



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Purificación y marcaje con Quantum dots de una lectina bioactiva de frijol
Tépari (*Phaseolus acutifolius*)**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta

RICARDO CERVANTES JIMÉNEZ

Co-dirigida por

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca y Dr. Alejandro Blanco Labra

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Presidente

Dr. Alejandro Blanco Labra
Secretario

Dr. Roberto Augusto Ferríz Martínez
Sinodal

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez
Sinodal

Dr. Lino Sánchez Segura
Sinodal

Dra. Juana Elizabeth Elton Puente
Directora de la Facultad de Ciencias Naturales

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

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
México
Septiembre, 2020

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 A CARGO DE LA DRA. TERESA GARCÍA GASCA; EN EL LABORATORIO DE MECANISMOS DE DEFENSA DE PLANTAS DEL CINVESTAV UNIDAD IRAPUATO, A CARGO DEL DR. ALEJANDRO BLANCO LABRA; EN EL LABORATORIO DE MICROSCOPIA DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA GENÉTICA DEL CINVESTAV UNIDAD IRAPUATO; Y EN EL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD, DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

Dirección General de Bibliotecas UQ

RESUMEN

Las lectinas son proteínas bioactivas con la capacidad de reconocer los carbohidratos de la membrana celular de manera específica. Diversas lectinas de plantas han demostrado potencial diagnóstico y terapéutico contra cáncer, y su citotoxicidad contra las células transformadas está mediada por la inducción de apoptosis. Trabajos anteriores han determinado la actividad citotóxica de una fracción de lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) (TBLF) por sus siglas en inglés y su efecto antitumoral sobre el cáncer de colon. En este trabajo, un grupo de lectinas de frijol Tépari se purificó por cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico. Se observaron dos picos de actividad aglutinante, que se analizaron por SDS-PAGE, y la lectina con el perfil más limpio fue nombrada TBL-IE2. Dado que dicha lectina mostró una única banda de proteínas en electroforesis en dos dimensiones, fue seleccionada para su acoplamiento a Quantum Dots (QD) por la técnica de microfluídica, denominando al complejo TBL-IE2-QD. El método por microfluídica permitió la formación de complejos homogéneos, cuya visualización se logró usando microscopía Multifotón y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). La fluorescencia de los QD y del complejo TBL-IE2-QD presentó una diferencia de 5 nm en la longitud de onda de emisión. El tamaño de partícula del complejo TBL-IE2-QD fue de 380 nm. El potencial zeta del complejo fue menor en relación a la lectina no marcada con un promedio de -18,51 mV, lo que implica la unión de QD a la proteína. La citotoxicidad de TBL-IE2 y TBL-IE2-QD se analizó contra la línea celular HT-29, determinando un efecto citotóxico significativamente diferente entre ambas ($p \leq 0.05$). La CL_{50} fue de 1×10^{-3} y 1.7×10^{-3} mg/mL, respectivamente. La técnica microfluídica permitió un acoplamiento homogéneo entre el QD y la lectina, mejorando sustancialmente el proceso de etiquetado en relación con otras técnicas de marcaje. Los estudios futuros se centrarán en el uso del complejo TBL-IE2-QD como un potencial método de diagnóstico para el reconocimiento de tejidos tumorales, que permitirá además dar seguimiento directo a la interacción de la lectina con el tejido blanco.

Palabras clave: Cáncer, lectinas, frijol Tépari, purificación de proteínas, Quantum Dot.

ABSTRACT

Lectins are bioactive proteins with the ability to recognize carbohydrates in the cell membrane in a specific way. Various lectins from plants have shown diagnostic and therapeutic potential against cancer, and their cytotoxicity against transformed cells is mediated by the induction of apoptosis. Previous works have determined the cytotoxic activity of a Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) lectin fraction (TBLF) and its antitumor effect on colon cancer. In this work, a group of Tepary bean lectins were purified by size exclusion and ion exchange chromatography. Two peaks of agglutinating activity were observed, which were analyzed by SDS-PAGE, and the lectin with the cleanest profile was named TBL-IE2. Since said lectin showed a single protein band in two-dimensional electrophoresis, it was selected for coupling to Quantum Dots (QD) by the microfluidic technique, naming the complex TBL-IE2-QD. The microfluidic method allowed the formation of homogeneous complexes, whose visualization was achieved using Multiphoton microscopy and Transmission Electron Microscopy (MET). The fluorescence of the QD and the TBL-IE2-QD complex showed a difference of 5 nm in the emission wavelength. The particle size of the TBL-IE2-QD complex was 380 nm. The zeta potential of the complex was lower compared to the unlabeled lectin, with an average of -18.51 mV, which implies the binding of QD to the protein. The cytotoxicity of TBL-IE2 and TBL-IE2-QD was analyzed against the HT-29 cell line, determining a significantly different cytotoxic effect between the two ($p \leq 0.05$). The LC50 was 1×10^{-3} and 1.7×10^{-3} mg / mL, respectively. The microfluidic technique allowed a homogeneous coupling between QD and lectin, substantially improving the labeling process in relation to other labeling techniques. Future studies will focus on the use of the TBL-IE2-QD complex as a potential diagnostic method for the recognition of tumor tissues, which will also allow direct monitoring of the interaction of lectin with target tissue.

Keywords: Cancer, lectins, Tepary bean, protein purification, Quantum Dot.

Agradecimientos

Agradecer es una forma de resaltar el gran apoyo que me han dado las personas que me he encontrado en este camino, si Einstein tenía razón, el tiempo es relativo, y esta relatividad no me sería suficiente para expresar lo afortunado que soy, a ti, persona o ente que se tomó el tiempo de leer este escrito se dará cuenta de la dedicación, amor, paciencia y pasión que le imprimí al presente trabajo, a ti, muchas gracias.

P.D.

