmisión (MET) mostraron diferencias entre las estructuras de Lr y el complejo Lr-QD. Las imágenes tomadas permiten contemplar el acomodo y la interacción con los puntos cuánticos. De este modo, observamos clústers similares a icosaedros, lo que contrasta con los resultados obtenidos con la técnica de microfluídica, destacando una elevada interacción entre ambos elementos. En la Figura 10 se muestra una imagen

representativa de la Lr sin marcaje mediante microscopía electrónica de transmisión y en la Figura 11 se observa una imagen del complejo Lr-QD.

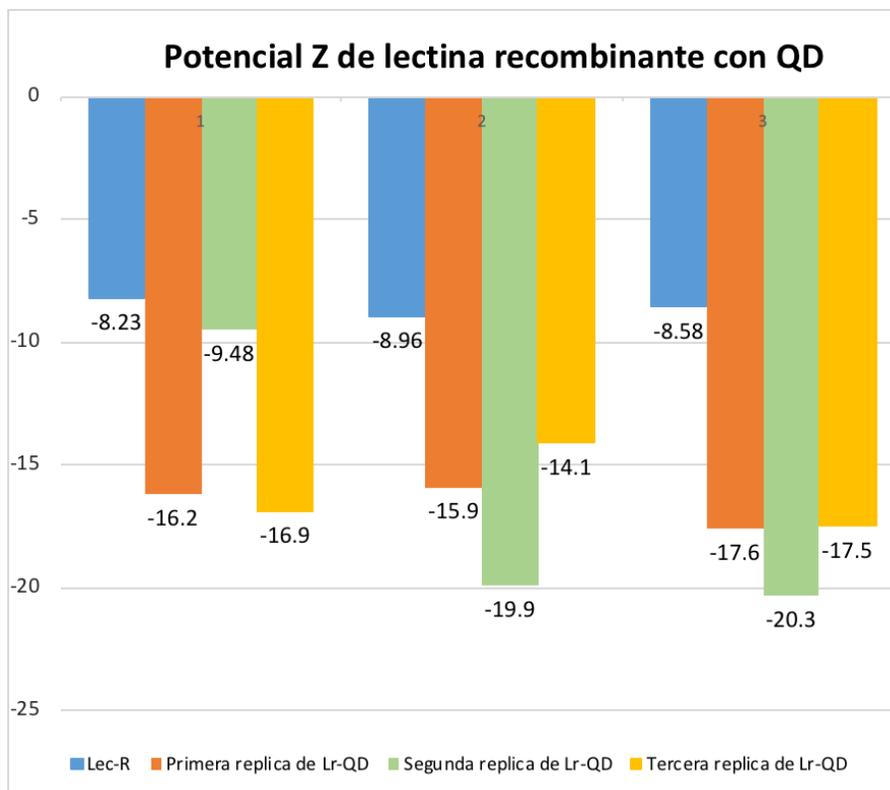
En los resultados mostrados por Cervantes y col., (2020) Los resultados obtenidos en el Zetasizer determinaron que el potencial zeta promedio de Lectina fue de -8.52mV, por otro lado en nuestro trabajo la lectina recombinante (Lr) tenemos un promedio de -8.59mV. Mientras que para el complejo Lr-QD fue de -16.43 mV (Figura 12).



**Figura 10.** Microscopía electrónica de transmisión para la Lr sin marcaje. Se puede observar una distribución homogénea de la proteína y ausencia de Quantum Dots.



**Figura 11.** Complejo Lr-QDS vista en microscopía electrónica de transmisión (MET). Lectina recombinante marcada con QD, vistas en Microscopía Electrónica de Transmisión Morgagni M 268, Philips/FEI, Países Bajos. a) Se observan partículas de aproximadamente 50 nm con base en la escala de 100 nm. b) se observan nanopartículas que rondan los 5 nm.



**Figura 12.** Potencial Z del complejo Lr-QD. Potencial Zeta en milivolts (mV) de lectina recombinante (Lr) y complejo (Lr-QD). Potencial zeta promedio de la lectina no marcada y la lectina marcada. Análisis post hoc Tukey comparaciones múltiples de medias 95%.

## 8. Discusión

A través de los años, diversos trabajos (García-Gasca y col., 2012, Ferriz-Martínez y col., 2012, Moreno-Celis y col., 2020) realizaron una íntegra y exhaustiva observación y determinación de la actividad citotóxica y su efecto antitumoral de la lectina de frijol Tépari *Phaseolus acutifolius* en cáncer de colon. Uno de los trabajos más reciente en nuestro equipo de trabajo, fue la purificación por cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico en una fracción de lectinas de Tépari, desarrollando el acoplamiento de dicha glicoproteína a Quantum Dots a través de la técnica de microfluídica, este bioconjugado permite comprender la interacción de la lectina con el tejido de interés (Cervantes-Jiménez y col., 2020).

A pesar de contar con este sistema potencial de diagnóstico, la obtención, procesamiento de semillas y extracción de lectinas abarcaban una problemática ya que otorgan desventajas relacionadas al tiempo, obtención y rendimiento de proteína. Hoy en día, se utilizan diferentes sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes (Karbalaei y Farsian, 2020). El sistema de expresión bacteriana tiene varias ventajas, como la multiplicación rápida, requisitos nutricionales simples y económicos, alta expresión y el proceso de transformación de forma rápida y fácil (Rosano y Ceccarelli, 2014). Sin embargo, en este trabajo se empleó un sistema de levadura, dado que las bacterias carecen de orgánulos para el procesamiento postraduccional. Anteriormente, el sistema más prometedor para este propósito era *Saccharomyces cerevisiae* debido al conocimiento de su manipulación genética (Demain y col., 2009; Martínez Alarcón y col., 2018). No obstante, *S. cerevisiae* tiene la desventaja de producir N-glicanos con alto contenido de manosa que son altamente antigénicas para los humanos (Cereghino y Cregg, 2000). Así, la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, que no parece añadir residuos de manosa extra ni llevar a cabo una hiperglicosilación en sus N-glicanos y por su capacidad para la formación de enlaces disulfuro, se ha utilizado como sistema de expresión de lectinas de leguminosas (Karbalaei y Farsiani., 2020).

Para la producción de lectina recombinante se empleó la cepa de la levadura *Pichia pastoris*. La producción de proteínas recombinantes en este sistema se regula a través de dos promotores principalmente, el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato-hidrogenasa (PGAP) y el promotor de la AOX (PAOX1) (Nieto T, 2020). El promotor GAP es un promotor que expresa proteínas de forma continua en todas las fuentes de carbono, incluyendo la glucosa, el glicerol, el etanol y el ácido oleico, y puede utilizarse en lugar del promotor AOX1 para producir proteínas heterólogas en la levadura *Pichia pastoris*. Las ventajas de utilizar el promotor GAP son la opción de expresión de la proteína sin metanol, sin necesidad de inducción al cambiar el cultivo de una fuente de carbono a otra (Juturu y Wu, 2018). Martínez-Alarcón y col., 2020 han empleado un sistema eficiente para la producción de una lectina recombinante con potencial anticancerígeno en un rendimiento adecuado para proceder a ensayos de citotoxicidad *in vitro* en células transformadas y para realizar ensayos *in vivo* utilizando la levadura *Pichia pastoris* para la producción de la lectina de *Phaseolus acutifolius*.