Con amor para

Mis papás María Concepción Jiménez del Castillo y José León Cervantes Franco, que siempre iluminan mi camino a cada paso que doy

Mis hermanos que motivan mi vida con cada reunión o palabra que me dicen

Mis amigos y compañeros de los laboratorios y centros de investigación que me han abierto las puertas

A toda mi familia de Irapuato encabezada por mi mamá adoptiva Soledad Palomares

A mi abuela María Fortunata del Castillo del Castillo, que con cada plática me da una nueva forma de ver la vida

A mis dos maestros, amigos, psicólogos, padres y consejeros Alejandro Blanco Labra y Teresa García Gasca que sus palabras y ejemplos orientan mi camino como persona

Y a la mujer, amiga, compañera, compi, y amor Laura Elena Estrada Martínez que sin ti mis días no serían iguales

A ti, muchas gracias

Índice General

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
1. Introducción	1
2. Antecedentes.....	4
2.1 Lectinas	4
2.1.1 Lectinas de leguminosas.....	8
2.1.2 Purificación de lectinas	10
2.1.3 Lectinas de frijol Tépari	11
2.1.3.1 Citotoxicidad y potencial terapéutico de lectinas de frijol Tépari.....	13
2.2 Marcaje de proteínas	14
2.2.1 Marcaje con Quantum dots	16
2.3 Técnica microfluídica	17
3. Materiales y métodos.....	19
3.1 Obtención y procesamiento de semillas.....	19
3.2 Extracción de lectinas	19
3.3 Purificación de proteínas por cromatografía de exclusión de peso molecular G-75 e intercambio iónico.....	19
3.4 Actividad aglutinante.....	20
3.5 Perfil electroforético monodimensional, tinción con ácido periódico, Western Blot y electroforesis en 2D.....	20
3.6 Marcaje de TBL-IE2 con glutaraldehído	21
3.7 Acoplamiento Lectina-Quantum Dot por el método de microfluídica	21
3.8 Determinación del espectro de emisión de TBL-IE2-QD por microscopía multifotón..	22
3.9 Análisis morfológico de TBL-IE2-QD por microscopía electrónica de transmisión (MET)	23
3.10 Determinación de potencial Z y tamaño de partícula de TBL-IE2 y TBL-IE2-QD.....	24
3.11 Efecto citotóxico del complejo TBL-IE2 y TBL-IE2-QD sobre células HT-29	24

3.12 Análisis estadístico	25
4. Resultados.....	26
4.1 Purificación y caracterización de TBL-IE2.....	26
4.2 Marcaje y caracterización de TBL-IE2 con QD.....	31
4.3 Actividad aglutinante.....	32
4.4 Potencial Z y tamaño de partícula.....	33
4.5 Efecto citotóxico de TBL-IE2 y de TBL-IE2-QD sobre células HT-29	36
5. Discusión	37
6. Conclusiones	42
7. Referencias.....	43

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice de Figuras

Figura 1. Secuencia de la lectina de frijol Tépari obtenida a través de espectrometría de masas

Figura 2. Modelo *in-sílico* de lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*).

Figura 3. Microchip de polidimetilsiloxano

Figura 4. Esquema de técnica de acoplamiento por microfluídica de lectina con Quantum Dot.

Figura 5. Cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-75) para obtener la FCL.

Figura 6. Cromatografía de intercambio iónico (Econo Pac High Q) de la FCL.

Figura 7. Electroforesis de FCL y TBL-IE2.

Figura 8. Caracterización bioquímica de TBL-IE2.

Figura 9. SDS PAGE en 2D de la proteína TBLF-IE2.

Figura 10. Western Blot de 2D de la proteína TBL-IE2.

Figura 11. Análisis del acoplamiento de la TBLF-IE2 a QD.

Figura 12. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión para la lectina acoplada a QD.

Figura 13. Microscopia de fluorescencia para la aglutinación de la TBLF-IE2-QD.

Figura 14. Potencial Zeta en mili volts (mV) de TBL-IE2 y TBL-IE2-QD.

Figura 15. Tamaño de partícula TBL-IE2 y TBL-IE2-QD.

Figura 16. Distribución del tamaño de partícula de TBL-IE2 y TBLF-IE2-QD.

Figura 17. Efecto citotóxico del complejo TBL-IE2 y TBL-IE2-QD en células HT-29.

1. Introducción

Las lectinas son un grupo heterogéneo de proteínas de origen no inmune, omnipresentes en la naturaleza, capaces de unirse de forma específica y reversible a mono y u oligosacáridos, y dentro de este grupo, las lectinas de leguminosas son las más estudiadas (Cavada y col., 2020). Estas proteínas, que presentan diversas funciones, se caracterizan por poseer al menos un dominio no catalítico de unión reversible a carbohidratos en su estructura (Van Damme y col., 2003; Liu y col., 2013; Van Damme, 2014; Jiang y col., 2015; Manning y col., 2017), el cual les confiere funciones de gran interés para el área biomédica. Particularmente, han destacado por sus efectos contra cáncer (Dan y col., 2016; Coulibaly y Youan, 2017; Lagarda-Díaz y col., 2017) a través de interacciones con moléculas de superficie en las membranas de las células transformadas. Lo anterior posibilita dos de sus principales funciones, la detección de este tipo de células (Brooks, 2017; Hashim y col., 2017); y su actividad citotóxica, efectuada a través de la inducción a apoptosis, autofagia e inhibición del crecimiento tumoral (Liu y col., 2010; Liu y col., 2013; Pervin y col., 2015). A pesar de que los mecanismos de acción no han sido descifrados por completo, algunas vías de señalización han sido propuestas (Fu y col., 2011; Shi y col., 2013; Jiang y col., 2015; Yau y col., 2015), y los efectos de diferentes lectinas han sido reportados en repetidas ocasiones (González de Mejía y Prisecaru, 2005; Fu y col., 2011; Jiang y col., 2015; Pervin y col., 2015; Coelho y col., 2017; Estrada-Martínez y col., 2017; Poiroux y col., 2017).

En nuestro grupo de trabajo hemos purificado una fracción concentrada en lectinas (FCL) de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) que ha mostrado efecto citotóxico diferencial (García-Gasca y col., 2012), baja toxicidad sistémica y activación del sistema inmune (Ferriz-Martínez y col., 2015); y entre los efectos adversos se encuentra atrofia intestinal no disfuncional (Alatorre-Cruz y col., 2018). La FCL ha mostrado efecto inhibitorio de la carcinogénesis temprana mediante la inducción de apoptosis (Moreno-Celis y col., 2017; 2020). Asimismo, se ha caracterizado la estructura molecular de las principales lectinas presentes en la FCL (Torres-Arteaga y col., 2016).

Caracterizar la interacción de las lectinas con otras estructuras celulares resulta fundamental para comprender sus los mecanismos de acción (Cong y col., 2016), y así facilitar el diseño de fármacos basados en ellas. Sin embargo, el estudio de proteínas específicas requiere un alto grado de pureza, que permita la observación de su interacción con otras estructuras y organismos, así como de la dinámica intra e intercelular que pueden presentar diversas proteínas extracelulares.

Los Quantum dots (QD), son nanocristales semiconductores que poseen propiedades fisicoquímicas superiores a las que presentan los fluorocromos y proteínas fluorescentes convencionales (Bilan y col., 2016), como lo son su biocompatibilidad, fotoestabilidad, rango de excitación definidos, espectros de emisión estrechos y un alto rendimiento de fluorescencia (Chan y col., 2002; Mo y col., 2017; Moura y col., 2018). Estas características son deseables para el marcaje y seguimiento de proteínas *in vitro* (Pinaud y col., 2010; Fontes y col., 2012; Pierobon y Cappello, 2012; Yao y col., 2018). En los últimos años, algunas lectinas de plantas han sido marcadas con QD para su seguimiento *in vitro* (Zhelev y col., 2005; Liu y col., 2011; Zhang y col., 2013b) por medio de diferentes técnicas (Cunha y col. 2018a). Sin embargo, la eficiencia y diversidad de las técnicas de acoplamiento podría mejorarse, para obtener un marcaje más heterogéneo, que permita su posterior seguimiento, reduciendo la formación de aglomerados moleculares. Es por ello que la exploración de técnicas de marcaje más precisas, resulta de gran utilidad.

Por su parte, la microfluídica es una plataforma con aplicaciones biomédicas que involucra la manipulación de fluidos en escalas de decenas a cientos de micrómetros, con un control preciso y un alto rendimiento. Su utilización permite tanto el acoplamiento como la separación de partículas, llevada a cabo por medio de canales microfluídicos regulables. Esta técnica otorga ventajas como un bajo costo y optimización en el uso de reactivos, alta portabilidad y sensibilidad, y posibilidad de automatización (Chen y Fan, 2016; Zhang y col., 2016). A pesar de sus ventajas, esta técnica no ha sido utilizada hasta el momento para el marcaje de lectinas. Por

lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue obtener y purificar al menos una lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*), para marcarla con nanopartículas de QD por medio de microfluídica, describir la técnica y caracterizar el complejo formado.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

2. Antecedentes

2.1 Lectinas

La naturaleza presenta una gran cantidad de moléculas y estructuras, entre las cuales se encuentran las proteínas, que constituyen las macromoléculas más abundantes en las células, las más estudiadas, y quizá las de mayor importancia biológica dentro de los organismos vivos. Sus funciones involucran las actividades más básicas y esenciales de la vida, entre las que se encuentran el metabolismo, sistema inmune, hormonas, transporte de moléculas, movimiento, estructura, crecimiento, transmisión de impulsos nerviosos, memoria, comunicación, diferenciación y reconocimiento celular, entre otros (Kessel y Ben-Tal, 2010), además del desencadenamiento de diversas cascadas de señalización en las células (Davenport y col., 2020; Hanrahan y col., 2020).

Las proteínas son moléculas conformadas por secuencias precisas de aminoácidos, que incluyen una cadena polipeptídica formada por una cadena principal. Se unen de manera covalente del grupo α -carboxilo de un aminoácido al grupo α -amino de otro aminoácido, acompañado de la pérdida de una molécula de agua, obteniendo así un enlace peptídico o enlace amida (Rashid y col., 2015; Appell y col., 2018). El amino (NH_2) y el carboxilo (COOH) se encuentran unidos al carbono central ($\text{C}\alpha$), que a su vez se encuentra adherido a un hidrógeno y una cadena lateral R. Esta última cadena difiere en cada aminoácido y es la que confiere las propiedades específicas a los más de 20 aminoácidos existentes (Xiong, 2006). La forma en que se pliegan las proteínas da lugar a una estructura tridimensional en la que, incluso pequeños cambios químicos, físicos o espaciales pueden llegar a cambiar su función (Alberts y col., 2002). Entre ellos, sus enlaces con otras estructuras, como lo son los carbohidratos, también pueden modificar estructura o función (Zachara y Hart, 2004; Liu y col., 2015).

Las lectinas son un grupo diverso de proteínas, mayormente glicoproteínas, de origen no inmune, que se enlazan de manera estable, específica y reversible a car-

bohidratos sin alterar su estructura covalente, dando origen a una variedad de procesos celulares (Liu y col., 2013; Ribeiro y col., 2014, Estrada-Martínez y col., 2017; Singh y Walia, 2018). Aunado a estas características, las lectinas, por definición, deben poseer al menos un dominio no catalítico de unión reversible a mono u oligosacáridos (Peumans & Van Damme, 1995). La mayoría de las lectinas también presentan la capacidad de aglutinar eritrocitos (Ribeiro y col., 2018).

En la naturaleza, las lectinas se distribuyen de manera ubicua en todos los reinos (Peumans & Van Damme, 1995). La amplia distribución de las lectinas en la naturaleza, en términos de especies, tejidos y células, refleja la importancia de estas moléculas en los organismos vivos (Da Silva, 2018). La aparición de muchos dominios de lectina específicos de plantas y animales en protozoos, y la aparición de ellos junto con dominios de proteínas de funciones no relacionadas, apuntan a la participación de lectinas en múltiples procesos dentro de la célula (Sivaji y col., 2019). Las lectinas son particularmente abundantes en las plantas, se encuentran en diversas especies de los principales grupos taxonómicos, localizándose en tejidos vegetales como raíces, hojas, rizomas, bulbos, tubérculos, tallos, corteza, flores, frutos, savia de floema, látex y néctar, pero se almacenan principalmente en las semillas de las leguminosas (Ribeiro y col., 2014; 2018; Gautam y col., 2018).