En cuanto a la actividad aglutinante, la Lr presentó una actividad de 1,300 UA/mg de proteína, comparada con la actividad de aglutinación específica de 12,300 UA/mg para Lr y las 9,300UA/mg de proteína para Lr-QD obtenida por Cervantes-Jiménez y col. (2020) y con las 5,566 UA/mg de proteína de la FCL de frijol Tépari recuperada por Ferríz Martínez y col. (2015). En esta comparación se observa baja actividad aglutinante, lo cual ya había sido observado por Martínez-Alarcón y col. (2020). No se determinó la actividad aglutinante del complejo Lr-QD, sin embargo, se han observado en el marcaje alteraciones en la actividad aglutinante, sin representar una afectación en la actividad citotóxica (Cunha y col., 2018b). La aglutinación de células es posible dada la unión de lectinas a receptores de las membranas celulares (Gautam y col., 2020). En el trabajo de Cervantes-Jiménez y col. (2015) se sugirió que la disminución de la actividad aglutinante puede ser debido a la obstrucción de los sitios de reconocimiento de la proteína con la membrana celular del eritrocito.

Algunas lectinas han sido acopladas a nanopartículas como los Quantum Dots por los métodos más usados como interacciones de adsorción (Oliveira y col., 2020), acoplamiento covalente (2018b), fuerzas termodinámicas (Ahmed y col., 2015), entre otras. En este trabajo se utilizó el método de microfluídica y se determinó que el pH apropiado donde existe una mejor eficiencia de etiquetado en el análisis de microscopía de fluorescencia es de 7, mismo pH reportado en otros trabajos como el Cramoll (Cunha y col., 2018a), y nuestra misma lectina obtenida de forma nativa (Cervantes-Jiménez y col., 2020).

La microscopía de fluorescencia es una herramienta que está creciendo rápidamente y ofrece cada vez más capacidades de obtención de imágenes para diversos campos científicos, desde la biología hasta la biomedicina (Combs y Shroff, 2017; Dunst y Tomancak, 2019; Shashkova, y Leake, 2017). Estos avances han permitido poder etiquetar moléculas con nanopartículas fluorescentes para describir procesos biológicos (Cunha y col., 2018b). En el análisis de espectrometría para la lectina recombinante se comprobó que las lectinas son moléculas que no presentan fluorescencia (Dunst y Tomancak, 2019).

Por otro lado, el análisis de Quantum Dots mostró un pico de fluorescencia de 574 nm esta emisión corresponde a las características proporcionadas por su fabricación, así como trabajos donde utilizan Quantum Dots de telurio de cadmio (TeCd) donde se obtuvo una longitud de onda de emisión de 590 nm y un núcleo recubierto por grupos carboxilo (-COOH) (Santos y col., 2020) o donde observaron una longitud de onda de emisión de 528 nm (Jigyasu y col., 2020). El análisis del complejo Lr-QD mostró una emisión espectral de 570 nm. Este dato está en medio de los resultados obtenidos por Cervantes-Jiménez y col. (2020) donde obtuvieron una emisión entre 568 nm y 586 nm para el complejo con lectinas nativas. Asimismo, se mostraron diferencias en las unidades arbitrarias de la intensidad de emisión de los QDs con el complejo Lr-QD dentro de este marco, Xu y col. (2020) explican que la unión de aminoácidos o moléculas orgánicas puede disminuir la intensidad de fluorescencia de los QD. Los resultados sugieren que el acoplamiento de la Lr con QD no produjo cambios significativos en la longitud de onda de emisión de

fluorescencia, por lo tanto, la lectina recombinante no altera las propiedades ópticas deseadas de los Quantum Dots como método de diagnóstico en la trazabilidad de las lectinas.

La microscopía electrónica de transmisión (MET) es un dispositivo ideal para estudiar la estructura interna de las células y los distintos tipos de materiales biológicos, el alto contraste del núcleo del QD en la microscopía electrónica de transmisión (MET) puede aprovecharse para visualizar directamente las disposiciones de las partículas inducidas por la unión (Guo y col., 2017). Los QDs poseen un peso atómico suficiente para ser visualizados por MET, pero se encontró que esto es un reto dependiendo del tamaño de la nanopartícula utilizada. (Killingsworth y Bobryshev, 2016).

De manera general se ha reportado que los Quantum Dots comprenden formas irregulares u ovaladas vistas en MET (Hsu y col., 2008). Los resultados obtenidos con MET mostraron diferencias entre Lr y el complejo Lr-QD. Al acoplar la lectina al QD se observaron clústers similares a eicosaedros, lo que contrasta con los resultados obtenidos con la técnica de microfluídica, donde se muestra de manera homogénea el acoplamiento de la lectina recombinante a los Quantum Dots, resultados similares a los reportados por Cervantes-Jiménez y col., 2020.

Es necesario recalcar que se encontró una disminución de la potencial zeta entre la Lr y el complejo Lr-QD, esto puede estar relacionado con la presencia de grupos carboxilo en los Quantum Dots acopladas a la lectina, lo que otorga una carga negativa disminuyendo este dato obtenido (Liu y col., 2018).

## **9. Conclusiones**

El proceso de etiquetado fue realizado a través de la técnica de microfluídica el cual permitió conservar el efecto aglutinante de la Lr con las propiedades ópticas de los Quantum Dots. Tras su observación y análisis en microscopía se puede concluir que este bioconjugado obtenido a partir de ingeniería recombinante es una opción viable con potencial para ser utilizado en el futuro como agente para visualizar el seguimiento de lectinas en condiciones normales y patológicas.