La importancia de las lectinas reside en la selectividad de unión a carbohidratos y glicoconjugados complejos, la cual les otorga una especificidad y potencial únicos, que resultan de gran interés para las áreas biomédicas y biotecnológicas (Ghazarian y col., 2011). Estas particularidades las han convertido en objeto de investigación y diversos grupos de trabajo han reportado efectos tóxicos, antifúngicos, antibacteriales, antivirales, antiproliferativos y antitumorales (Sitohy y col., 2007; Ribeiro y col., 2014; Dan y col., 2016), y se vinculan con efectos contra procesos patológicos, incluido el cáncer (Ribeiro y col., 2014; Kabir y col., 2015). El reconocimiento selectivo y específico a estructuras de glicanos que poseen las lectinas, presenta utilidad tanto diagnóstica como terapéutica. Distintas lectinas se han utilizado para diagnosticar carcinoma hepatocelular, tumores testiculares, cáncer de ovario, mama, páncreas, y cáncer colorectal (Coulibaly y Youan, 2017).

En este sentido, es importante mencionar que la base de la capacidad de las lectinas para identificar células transformadas, radica en el tipo de carbohidratos que cubren la superficie celular, ya que, en presencia de procesos de cáncer, enzimas como glicosidasas y glicosiltransferasas suelen encontrarse tanto suprimidas como sobreexpresadas, lo que resulta en patrones de glicosilación alterados tanto en los *N*-glicanos como en los *O*-glicanos, los cuales son identificables por las lectinas (Poiroux y col., 2017). Por medio de microarreglos de lectinas se detectan las interacciones entre las lectinas y las estructuras de los glicanos y se pueden comparar muestras de distintos tejidos y estadíos, aprovechando la presencia o abundancia de ciertas glicofomas como biomarcadores para la detección y clasificación (Pearson y Gallagher, 2019).

Este grupo de proteínas interactúan no solamente con los glicanos de otras proteínas, sino que pueden reconocer y unirse a carbohidratos de moléculas como glicolípidos, proteoglicanos, polisacáridos y azúcares libres, y mediar eventos biológicos (De Schutter y Van Damme, 2015; Cavada y col., 2020). Sus uniones no covalentes involucran puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals (Singh y Walia, 2018). La especificidad de las lectinas hacia los carbohidratos está determinada por los sitios de unión en los aminoácidos conservados de la estructura tridimensional de las lectinas (Gautam y col., 2020).

Los carbohidratos que interactúan en las lectinas pueden contener propiedades hidrofílicas, estos carbohidratos pueden estar arreglados de forma muy diversa y constituyen del 1 al 80% del total del peso molecular de la proteína (He y col., 2016). Estas características confieren una compleja particularidad a las lectinas, como la capacidad de aglutinar algunos tipos celulares, mostrando un alto grado de especificidad por eritrocitos humanos y de igual forma algunos eritrocitos animales (Boyd y Shapleigh, 1954), además de su afinidad a células cancerígenas (Jaffé, 1980; García-Gasca y col., 2012; Gupta y col., 2020).

Otro atributo importante de las lectinas, es su habilidad para soportar la digestión sin ser degradadas por las condiciones de pH o enzimas digestivas (Ribeiro y col.,

2018; Martínez-Alarcón y col., 2020), la cual les permite unirse a grupos glicosilos de la membrana de las células que recubren el tracto digestivo, e inducir una serie de reacciones antinutricias (Alatorre-Cruz y col., 2018). De esta forma pueden afectar el recambio de células epiteliales, dañar las membranas laminares del epitelio, interferir con la digestión y absorción de nutrientes, estimular cambios en la microbiota, modular el sistema inmune del tracto digestivo y causar hipertrofia e hiperplasia en el intestino delgado (Zhao y col., 2019; Gautam y col., 2020). Además, algunas lectinas pueden ingresar de manera intacta a la circulación, manteniendo su actividad biológica (Vasconcelos y col., 2004; Ribeiro y col., 2014; Ferríz-Martínez y col., 2015).

Con respecto a sus mecanismos de acción en células tumorales, se sabe que las lectinas pueden inducir diferentes vías de señalización para inhibir el crecimiento y promover la muerte de células transformadas, como la inducción a apoptosis dependiente de caspasas, que es llevada a cabo a través de la unión de las lectinas a los receptores de membrana de las células. También se ha reportado que las lectinas tienen la capacidad de generar la producción de cantidades elevadas de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria, las cuales se acumulan en las células de cáncer, y a la vez, desencadenar la activación de las proteínas supresoras de cáncer p38 y p53. Otras lectinas pueden provocar autofagia (Gautam y col., 2020).

En particular, las lectinas con péptidos cortos y repetidos que forman dominios de unión a carbohidratos, no solamente son de gran interés para comprender la evolución de las proteínas, sino que también se pueden usar como herramienta para diseñar receptores, biomoléculas o fármacos (Ghazarian y col., 2011). La glicobiología sintética ahora proporciona las herramientas para diseñar la especificidad de las lectinas, así como su estructura, multivalencia y topologías, además de crear uniones más fuertes (Pearson y Gallagher, 2019).

2.1.1 Lectinas de leguminosas

En México existen aproximadamente 1,800 especies de leguminosas silvestres, distribuidas en diversas regiones, más del 33% de ellas se encuentran dentro del desierto de Sonora. Se ha descrito el aislamiento y la purificación de lectinas de semillas de plantas nativas como *Parkinsonia aculeata*, *Olneya tesota*, *Acacia constricta*, *Prosopis juliflora*, *Cercidium praecox*, *Caesalpinia caladenia* y *Phaseolus acutifolius* (Lagarda-Díaz y col., 2017). Las lectinas de estas plantas involucran a un grupo de isolectinas diferentes, en comparación con las que se encuentran las lectinas del género *Phaseolus* (López y col., 2019). Las lectinas de leguminosas constituyen la familia más abundante de lectinas en plantas, y posiblemente la más estudiada (Hamid y col., 2013, Ribeiro y col., 2018), ya que se han aislado más de 100 miembros de esta familia. En las leguminosas, las lectinas se encuentran especialmente concentradas en las semillas, ocupando del 2% al 10% del total de proteínas de la semilla (Ribeiro y col., 2014).

Las funciones de las lectinas de leguminosas en las plantas no han sido del todo descritas, refiriéndose a que uno de sus papeles principales es el de reserva en la semilla (Ribeiro y col., 2014). Las lectinas de leguminosas han mostrado una aplicación potencial como agentes antitumorales, ya que se conoce su interacción con diferentes carbohidratos presentes en la superficie de células cancerígenas (Ueno y col., 2000; Sivaji y col 2019; Gautam y col., 2020). Se ha observado que las lectinas de leguminosas pueden tener efectos sobre la proliferación celular, crecimiento, diferenciación, supervivencia y la inducción de apoptosis (Fukuda y col., 2006; Ferríz-Martínez y col., 2010; Ferríz-Martínez y col., 2015; Moreno-Celis y col., 2017; 2020; Ribeiro y col., 2018).

Diferentes especies del género *Phaseolus* presentan un alto contenido de lectinas de leguminosas con diferentes especificidades, y los efectos inductores de apoptosis han sido documentados, lo que indica que, a pesar de sus diferentes especificidades, despliegan actividades antineoplásicas y apoptóticas en común. Lectinas purificadas de *Canavalia ensiformis*, *Vicia faba*, *Astragalus mongholicus*, *Bauhinia forticata*, *Griffonia simplicifolia*, *Lotus corniculatus* (Bhutia y col., 2019), *Phaseolus*

acutifolius (García-Gasca y col., 2012), *Phaseolus vulgaris*, *Lens culinaris*, *Glycine max*, *Sophora flavescens*, *Pisum sativum* (Gautam y col., 2020) entre otras, han mostrado una fuerte actividad antiproliferativa a través de la inducción a apoptosis.

Usualmente la estructura de las lectinas de leguminosas se compone de dos a cuatro subunidades, de 25 a 30 kDa, cada una con un sitio de unión a carbohidratos, y sitios de unión a metales para cationes bivalentes (Ca^{2+} y Mn^{2+}) (Carlini y Grossi-de-Sá, 2002; Damodaran y col., 2008). La estabilidad en la unión de sus monómeros puede ser atribuida a la interacción hidrofóbica, puentes de hidrógeno y enlaces salinos (Ribeiro y col., 2014; Lagarda-Díaz y col., 2017). Las lectinas de leguminosas suelen exhibir diversas estructuras primarias homólogas, lo que indica que este tipo de proteínas han sido conservadas a través de la evolución (Sharon y Lis, 1990). La estructura primaria de las lectinas de leguminosas está conformada por una cadena polipeptídica de aproximadamente 250 aminoácidos, presentando uno o dos N-oligosacáridos (Ambrosi y col., 2005; Gautam y col., 2018). La estructura tridimensional de esta familia de lectinas, se caracteriza por la presencia de láminas β y por la falta de hélices α , además de la presencia de varios pliegues correspondientes a diferentes motivos estructurales de unión a carbohidratos (Vijayan y Chandra, 1999). En su estructura pueden presentar diversos glicanos como D- Manosa, D-galactosa, D-Glucosa, L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, Ácido salicílico, Glucosamina y Galactosamina.

Cada lectina contiene un dominio de reconocimiento a carbohidratos con una arquitectura accesible que permite el enlazamiento no covalente tanto a monosacáridos como a oligosacáridos; este dominio es el que confiere la especificidad de la lectina (Grandhi y col., 2015). Estas glicoproteínas se presentan como factores anti-nutricionales y pueden causar trastornos intestinales dada su capacidad de actuar como alérgenos tóxicos y hemaglutininas (He y col., 2015). Además, se distinguen por presentar interacciones proteína-carbohidrato (Carlini y Grossi-de-Sá, 2002; Damodaran y col., 2008), por lo que constituyen un punto crucial en el estudio de las bases moleculares de las interacciones entre esos dos macronutrientes (Lagarda-Díaz y

col., 2017). Las lectinas de leguminosas constituyen una fuente de péptidos nutracéuticos y bioactivos que pueden ser liberados tras procesos de purificación, con fines de apoyar a la salud y prevenir enfermedades (Gautam y col., 2020).

2.1.2 Purificación de lectinas

La propiedad de las lectinas de reconocimiento molecular específico hace relevante su investigación en ámbitos relacionados a su purificación, análisis estructural, aplicaciones *in vitro* e *in vivo*, así como sus usos biotecnológicos en diferentes áreas como biología molecular y celular, inmunología, farmacología, medicina, análisis clínicos y nanotecnología (Gautam y col., 2020). Sin embargo, previo al estudio de las lectinas es necesario extraerla de las plantas. Los procesos de aislamiento y purificación de las lectinas conllevan una serie de pasos que deben ser llevados a cabo en condiciones de frío, y que habitualmente inician eliminando la grasa utilizando acetona o hexano, después colocar la proteína en buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.2 para posteriormente realizar una diálisis y una o más precipitaciones con sulfato de amonio para remover las proteínas adicionales. Las fracciones que resultan positivas a hemoaglutinación, son cargadas 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 cual permite la confirmación o identificación de su peso molecular (Gautam y col., 2020).

Adicional a la cromatografía de afinidad y cromatografía de filtración en gel, que son las técnicas más utilizadas para la purificación de lectinas, se han descrito otras técnicas como la cromatografía de intercambio iónico y aniónico, HPLC, cromatografía de capa fina, separación magnética, tecnología de membranas, y fraccionamiento en dos o más fases acuosas inmiscibles, entre otras (Torres-Arteaga y col., 2016; Da Silva y col., 2018; Welch y col., 2020; Kumar y Barros 2020).

Sin embargo, las técnicas actuales de purificación presentan dificultades para la producción de lectinas en gran escala (Gautam y col., 2020) debido al elevado costo y uso de reactivos, el tiempo prolongado que se requiere para llevar a cabo todos los pasos, y aunado a esto, el bajo rendimiento que se obtiene, situación que ha

llevado a la utilización de tecnologías de ingeniería genética para la producción de lectinas recombinantes (Gautam y col., 2020; Martínez-Alarcón y col., 2020).

2.1.3 Lectinas de frijol Tépari

Algunas lectinas presentes en el género *Phaseolus* han sido ampliamente estudiadas en los últimos años puesto que se han observado efectos contra cáncer, virus e infecciones microbianas, estas características sugieren un potencial para tratamientos contra enfermedades virales o crónico degenerativas debido a su alta especificidad a carbohidratos (Da Silva y Correia, 2014).