## 10. Referencias

- Ahmed, K. B. A., Ahalya, P., Sengan, M., Kamlekar, R., & Veerappan, A. (2015). Synthesis and characterization of zinc sulfide quantum dots and their interaction with snake gourd (*Trichosanthes anguina*) seed lectin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 151, 739-745. Doi: [10.1016/j.saa.2015.07.035](https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.07.035)
- Al-Hada, N. M., Kamari, H. M., Shaari, A. H., & Saion, E. (2019). Fabrication and characterization of Manganese–Zinc Ferrite nanoparticles produced utilizing heat treatment technique. *Results in Physics*, 12, 1821-1825. Doi: [10.1016/j.rinp.2019.02.019](https://doi.org/10.1016/j.rinp.2019.02.019)
- Al- Sohaily, S., Biankin, A., Leong, R., Kohonen- Corish, M., & Warusavitarne, J. (2012). Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 27(9), 1423-1431. Doi: [10.1111/j.1440-1746.2012.07200.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2012.07200.x)
- Alonso, A., Moreno, S., Valiente, A., Artigas, M., Pérez-Juana, A., & Ramos-Arroyo, M. A. (2006, April). Mecanismos genéticos en la predisposición hereditaria al cáncer colorrectal. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 29, No. 1, pp. 59-76). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud. S/Doi
- An S, Cho H, Jeon HB, Kim SW. InPZnS alloy quantum dots with tris (hexylthio)phosphine as a dual anionic precursor. *Nanoscale* 2018;10:3014-9. Doi: [/10.1039/C7NR08211H](https://doi.org/10.1039/C7NR08211H)
- Arenkov, P., Kukhtin, A., Gemmell, A., Voloshchuk, S., Chupeeva, V., & Mirzabekov, A. (2000). Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. *Analytical biochemistry*, 278(2), 123-131. Doi: [10.1006/abio.1999.4363](https://doi.org/10.1006/abio.1999.4363)

- Ashree, J., Wang, Q., & Chao, Y. (2019). Glyco-functionalised quantum dots and their progress in cancer diagnosis and treatment. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 1-13. Doi: [10.1007/s11705-019-1863-7](https://doi.org/10.1007/s11705-019-1863-7)
- Barve, A. V., Lee, S. J., Noh, S. K., & Krishna, S. (2010). Review of current progress in quantum dot infrared photodetectors. *Laser & Photonics Reviews*, 4(6), 738-750. Doi: [10.1002/lpor.200900031](https://doi.org/10.1002/lpor.200900031)
- Battaner, A. E. (2013). Compendio de enzimología. Ediciones Universidad de Salamanca. 9788490122952
- Baumgartner, P., Raemaekers, R. J., Durieux, A., Gatehouse, A., Davies, H., & Taylor, M. (2002). Large-scale production, purification, and characterisation of recombinant *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin E-form expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 26(3), 394-405. Doi: [10.1016/S1046-5928\(02\)00555-7](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00555-7)
- Bera, D., Qian, L., Tseng, T. K., & Holloway, P. H. (2010). Quantum dots and their multimodal applications: a review. *Materials*, 3(4), 2260-2345. Doi: [10.3390/ma3042260](https://doi.org/10.3390/ma3042260)
- Berg, M., & Søreide, K. (2011). Genetic and epigenetic traits as biomarkers in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*, 12(12), 9426-9439. Doi: [10.3390/ijms12129426](https://doi.org/10.3390/ijms12129426)
- Blair, M. W., Pantoja, W., & Muñoz, L. C. (2012). First use of microsatellite markers in a large collection of cultivated and wild accessions of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). *Theoretical and Applied Genetics*, 125(6), 1137-1147. Doi: [10.1007/s00122-012-1900-0](https://doi.org/10.1007/s00122-012-1900-0)
- Blanco, A. (2017). Química Biológica. Editorial Ateneo. S/Doi
- Boyd, W. C., & Shapleigh, E. (1954). Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119(3091), 419-419. S/Doi.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. Doi: [10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Bendris, N., Lemmers, B., & Blanchard, J. M. (2015). Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. *Cell cycle*, 14(12), 1786-1798. Doi: [10.1080/15384101.2014.998085](https://doi.org/10.1080/15384101.2014.998085)
- Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus spp.*)—model food legumes. *Plant and soil*, 252(1), 55-128. Doi: [10.1023/A:1024146710611](https://doi.org/10.1023/A:1024146710611).
- Brustein VP, Souza-Araujo FV, Vaz AF, Araujo RV, Paiva PM, Coelho LC, Carneiro- Leao AM, Teixeira JA, Carneiro-da Cunha MG, Correia MT. 2012. A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. *Inflammopharmacology* 20:315\_322 Doi: 10.1007/s10787-011-0113-5. Doi: [10.1007/s10787-011-0113-5](https://doi.org/10.1007/s10787-011-0113-5)
- Cabral Filho, P. E., Pereira, M. I., Fernandes, H. P., de Thomaz, A. A., Cesar, C. L., Santos, Beate. Santos & Fontes, A. (2015). Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow *cytometry*.
- Cárdella R., Hernández R., Upmann C., ... & Fernández R (2007). *Bioquímica Humana*. La habana, Cuba: Editorial ciencias médicas. S/Doi
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews*, 24(1), 45-66. Doi [10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x)
- Cerqueira Eced, A. (2009). Implicación de las quinasas dependientes de ciclinas en el ciclo celular y la respuesta frente a daño al ADN. S/Doi
- Cervantes-Jiménez, R., Sánchez-Segura, L., Estrada-Martínez, L. E., Topete-Camacho, A., Mendiola-Olaya, E., Rosas-Escareño, A. N., ... & Blanco-Labra, A. (2020). Quantum Dot Labelling of Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Lectins by Microfluidics. *Molecules*, 25(5), 1041. Doi: [10.3390/molecules25051041](https://doi.org/10.3390/molecules25051041)
- Chacón, M. (2009). Cáncer: reflexiones acerca de incidencia, prevención, tratamiento y mitos. *Cuadernos de la Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales. Universidad Nacional de Jujuy*, (37), 181-193.

- Chalfie, M. (1995). Green fluorescent protein. *Photochemistry and photobiology*, 62(4), 651-656. Doi: [10.1111/j.1751-1097.1995.tb08712.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb08712.x)
- Chao, Q.; Etzler, M.E. Incorrect targeting of plant vacuolar lectins in yeast. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 20866–20871.
- Choi, J. W., Woo, H. C., Huang, X., Jung, W. G., Kim, B. J., Jeon, S. W., ... & Lee, C. L. (2018). Organic–inorganic hybrid perovskite quantum dots with high PLQY and enhanced carrier mobility through crystallinity control by solvent engineering and solid-state ligand exchange. *Nanoscale*, 10(28), 13356-13367. Doi: [10.1039/C8NR00806J](https://doi.org/10.1039/C8NR00806J)
- Chudakov, D. M., & Lukyanov, K. A. (2003). Use of green fluorescent protein (GFP) and its homologs for in vivo protein motility studies. *Biochemistry (moscow)*, 68(9), 952-957. Doi: [10.1023](https://doi.org/10.1023)
- Chudakov, D. M., Belousov, V. V., Zarausky, A. G., Novoselov, V. V., Staroverov, D. B., Zorov, D. B., ... & Lukyanov, K. A. (2003). Kindling fluorescent proteins for precise in vivo photolabeling. *Nature biotechnology*, 21(2), 191-194. Doi: [10.1038/nbt778](https://doi.org/10.1038/nbt778)
- Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S., & Lukyanov, K. A. (2010). Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological reviews*, 90(3), 1103-1163. Doi: [10.1152/physrev.00038.2009](https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009)
- Combs, C. A., & Shroff, H. (2017). Fluorescence microscopy: a concise guide to current imaging methods. *Current protocols in neuroscience*, 79(1), 2-1. Doi: [10.1002/cpns.29](https://doi.org/10.1002/cpns.29)
- Cordenunsi, B. R., Oliveira do Nascimento, J. R., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2002). Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2581-2586. Doi: [10.1021/jf011421i](https://doi.org/10.1021/jf011421i)
- Costanzo, L. S., & Gómez, J. P. (2000). *Fisiologia*. McGraw-Hill Interamericana S/Doi
- Cunha, C. R. A., Andrade, C. G., Pereira, M. I. A., Cabral Filho, P. E., Carvalho, L. B., Coelho, L. C. B. B., Santos, B. S., Fontes, A., & Correia, M. T. S.