El frijol Tépari, de nombre científico *Phaseolus acutifolius*, perteneciente a la familia Fabaceae, es una especie originaria del Norte de México y sur de los Estados Unidos. Consiste en un cultivo particularmente atractivo, debido a sus características agronómicas, como la resistencia a plagas y sequía (González de Mejía y Prisecaru, 2005), ya que crece de forma silvestre en algunas regiones áridas y semiáridas. Su origen se remonta a 5000 a.C., en el Valle de Tehuacán, Puebla, lugar en donde se encontraron las semillas más antiguas. Fue una de las cinco especies de *Phaseolus* domesticadas en América en tiempos precolombinos (Debouck, 1994; Blair y col., 2012), aunque no se conoce con precisión dónde se inició la domesticación de esta especie. Se ha reportado el descuido del cultivo de frijol Tépari debido a la pérdida del consumo tradicional en las comunidades indígenas y la escasez de demanda en los grandes mercados. Su cultivo potencial en áreas desérticas es extenso debido a su resistencia a la sequía, al calor y a su adaptabilidad a altas concentraciones salinas del suelo (González de Mejía y Prisecaru, 2005).

El frijol Tépari se utiliza principalmente como alimento para humanos y animales debido a su gran contenido proteínico, sin embargo, su bajo consumo representa una subutilización de su alto contenido nutricional (Osman y col., 2003). Sin embargo, esta semilla presenta compuestos antinutricios como fitatos, lectinas e inhibidores de proteasas (IP) que, aunque relativamente altas en el extracto crudo, desaparecen casi del todo después de la cocción, por lo que al ser consumidos no constituyen un riesgo para la salud. Respecto al frijol común, el frijol Tépari tiene

concentraciones menores de lectinas, sin embargo, éstas poseen una actividad biológica mayor tanto en aglutinación con eritrocitos A+ como en citotoxicidad contra células cancerígenas (González de Mejía y Prisecaru, 2005). Recientemente, el interés acerca de esta especie de frijol, se ha enfocado en el efecto anticancerígeno reportado en diversos trabajos.

La purificación y caracterización de lectinas del frijol Tépari ha permitido determinar diversas propiedades activas (Wang y Amin, 2014), como lo es el reconocimiento de líneas celulares de cáncer con una gran especificidad (García-Gasca y col., 2012). Se ha estandarizado la obtención de una fracción concentrada de lectinas (FCL) de frijol Tépari, mediante cromatografía de exclusión de peso molecular (García-Gasca y col., 2012; Torres-Arteaga y col., 2016). Isoformas de lectinas de frijol Tépari han sido previamente purificadas y parcialmente caracterizadas (Castillo-Villanueva y col., 2007; Valadez-Vega y col., 2011; Torres-Arteaga y col., 2016), mostrando estructuras monoméricas, diméricas, triméricas y tetraméricas, con diversas funciones (Estrada-Martínez y col., 2017). Se han descrito dos diferentes lectinas de no unión a fetuína obtenidas tras el mismo proceso de purificación, existiendo entre ellas una alta homología en sus secuencias, estructuras, puntos isoeléctricos (4.6 y 4.7) y masas moleculares aparentes (ambas de 28 kDa), pero con diferencias en su actividad biológica, una produciendo mayor aglutinación, y la otra desencadenando mayor citotoxicidad. La secuencia de una lectina de frijol Tépari (tomada de Torres-Arteaga y col., 2016), se muestra en la Figura 1 y la estructura modelada en la Figura 2.

```
SANDISFNFQRFNETNLILQGDAVSSSGQLRLTNLNDNGE  
PTLSSLGRARVPNNAGPADGLAFALVPVGSKPKGGLLGRA  
HTVAVEFDTLYNRDWDPRHIGIDVNSIKTTPWDFGQGEDA  
EVLITYDSSTKLLVASLVYPSQKTSFIVSDTVDLKSVLPEWV  
RVGFSATSGITKGNVETNDLLSWSFASKLSDGTTSEGLNL
```

Figura 1. Secuencia de la lectina de frijol Tépari obtenida a través de espectrometría de masas. En rojo se muestra el sitio de reconocimiento a carbohidratos (Torres-Arteaga y col., 2016; y datos no publicados).

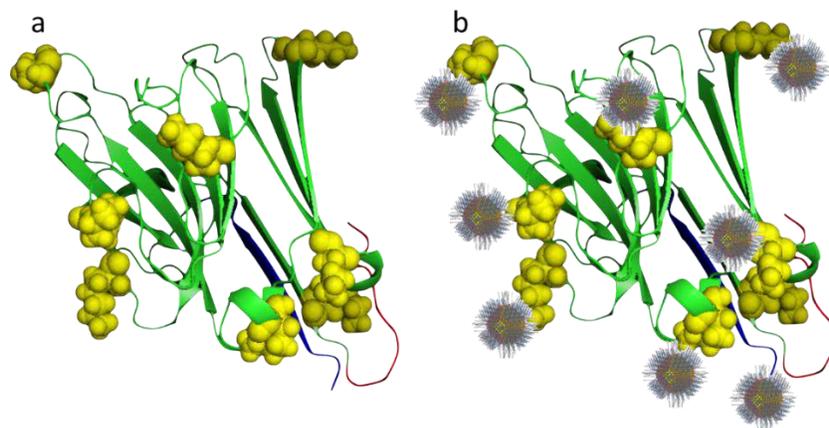


Figura 2. Modelo *in-silico* de lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*). A) En azul se observa el amino terminal, en rojo el carboxilo terminal y en amarillo las lisinas presentes en la secuencia, b) En azul se observa el amino terminal, en rojo el carboxilo terminal y en amarillo las lisinas, de igual forma se observa una representación del posible acomodo de QD acoplados a los grupos amino disponibles de la lectina (Moreno-Salgado, datos no publicados).

2.1.3.1 Citotoxicidad y potencial terapéutico de lectinas de frijol Tépari

Lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) han sido estudiadas en los últimos años, debido a su efecto citotóxico diferencial, dosis-dependiente, sobre distintas líneas celulares de cáncer *in vitro* (García-Gasca y col., 2012). Una fracción concentrada en lectinas (FCL) de este frijol, ha mostrado un efecto citotóxico diferencial sobre líneas celulares de cáncer de mama, cervix y colon, con mayor efecto en esta última (García-Gasca y col., 2012). Se ha identificado que el mecanismo de acción está relacionado con la inducción de apoptosis mediada por caspasas con aumento en p53; además de que induce arresto al ciclo celular en G0/G1 (Moreno-Celis y col., 2020).

Por otro lado, experimentos *in vivo* reportaron que la FCL de frijol Tépari presenta baja toxicidad tras su administración oral a ratas Sprague Dawley, a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal, aplicada 3 veces por semana durante 6 semanas (López-Sánchez y col., 2010). Tras su administración, se ha observado la activación del sistema inmune, evidenciado por el aumento en el porcentaje de granulocitos (Ferriz-Martinez y col., 2015); atrofia en las vellosidades del intestino delgado e

hipertrofia pancreática (Alatorre-Cruz y col., 2018). Sin embargo, dichos efectos desaparecen cuando cesa la administración de esta lectina. Aunado a ello, se reportó que la administración intragástrica de lectinas a ratas con cáncer de colon inducido químicamente, disminuyó la presencia de lesiones premalignas de bajo grado (Moreno-Celis y col., 2017).

La evidencia mencionada apunta a que las lectinas de frijol Tépari presentan potencial terapéutico contra células de cáncer. Para desarrollar un fármaco es necesario conocer más a fondo el tipo de interacción con las células de cáncer, por lo que el marcaje y seguimiento de su dinámica resultaría de gran utilidad.

2.2 Marcaje de proteínas

La conjugación de proteínas con fluoróforos es comúnmente utilizada para estudiar su localización celular y las interacciones proteína-proteína (Zhang y col., 2018). Más allá de los avances en óptica y detectores, las imágenes biológicas se han beneficiado en gran medida del desarrollo de herramientas moleculares para etiquetar fluorescentemente las biomoléculas (Li y col., 2017a, 2017b).

El marcaje de macromoléculas proporciona información valiosa sobre los procesos y los posibles cambios que ocurren en las células después de tratamientos experimentales (Moghaddam-Taaheri y Karlsson, 2018). El marcaje de proteínas es de particular interés, ya que posibilita observar su localización intracelular, interacciones, dinámica y vías de señalización de las proteínas en las células vivas, lo cual es esencial para descifrar los procesos biológicos (Bozhanova y col., 2017; Li y col., 2017a).

En los casos en los que se pretende marcar lectinas con nanopartículas QD, la técnica de bioconjugación a elegir toma un papel importante, puesto que es necesario preservar las propiedades biológicas de ambas moléculas: la fluorescencia de los QD y la actividad biológica de las lectinas. Por lo tanto, se necesitaría que cuando los QD se encuentren acoplados a la lectina, ésta siga manteniendo al menos un

sitio de unión a carbohidratos disponible para tener que lograr su aplicación biológica.

Básicamente, se emplean tres tipos diferentes de etiquetas para el marcaje de proteínas: isótopos estables, etiquetas masivas y fluoróforos. Mientras que las proteínas marcadas con isótopos estables y etiquetas de masa se miden y diferencian por espectrometría de masas, las etiquetas fluorescentes se detectan con imágenes de fluorescencia (Obermaier y col., 2015). El enfoque más aplicado en biología celular es el uso de proteínas autofluorescentes (AFP) para iluminar proteínas, organelos, estructuras celulares y células (Li y col., 2017b). Además de ellas, existen técnicas para marcar las proteínas de interés incluso dentro de células vivas por medio de tinción no-covalente basada en anticuerpos, o por medio de la bioconjugación a un compuesto con propiedades fluorescentes, a través de enlaces covalentes estables (Moghaddam-Taaheri y Karlsson, 2018).

En microscopía se ha utilizado el marcaje de moléculas para lograr su fluorescencia y evidenciar la proteína marcada y, de esta manera, obtener información sobre su interacción con los grupos expuestos de la superficie celular. Sin embargo, las desventajas que han presentado la mayoría de las técnicas de marcaje mencionadas, son la citotoxicidad, dilución, fotoblanqueo de las muestras y baja emisión de señal (Progatsky y col., 2013), lo que ha llevado a la búsqueda de nuevas formas de marcaje. Una alternativa reciente ha sido el uso de nanotecnología y compuestos.

Las lectinas se han conjugado con fracciones fluorescentes para su aplicación en estudios biológicos, para aumentar la sensibilidad y proporcionar especificidad bioquímica a los ensayos *in vivo* o *in vitro*, atributos que lo las convierten en herramientas útiles para proporcionar una comprensión complementaria de los mecanismos involucrados en el cáncer. Entre estas fracciones se encuentran nanoestructuras como dendrímeros, fullerenos, nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas, liposomas, polímeros y puntos cuánticos o Quantum dots (QD) (Cunha y col., 2018; Carvalho y col., 2019). Las gliconanopartículas resultantes se han utilizado para la

detección de proteínas, la obtención de imágenes celulares, la separación celular y la movilización de enzimas (Cunha y col., 2018).

2.2.1 Marcaje con Quantum dots

Los Quantum dots (QD) son nanocristales semiconductores fluorescentes, con un diámetro de 2 a 10 nanómetros, que poseen características físicas, químicas y ópticas deseables en el marcaje de moléculas. Esta tecnología ha surgido en los últimos años como un método innovador de marcaje en la microscopía (Chan y col., 2002; Gao y col., 2008). Entre las ventajas que ofrecen estas nanopartículas, se encuentra una superficie activa para conjugaciones, la capacidad de excitación en una sola longitud de onda, la emisión estrecha dependiente del tamaño, la alta luminiscencia y baja fotosensibilidad a la irradiación de luz UV (Cunha y col., 2018; Carvalho y col., 2019; Babu y col., 2007). Además, su tamaño pequeño evita distorsiones conformacionales que pueden producirse al agregar moléculas grandes, como proteínas.

Los QD han sido utilizados para marcar lectinas de plantas con el fin de rastrear su dinámica dentro de las células *in vivo*, obteniendo resultados prometedores (Gao y col., 2008; Liu y col., 2011; Zhang y col., 2013a; Amano y col., 2014). Usualmente, la estrategia para la síntesis de QD consiste en la mezcla rápida de soluciones precursoras (fuentes de calcogenuro, cationes metálicos y agentes estabilizantes), seguido de su agitación a una temperatura controlada (superior a los 20 °C para medios no polares y alrededor de 80°C para procedimientos hidrofílicos) en una atmósfera inerte (Cunha y col., 2018).