- (2018a). Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178, 85–91. Doi: [10.1016/j.jphotobiol.2017.10.020](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.020)
- Cunha, C. R. A., Oliveira, A. D. P. R., Firmino, T. V. C., Tenório, D. P. L. A., Pereira, G., Carvalho Jr, L. B Carvalho Jr & Fontes, A. (2018b). Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1862(3), 427-439. Doi: [10.1016/j.bbagen.2017.11.010](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.11.010)
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 27(3), 297-306. Doi: [10.1016/j.biotechadv.2009.01.008](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008)
- Diao, Z., Han, Y., Chen, Y., Zhang, R., & Li, J. (2021). The clinical utility of microsatellite instability in colorectal cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 157, 103171. Doi: [10.1016/j.critrevonc.2020.103171](https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103171)
- Dunst, S., & Tomancak, P. (2019). Imaging flies by fluorescence microscopy: principles, technologies, and applications. *Genetics*, 211(1), 15-34. Doi: [10.1534/genetics.118.300227](https://doi.org/10.1534/genetics.118.300227)
- Ebrahim, S., Reda, M., Hussien, A., & Zayed, D. (2015). CdTe quantum dots as a novel biosensor for *Serratia marcescens* and lipopolysaccharide. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 150, 212-219. Doi: [10.1016/j.saa.2015.05.042](https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.05.042).
- Ferriz-Martinez, R. A., Torres-Arteaga, I. C., Blanco-Labra, A., & Garcia-Gasca, T. (2010). The role of plant lectins in cancer treatment. *Nova Sci*, 71-90.
- Ferriz-Martínez, R., García-García, K., Torres-Arteaga, I., Rodríguez-Mendez, A. J., Guerrero-Carrillo, M. de J., Moreno-Celis, U., Ángeles-Zaragoza, M. V., Blanco-Labra, A., Gallegos-Corona, M. A., Robles-Álvarez, J. P., Mendiola-Olaya, E., Andrade-Montemayor, H. M., Garcia, O. P., & Garcia-Gasca, T. (2015). Tolerability assessment of a lectin fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats. *Toxicology Reports*, 2, 63–69. Doi: [10.1016/j.toxrep.2014.10.015](https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.10.015)

- Fodde, R., Smits, R., & Clevers, H. (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature reviews cancer*, 1(1), 55-67. Doi: [10.1038/35094067](https://doi.org/10.1038/35094067)
- Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D. A., Hoffmann, H. J., & Autrup, H. (2009). PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicology letters*, 190(2), 156-162. Doi: [10.1016/j.toxlet.2009.07.009](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.009)
- Fragoso, L. R., Baltasar, E. H., & Esparza, J. A. R. (2004). El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnología aplicada*, 21(2), 60-69. S/Doi
- Fredman, G., Kamaly, N., Spolitu, S., Milton, J., Ghorpade, D., Chiasson, R., ... & Tabas, I. (2015). Targeted nanoparticles containing the proresolving peptide Ac2-26 protect against advanced atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Science translational medicine*, 7(275), 275ra20-275ra20.
- Freise, A. C., & Wu, A. M. (2015). In vivo imaging with antibodies and engineered fragments. *Molecular immunology*, 67(2), 142-152. Doi: [10.1016/j.molimm.2015.04.001](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.04.001)
- García-Gasca, T., García-Cruz, M., Hernandez-Rivera, E., Josue López-Matínez, Castañeda-Cuevas, A. L., Yllescas-Gasca, L., Mendiola-Olaya, E., Castro-Guillén, J. L., & Blanco-Labra, A. (2012). Effects of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) protease inhibitor and Semipure lectin fractions on cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 64(8), 1269–1278. Doi: [10.1080/01635581.2012.722246](https://doi.org/10.1080/01635581.2012.722246)
- Gautam, A. K., Sharma, D., Sharma, J., & Saini, K. C. (2020). Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 142, 474-483. Doi: [10.1016/j.ijbiomac.2019.09.119](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.119)
- Goldstein, C.E. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa, N. Sharon, What should be called a lectin, *Nature* 285 (1980) 66. Sin Doi

- González Alejandre, M., Agarwal, V., Martínez Trujillo, M., González Cortes, J. C., & Dasgupta-Schubert, N. (2021). Nanomaterial-aided seed regeneration in the global warming scenario: multiwalled carbon nanotubes, gold nanoparticles and heat-aged maize seeds. *Applied Nanoscience*, 11(5), 1531-154. Doi: [10.1007/s00432-018-2769-3](https://doi.org/10.1007/s00432-018-2769-3)
- Govindan, S. V., & Goldenberg, D. M. (2010). New antibody conjugates in cancer therapy. *The Scientific World Journal*, 10, 2070-2089. Doi: [10.1100/tsw.2010.191](https://doi.org/10.1100/tsw.2010.191)
- Grigorian, A., Lee, S. U., Tian, W., Chen, I. J., Gao, G., Mendelsohn, R., ... & Demetriou, M. (2007). Control of T cell-mediated autoimmunity by metabolite flux to N-glycan biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(27), 20027-20035. Doi: [10.1074/jbc.M701890200](https://doi.org/10.1074/jbc.M701890200)
- Gudivada, A Arunkumar, and Gnanou Florence Sudha. 2020. "Materials Today: Proceedings A Systematic Review on Full Adder Designs in Quantum-Dot Cellular Automata." *Materials Today: Proceedings*, 1-6. Doi: [10.1016/j.matpr.2020.08.475](https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.08.475)
- Guo, Y., Nehlmeier, I., Poole, E., Sakonsinsiri, C., Hondow, N., Brown, A., ... Zhou, D. (2017). Dissecting Multivalent Lectin–Carbohydrate Recognition Using Polyvalent Multifunctional Glycan–Quantum Dots. *Journal of the American Chemical Society*, 139(34), 11833–11844. Doi: [10.1021/jacs.7b05104](https://doi.org/10.1021/jacs.7b05104)
- Guo, Y., Turnbull, W. B., & Zhou, D. (2018). Probing Multivalent Protein–Carbohydrate Interactions Dot-Forster Resonance by Quantum Energy Transfer. *Chemical Glycobiology: Monitoring Glycans and Their Interactions*, 71.
- Gupta, N., Bisen, P. S., & Bhagyawant, S. S. (2018). Chickpea lectin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis through cell cycle arrest. *Protein and peptide letters*, 25(5), 492-499. Doi: [10.2174/0929866525666180406142900](https://doi.org/10.2174/0929866525666180406142900)

- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2006). Medical physiology. *Gökhan N, Çavuşoğlu H (Çeviren)*, 3. S/Doi
- Haab, B. B. (2003). Methods and applications of antibody microarrays in cancer Research. *Proteomics*, 3(11), 2116-2122. Doi: [10.1002/pmic.200300595](https://doi.org/10.1002/pmic.200300595)
- Hardman K. D, Ainsworth C. F, Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution, *Biochemistry* 11 (1972) 4910–4919. Doi: [10.1021/bi00776a006](https://doi.org/10.1021/bi00776a006)
- He, D., Wang, D., Shi, X., Quan, W., Xiong, R., Yu, C. Y., & Huang, H. (2017). Simultaneous fluorescence analysis of the different carbohydrates expressed on living cell surfaces using functionalized quantum dots. *RSC advances*, 7(20), 12374-12381. Doi: [10.1039/C6RA27612A](https://doi.org/10.1039/C6RA27612A)
- Murray, R. M., Granner, D., & Rodwell V. W. (2013). Harper. Bioquímica ilustrada, 29a edición. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V. ISBN: 978-607-15-0914-7
- Harvey, R (2011). Bioquímica. Editorial Wolters kluwer. S/Doi.
- Hashim, O. H., Jayapalan, J. J., & Lee, C. S. (2017). Lectins: An effective tool for screening of potential cancer biomarkers. *PeerJ*, 2017(9), 1–30. Doi: [10.7717/peerj.3784](https://doi.org/10.7717/peerj.3784)
- Hauck, T. S., Anderson, R. E., Fischer, H. C., Newbigging, S., & Chan, W. C. (2010). In vivo quantum- dot toxicity assessment. *Small*, 6(1), 138-144. Doi: [10.1002/sml.200900626](https://doi.org/10.1002/sml.200900626)
- Ho, C. C., Chang, H., Tsai, H. T., Tsai, M. H., Yang, C. S., Ling, Y. C., & Lin, P. (2013). Quantum dot 705, a cadmium-based nanoparticle, induces persistent inflammation and granuloma formation in the mouse lung. *Nanotoxicology*, 7(1), 105-115. Doi: [10.3109/17435390.2011.635814](https://doi.org/10.3109/17435390.2011.635814)
- Hsu, C.-C., Hsu, R.-Q., Wu, Y.-H., Chi, T.-W., Chiang, C.-H., Chen, J.-F., & Chang, M.-N. (2008). Analysis of InAsN quantum dots by transmission electron microscopy and photoluminescence. *Ultramicroscopy*, 108(11), 1495–1499. Doi: [10.1016/j.ultramic.2008.04](https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2008.04)
- Ishida, H., Yamaguchi, T., Tanakaya, K., Akagi, K., Inoue, Y., Kumamoto, K., ... & Watanabe, T. (2018). Japanese Society for Cancer of the Colon and

Rectum (JSCCR) guidelines 2016 for the clinical practice of hereditary colorectal cancer (translated version). *Journal of the anus, rectum and colon*, 2(Suppl. I), S1-S51. [Doi 10.1248/bpb.35.639](https://doi.org/10.1248/bpb.35.639)

Islam, F., Gopalan, V., Lam, A. K. Y., & Kabir, S. R. (2018). Pea lectin inhibits cell growth by inducing apoptosis in SW480 and SW48 cell lines. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 1050-1057. [Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.021](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.021)

INEGI. (2022) Estadísticas a propósito del Día mundial contra el cáncer. Comunidad de prensa número 74/22.

Itzkowitz, S. H., & Yio, X. (2004). Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology*, 287(1), G7-G17. [Doi: 10.1152/ajpgi.00079.2004](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00079.2004)

Iurlaro, R., León-Annicchiarico, C. L., & Muñoz-Pinedo, C. (2014). Regulation of cancer metabolism by oncogenes and tumor suppressors. *Methods in enzymology*, 542, 59-80. [Doi: 10.1016/B978-0-12-416618-9.00003-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00003-0)

Jaffé ,W.G., (1980). Ernagglutinin. In: Toxic constituents of plant foodstuff. Ed. by I.E. Liener. New York, U.S.A., Academic Press.p.73-102

Jeong, H. H., Kim, Y. G., Jang, S. C., Yi, H., & Lee, C. S. (2012). Profiling surface glycans on live cells and tissues using quantum dot-lectin nanoconjugates. *Lab on a Chip*, 12(18), 3290–3295. [Doi:10.1039/c2lc40248c](https://doi.org/10.1039/c2lc40248c)

Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & development*, 23(5), 537-548. [Doi: 10.1101/gad.1756509](https://doi.org/10.1101/gad.1756509)

Juturu, V., & Wu, J. C. (2018). Microbial production of bacteriocins: Latest Research development and applications. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2187-2200. [Doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.10.007](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.007)

Karbalaeei-Heidari, H. R., Partovifar, M., & Memarpour-Yazdi, M. (2020). Evaluation of the bioactive potential of secondary metabolites produced by a new marine micrococcus species isolated from the Persian Gulf. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 12(1), 61. [S/Doi](https://doi.org/10.1016/j.ajmb.2020.01.001)

- Killingsworth, M. C., & Bobryshev, Y. V. (2016). *Correlative Light- and Electron Microscopy Using Quantum Dot Nanoparticles*. *Journal of Visualized Experiments*, (114). [Doi:10.3791/54307](https://doi.org/10.3791/54307)
- Kumar, K. K., Chandra, K. L. P., Sumanthi, J., Reddy, G. S., Shekar, P. C., & Reddy, B. V. R. (2012). Biological role of lectins: A review. *Journal of orofacial sciences*, 4(1), 20. [Doi: 10.4103/0975-8844.99883](https://doi.org/10.4103/0975-8844.99883)
- Kumar, C. G., & Mamidyala, S. K. (2011). Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(2), 462-466. [Doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.01.042](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.01.042)
- Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A. M., & Vazquez-Moreno, L. (2017). Legume lectins: proteins with diverse applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1242. [Doi:10.3390/ijms18061242](https://doi.org/10.3390/ijms18061242)
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685
- Lakowicz, J. R., Geddes, C. D., Gryczynski, I., Malicka, J., Gryczynski, Z., Aslan, K., ... & Huang, J. (2004). Advances in surface-enhanced fluorescence. *Journal of fluorescence*, 14(4), 425-441. [Doi: 10.1103/PhysRevB.64.085421](https://doi.org/10.1103/PhysRevB.64.085421)
- Lannoo, N., Vervecken, W., Proost, P., Rougé, P., & Van Damme, E. J. (2007). Expression of the nucleocytoplasmic tobacco lectin in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 53(2), 275-282. [Doi: 10.1016/j.pep.2007.01.007](https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.01.007)
- Lee, E. Y., & Muller, W. J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(10), a003236. [Doi: 10.1101/cshperspect.a003236](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003236)
- Nelson, D., (2018). *Lenhinger Principios de bioquímica*. Ediciones Omega S.A. ISBN: 9788428216678

- Li, N., Chow, A. M., Ganesh, H. V. S., Brown, I. R., & Kerman, K. (2013). Quantum dot based fluorometric detection of cancer TF-antigen. *Analytical Chemistry*, 85(20), 9699–9704. [Doi:10.1021/ac402082s](https://doi.org/10.1021/ac402082s)
- Lis, H., & Sharon, N. (1986). Lectins as molecules and as tools. *Annual Review of Biochemistry*, 55(1), 35-67 S/Doi.
- Liu, Z., Liu, H., Wang, L., & Su, X. (2016). A label-free fluorescence biosensor for highly sensitive detection of lectin based on carboxymethyl chitosan-quantum dots and gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 932, 88–97. [Doi: 10.1016/j.aca.2016.05.025](https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.025)
- Liu, Y., Wang, X., Pan, G., & Luo, J. (2013). A comparative study between graphene oxide and diamond nanoparticles as water-based lubricating additives. *Science China Technological Sciences*, 56(1), 152-157. [Doi: 10.1021/ja400527a](https://doi.org/10.1021/ja400527a)
- Liu, Z., Zou, H., Wang, N., Yang, T., Peng, Z., Wang, J., ... & Huang, C. (2018). Photoluminescence of carbon quantum dots: Coarsely adjusted by quantum confinement effects and finely by surface trap states. *Science China Chemistry*, 61(4), 490-496. [Doi: 10.1007/s11426-017-9172-0](https://doi.org/10.1007/s11426-017-9172-0)
- Lozano, J.A., Galindo, J.O., García Borrón, J. C., Martínez Liarte J. H. (2006) *Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud*. Edit. McGraw-Hill. ISBN: 9788448606428
- Lucius, K. (2020). Dietary Lectins: Gastrointestinal and Immune Effects. *Alternative and Complementary Therapies*, 26(4), 168-174. [Doi: 10.1089/act.2020.29286.klu](https://doi.org/10.1089/act.2020.29286.klu)
- Lusvarghi, S., & Bewley, C. A. (2016). Griffithsin: an antiviral lectin with outstanding therapeutic potential. *Viruses*, 8(10), 296. [Doi: 10.3390/v8100296](https://doi.org/10.3390/v8100296)

- Ly, W., Li, L., Xu, M., Hong, J., Tang, X., Xu, L., ... & Huang, W. (2019). Improving the stability of metal halide perovskite quantum dots by encapsulation. *Advanced Materials*, 31(28), 1900682. Doi: [10.1002/adma.201900682](https://doi.org/10.1002/adma.201900682)
- MacBeath, G., & Schreiber, S. L. (2000). Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 289(5485), 1760-1763. Doi: [10.1126/science.289.5485.1760](https://doi.org/10.1126/science.289.5485.1760)
- Machado Pineda, M., Rodríguez Fernández, Z., González Tuero, J. H., Rodríguez Ramírez, R. (2011). Relación diagnóstico y supervivencia en el cáncer de colon. *Medisan*, 15(11), 1566-1576. S/Doi.
- Magesh, R., Sivakumar, K., Karthikeyan, V., Mohanasundaram, S., Subathra, M., & Joseph, J. (2019). In vitro antifungal study of green synthesized silver nanoparticles from Acacia nilotica leaves extract against a plant and human pathogens. Doi: [10.26452/ijrps.v10i1.1901](https://doi.org/10.26452/ijrps.v10i1.1901)
- Mantilla, C., Suárez Mellado, I., Duque Jaramillo, A., & Navas, M. C. (2015). Mecanismos de señalización por  $\beta$ -catenina y su papel en la carcinogénesis. *Ces Medicina*, 29(1), 109-127. S/Doi
- Mantuano, N. R., Natoli, M., Zippelius, A., & Läubli, H. (2020). Tumor-associated carbohydrates and immunomodulatory lectins as targets for cancer immunotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer*, 8(2). Doi: [10.1136/jitc-2020-001222](https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001222)
- Martínez-Alarcón, D., Blanco-Labra, A., & García-Gasca, T. (2018). Expression of lectins in heterologous systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 616. Doi: [10.3390/ijms19020616](https://doi.org/10.3390/ijms19020616)
- Martínez-Alarcón, D., Varrot, A., Fitches, E., Gatehouse, J. A., Cao, M., Pyati, P., Blanco-Labra, A., & Garcia-Gasca, T. (2020). Recombinant lectin from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) with specific recognition for cancer-associated glycans: Production, structural characterization, and target identification. *Biomolecules*, 10(4), 1–16. Doi: [10.3390/biom10040654](https://doi.org/10.3390/biom10040654)
- Matly, A., Quinn, J. A., McMillan, D. C., Park, J. H., & Edwards, J. (2021). The relationship between  $\beta$ -catenin and patient survival in colorectal cancer systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in*

- Mito, A., Nakano, Y., Saitoh, T., Gouraud, S. S., Yamaguchi, Y., Sato, T., ... & Kojima-Aikawa, K. (2018). Lectin ZG16p inhibits proliferation of human colorectal cancer cells via its carbohydrate-binding sites. *Glycobiology*, 28(1), 21-31. Doi: [10.1093/glycob/cwx088](https://doi.org/10.1093/glycob/cwx088)
- Moreno-Celis, U., López-Martínez, F. J., Cervantes-Jiménez, R., Ferríz-Martínez, R. A., Blanco-Labra, A., & García-Gasca, T. (2020). Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) lectins induce apoptosis and cell arrest in G0/G1 by p53 (ser46) phosphorylation in colon cancer cells. *Molecules*, 25(5), 1021. Doi: [10.3390/molecules25051021](https://doi.org/10.3390/molecules25051021)
- Müller, M. F., Ibrahim, A. E., & Arends, M. J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv*, 469, 125-134. Doi: [10.1007/s00428-016-1956-3](https://doi.org/10.1007/s00428-016-1956-3)
- Müller-Taubenberger, A., & Anderson, K. I. (2007). Recent advances using green and red fluorescent protein variants. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(1), 1-12. Doi: [10.1007/s00253-007-1131-5](https://doi.org/10.1007/s00253-007-1131-5)
- Nieto Taype, M. A. (2020). *Combining bioprocess and strain engineering strategies as efficient tools for the optimization of recombinant protein production in Pichia pastoris* (Doctoral dissertation, Universitat Autònoma de Barcelona). Doi: [10803/670163](https://doi.org/10803/670163)
- Noe, O., Filipiak, L., Royfman, R., Campbell, A., Lin, L., Hamouda, D., ... & Nemunaitis, J. (2021). Adenomatous polyposis coli in cancer and therapeutic implications. *Oncology Reviews*, 15(1). Doi: [10.4081/oncol.2021.534](https://doi.org/10.4081/oncol.2021.534)
- Oliveira, C., Felix, W., Moreira, R. A., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2008). Expression of frutalin, an  $\alpha$ -D-galactose-binding jacalin-related lectin, in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 60(2), 188-193.
- Oliveira, W. F., Cabrera, M. P., Santos, N. R., Napoleão, T. H., Paiva, P. M., Neves, R. P., ... & Fontes, A. (2020). Evaluating glucose and mannose

- profiles in *Candida* species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobes. *Microbiological Research*, 230, 126330. [Doi: 10.1016/j.micres.2019.126330](https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126330)
- Olshansky, J. H., Ding, T. X., Lee, Y. V., Leone, S. R., & Alivisatos, A. P. (2015). Hole transfer from photoexcited quantum dots: the relationship between driving force and rate. *Journal of the American Chemical Society*, 137(49), 15567-15575.
- Orengo, F (2013). *Fundamentos de Biología Molecular*. Editoria Universitat Oberta de Catalunya. S/Doi
- Pai, R. K., Bettington, M., Srivastava, A., & Rosty, C. (2019). An update on the morphology and molecular pathology of serrated colorectal polyps and associated carcinomas. *Modern Pathology*, 32(10), 1390-1415. [Doi: /10.1038/s41379-019-0280-2](https://doi.org/10.1038/s41379-019-0280-2)
- Palmerín-Carreño, D., Martínez-Alarcón, D., Dena-Beltrán, J. L., Vega-Rojas, L. J., Blanco-Labra, A., Escobedo-Reyes, A., & García-Gasca, T. (2021). Optimization of a Recombinant Lectin Production in *Pichia pastoris* Using Crude Glycerol in a Fed-Batch System. *Processes*, 9(5), 876. [Doi: 10.3390/pr9050876](https://doi.org/10.3390/pr9050876)
- Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R., & Piston, D. W. (1997). Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, 73(5), 2782-2790. [Doi: 10.1016/S0006-3495\(97\)78307-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78307-3)
- Peralta-Zaragoza, O., Bahena-Román, M., Díaz-Benítez, C. E., & Madrid-Marina, V. (1997). Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud pública de México*, 39, 451-462.
- Pita-López, W., Gomez-Garay, M., Blanco-Labra, A., Aguilera-Barreyro, A., Reis-de Souza, T. C., Olvera-Ramírez, A., ... & García-Gasca, T. (2020). Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) lectin fraction provokes reversible adverse effects on rats' digestive tract. *Toxicology Research*, 9(5), 714-725. [Doi: 10.1093/toxres/tfaa062](https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa062)

- Popelka, J. C., Terryn, N., & Higgins, T. J. V. (2004). Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries?. *Plant Science*, 167(2), 195-206. Doi: [10.1016/j.plantsci.2004.03.027](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.03.027)
- Prabhu, M. P. T., & Sarkar, N. (2018). Quantum Dots as Promising Theranostic Tools Against Amyloidosis: A Review. *Protein & Peptide Letters*, 26(8), 555–563. Doi:[10.2174/0929866526666181212113855](https://doi.org/10.2174/0929866526666181212113855)
- Pradeep, T. (2009). Noble metal nanoparticles for water purification: a critical review. *Thin solid films*, 517(24), 6441-6478. Doi: [10.1016/j.tsf.2009.03.195](https://doi.org/10.1016/j.tsf.2009.03.195)
- Pusztai, A., & Bardocz, S. (1996). Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract metabolic consequences and applications. *Trends in glycoscience and Glycotechnology*, 8(41), 149-165.
- Ramírez, M. A. Q. (2007). El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *ContactoS*, 65, 5-12. S/Doi
- Ranilla, L. G., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2007). Polyphenols and antioxidant capacity of seed coat and cotyledon from Brazilian and Peruvian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(1), 90-98. Doi: [10.1021/jf062785j](https://doi.org/10.1021/jf062785j)
- Reichert, J. M., Rosensweig, C. J., Faden, L. B., & Dewitz, M. C. (2005). Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nature biotechnology*, 23(9), 1073-1078. Doi: [10.1038/nbt0905-1073](https://doi.org/10.1038/nbt0905-1073)
- Reiter, J. G., Baretta, M., Gerold, J. M., Makohon-Moore, A. P., Daud, A., Iacobuzio-Donahue, C. A., ... & Vogelstein, B. (2019). An analysis of genetic heterogeneity in untreated cancers. *Nature Reviews Cancer*, 19(11), 639-650. Doi: [10.1038/s41568-019-0185-x](https://doi.org/10.1038/s41568-019-0185-x)
- Remington, S. J. (2011). Green fluorescent protein: a perspective. *Protein Science*, 20(9), 1509-1519. Doi: [10.1002/pro.684](https://doi.org/10.1002/pro.684)
- Reynoso-Camacho, R., de Mejía, E. G., & Loarca-Piña, G. (2003). Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food and Chemical Toxicology*, 41(1), 21-27. Doi: [10.1016/S0278-6915\(02\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00215-6)

- Roa, I., Sánchez, T., Majlis, A., & Schalper, K. (2013). Mutación del gen KRAS en el cáncer de colon y recto. *Revista médica de Chile*, 141(9), 1166-1172. S/Doi.
- Roberts, J. R., Antonini, J. M., Porter, D. W., Chapman, R. S., Scabilloni, J. F., Young, S. H., ... & Mercer, R. R. (2013). Lung toxicity and biodistribution of Cd/Se-ZnS quantum dots with different surface functional groups after pulmonary exposure in rats. *Particle and fibre toxicology*, 10(1), 1-17. Doi: [10.1186/1743-8977-10-5](https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-5)
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172. Doi: [10.3389/fmicb.2014.00172](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172)
- Rubin, R., Strayer, D. S., Rubin, E., Saffitz, J. E., & Schiller, A. L. (Eds.). (2015). *Rubin Y Strayer Patología: Fundamentos Clinicopatológicos en Medicina*. Wolters Kluwer. S/Doi
- Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chemical Reviews*, 112(5), 2739-2779. Doi: [10.1021/cr2001178](https://doi.org/10.1021/cr2001178)
- Sánchez, Catherine. (2013) Knowing and understand the Cancer Cell: Physiopathology of cancer. *Rev. Med. Condes*.
- Santos, C. I., Rodríguez-Pérez, L., Gonçalves, G., Pinto, S. N., Melle-Franco, M., Marques, P. A., ... & Maçôas, E. M. (2020). Novel hybrids based on graphene quantum dots covalently linked to glycol roles for multiphoton bioimaging. *Carbon*, 166, 164-174. Doi: [10.1016/j.carbon.2020.04.012](https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.04.012)
- Savelkoul, F. H. M. G., Van der Poel, A. F. B., & Tamminga, S. (1992). The presence and inactivation of trypsin inhibitors, tannins, lectins and amylase inhibitors in legume seeds during germination. A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 42(1), 71-85. Doi: [10.1007/BF02196074](https://doi.org/10.1007/BF02196074)
- Schaedel, O., & Reiter, Y. (2006). Antibodies and their fragments as anti-cancer agents. *Current pharmaceutical Design*, 12(3), 363-378. Doi: [10.2174/138161206775201983](https://doi.org/10.2174/138161206775201983)

- Schauer, R. (2000). Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconjugate journal*, 17, 485-499. Doi: [10.1023/A:1011062223612](https://doi.org/10.1023/A:1011062223612)
- Schiffman, J. D., & Balakrishna, R. G. (2018). Quantum dots as fluorescent probes: Synthesis, surface chemistry, energy transfer mechanisms, and applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 258, 1191-1214. Doi: [10.1016/j.snb.2017.11.189](https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.189)
- Schirripa, M., & Lenz, H. J. (2016). Biomarker in CRC. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 22(3), 156. S/Doi
- Shah, S. C., & Itzkowitz, S. H. (2022). Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: Mechanisms and management. *Gastroenterology*, 162(3), 715-730. Doi: [10.1053/j.gastro.2021.10.035](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.10.035)
- Sharon, N. (1998). Lectins: from obscurity into the limelight. *Protein science*, 7(9), 2042-2048. Doi: [10.1002/pro.5560070922](https://doi.org/10.1002/pro.5560070922)
- Sharon, N., & Lis, H. (2004). History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11), 53–62. Doi: [10.1093/glycob/cwh122](https://doi.org/10.1093/glycob/cwh122)
- Shashkova, S., & Leake, M. C. (2017). Single-molecule fluorescence microscopy Review: shedding new light on old problems. *Bioscience Reports*, 37(4) Doi: [10.1042/BSR20170031](https://doi.org/10.1042/BSR20170031)
- Silva, M. L. S. (2019). Lectin biosensors in cancer glycan biomarker detection. In *Advances in clinical Chemistry* (Vol. 93, pp. 1-61). Elsevier. Doi: [10.1016/bs.acc.2019.07.001](https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.07.001)
- Singh, S. P. (2014). Integrated genetic improvement. In *Common bean improvement in the twenty-first century* (pp. 133-165). University of Idaho, College of Agriculture, Moscow.. Doi: [10.1007/978-94-015-9211-6](https://doi.org/10.1007/978-94-015-9211-6)
- Sivasankar, P., Poongodi, S., Seedeve, P., Kalaimurugan, D., Sivakumar, M., & Loganathan, S. (2019). Nanoparticles from Actinobacteria: a potential target to antimicrobial therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 25(24), 2626-2636. Doi: [10.2174/1381612825666190709221710](https://doi.org/10.2174/1381612825666190709221710)
- Stryer L., Berg J & Tymoczko (2015). Bioquímica con aplicación clínicas. Editorial Reverté, S. A. S/Doi

- Tang, Y., Han, S., Liu, H., Chen, X., Huang, L., Li, X., & Zhang, J. (2013). The role of surface chemistry in determining in vivo biodistribution and toxicity of CdSe/ZnS core-shell quantum dots. *Biomaterials*, 34(34), 8741-8755. Doi: [10.1016/j.biomaterials.2013.07.087](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.087)
- Tenório, D. P., Andrade, C. G., Cabral Filho, P. E., Sabino, C. P., Kato, I. T., Carvalho Jr, L. B., ... & Santos, B. S. (2015). CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as potential fluorescent molecular probes for saccharides detection in *Candida albicans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 142, 237-243. Doi: [10.1016/j.jphotobiol.2014.11.010](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.11.010)
- Tiwari, D. K., Jin, T., & Behari, J. (2011). Bio-distribution and toxicity assessment of intravenously injected anti-HER2 antibody conjugated CdSe/ZnS quantum dots in Wistar rats. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 463. Doi: [10.2147/IJN.S15124](https://doi.org/10.2147/IJN.S15124)
- Turner, R. H., & Liener, I. E. (1975). Effect of the selective removal of hemagglutinins on the nutritive value of soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(3), 484-487. Doi: [10.1021/jf60199a049](https://doi.org/10.1021/jf60199a049)
- Van Gijlswijk, R. P., Talman, E. G., Peekel, I., Bloem, J. et al., *Clin. Chem.* 2002, 48, 1352–1359.
- Villa, J. K., Tran, H. A., Vipani, M., Gianturco, S., Bhasin, K., Russell, B. L., ... & Young, D. D. (2017). Fluorescence modulation of green fluorescent protein using fluorinated unnatural amino acids. *Molecules*, 22(7), 1194. Doi: [10.3390/molecules22071194](https://doi.org/10.3390/molecules22071194)
- Wangefjord, S., Brändstedt, J., Lindquist, K. E., Nodin, B., Jirström, K., & Eberhard, J. (2013). Associations of beta-catenin alterations and MSI screening status with expression of key cell cycle regulating proteins and survival from colorectal cancer. *Diagnostic pathology*, 8, 1-12. Doi: [10.1186/1746-1596-8-10](https://doi.org/10.1186/1746-1596-8-10)
- Wildt, S.; Gerngross, T.U. (2005). The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 119–128.

- Xu, G., Zeng, S., Zhang, B., Swihart, M. T., Yong, K. T., & Prasad, P. N. (2016). New generation cadmium-free quantum dots for biophotonics and nanomedicine. *Chemical Reviews*, 116(19), 12234-12327. Doi: [10.1021/acs.chemrev.6b00290](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00290)
- Xu, A., Wang, G., Li, Y., Dong, H., Yang, S., He, P., & Ding, G. (2020). Carbon-based quantum dots with solid-state photoluminescent: mechanism, implementation, and application. *Small*, 16(48), 2004621. Doi: [/10.1002/sml.202004621](https://doi.org/10.1002/sml.202004621)
- Yaeger, R., Shah, M. A., Miller, V. A., Kelsen, J. R., Wang, K., Heins, Z. J., & Kelsen, D. (2016). Genomic alterations observed in colitis-associated cancers are distinct from those found in sporadic colorectal cancers and vary by type of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 151(2), 278-287. Doi: [10.1053/j.gastro.2016.04.001](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.04.001)
- Yao, J., Li, P., Li, L., & Yang, M. (2018). Biochemistry and biomedicine of quantum dots: from biodetection to bioimaging, drug discovery, diagnostics, and therapy. *Acta Biomaterialia*, 74, 36-55. Doi: [10.1016/j.actbio.2018.05.004](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.004)
- Zhang, L., Yang, X., Yin, Z., & Sun, L. (2022). A review on carbon quantum dots: Synthesis, photoluminescence mechanisms and applications. *Luminescence*, 37(10), 1612-1638. Doi: [10.1002/bio.4351](https://doi.org/10.1002/bio.4351)
- Zhong, Z. A., Michalski, M. N., Stevens, P. D., Sall, E. A., & Williams, B. O. (2021). Regulation of Wnt receptor activity: implications for therapeutic development in colon cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 296. Doi: [10.1016/j.jbc.2021.100782](https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100782)