Se han reportado aplicaciones de la conjugación de complejos lectina-QD como biosensores, sistemas teranósticos, sondas multimodales, sondas fluorescentes para el estudio de microorganismos, células y otros, así como herramienta para estudiar la glicobiología del cáncer. Las principales técnicas reportadas para el acoplamiento de biomoléculas a QD son (Cunha y col., 2018):

- a. Adsorción, la cual se basa en las interacciones no covalentes entre los QD y las moléculas, como las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Tenorio y col., 2015; Zhang 2011).
- b. Enlace covalente, cuando los grupos funcionales de la superficie de los QD se unen de manera covalente a las biomoléculas, formando compuestos orgánicos como amidas, iminas o enlaces disulfuro (Saran y col., 2011; Cabral y col., 2015).
- c. Intercambio de estabilizador, una molécula que contiene un grupo tiol (-SH) es adicionada a los QD y se produce un intercambio del estabilizador (Robinson y col., 2005; Higuchi y col., 2008).
- d. Modificación de la superficie de los QD con moléculas de polietilenglicol (Jeong y col., 2012).

Sin embargo, no se menciona ni se encontró hasta la fecha ningún trabajo en el que se reporte el marcaje de lectinas con QD por medio de microfluídica.

2.3 Técnica microfluídica

La microfluídica se ocupa del comportamiento, el control preciso y la manipulación de fluidos y partículas en la escala de decenas a cientos de micrómetros (Whitesides 2006; Zhang y col., 2015; Shang y col., 2017; Bhalla y col., 2018; Chen y col., 2020). Es una plataforma con aplicaciones biomédicas y químicas que permite conjugar, separar y fraccionar biopartículas, por medio de canales de tamaño micrométrico, que presenta múltiples ventajas con respecto a plataformas a gran escala como centrifugación y citometría de flujo. Entre las principales se encuentran la utilización de volúmenes reducidos de muestras, procesamiento rápido, alta sensibilidad, bajo costo, probabilidad y el potencial de automatización, que disminuye la posibilidad de error humano (Zhang y col., 2016).

El campo de la microfluídica ha experimentado un fuerte crecimiento en la última década, sobre todo en lo correspondiente a las disciplinas científicas y de ingeniería, ya que se han encontrado usos entre los que se incluyen el diagnóstico, tecnologías de detección basadas en células, investigación unicelular, química analítica, electrónica, biosensores y micro y nanofabricación de partículas (Hou y col., 2017). La

posibilidad de diseño de los canales microfluídicos de los microchips, permite que las moléculas sean inyectadas en diferentes concentraciones (Liao y col., 2019) y el flujo sea regulado, por lo que la utilización de este tipo de plataforma resulta de gran utilidad en el acoplamiento lectina-QD. En la Figura 3, se muestra un chip de polidimetilsiloxano (PDMS) con sus canales microfluídicos que llevan a un colector.

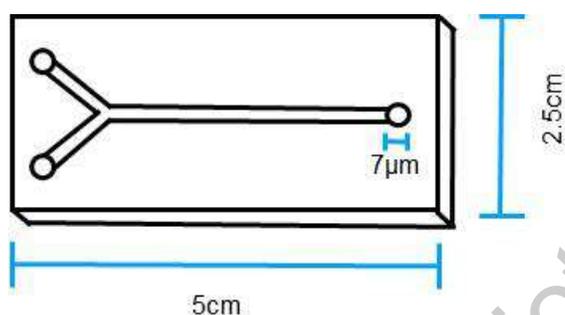


Figura 3. Microchip de polidimetilsiloxano. Distancia longitudinal 5 cm, ancho 2.5 cm. Se pueden observar de lado izquierdo las entradas de flujo por medio de los canales internos, en la parte derecha se muestra la salida de los flujos combinados, tamaño de poro 7 micras.

En la naturaleza, existen proteínas que interactúan con carbohidratos de manera no covalente, entre las que se encuentran las enzimas, los anticuerpos y las lectinas (Lis y Sharon, 1998). Estas últimas han adquirido una gran importancia en el ámbito de la biomedicina en las últimas décadas, especialmente en la investigación relacionada al cáncer, puesto que su capacidad de reconocimiento y unión a carbohidratos, resulta una herramienta valiosa para la detección de células malignas, además del potencial efecto antitumoral que han demostrado (Bhutia y col., 2019).

3. Materiales y métodos

3.1 Obtención y procesamiento de semillas

Las semillas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) fueron obtenidas en la comunidad de Arizpe en Hermosillo, Sonora, México (30°19' 51.96" N, 110° 10' 04.36" O). Una muestra fue depositada e identificada en el Herbario Dr. Jerzy Rzedowski de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, registro número QMEX00007888.

3.2 Extracción de lectinas

La obtención de lectinas fue realizada con base en la metodología descrita por García-Gasca y col. (2012). La fracción concentrada de la lectina (FCL) se obtuvo por purificación parcial mediante precipitación selectiva con sulfato de amonio y cromatografía de exclusión de peso molecular (Torres-Arteaga y col., 2016). Brevemente, la harina se obtuvo mediante la molienda de las semillas crudas de frijol Tépari, se realizó un triple proceso de desgrasado con una mezcla de cloroformo-metanol 2:1 en una proporción 4:1 p/v, y el extracto crudo se obtuvo mezclando 100 g de harina en 500 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8 a 4 °C durante 12 h. Se realizó una precipitación secuencial con sulfato de amonio iniciando con 40% de saturación, se recuperó el sobrenadante y se llevó a 70% de saturación para precipitar la lectina, posterior a esto fue dializada, sometida a liofilización y almacenada a -20°C para su posterior utilización.

3.3 Purificación de proteínas por cromatografía de exclusión de peso molecular G-75 e intercambio iónico

Las lectinas fueron purificadas en una columna de filtración en gel con Sephadex G-75 (Pharmacia Biotech; Uppsala, Suecia), la cual se calibró con buffer de bicarbonato de amonio 0.01 M (pH 7.8), a una temperatura de 4 °C. Se colectaron fracciones de 90 gotas a una velocidad de 1 gota por cada 10 segundos. La absorbancia de cada una de las fracciones fue determinada a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-65. Todas las fracciones fueron sometidas a un análisis de actividad aglutinante, tras el cual se colectaron las fracciones que presentaron aglutinación.

Posteriormente, *el pool* obtenido fue sometido a cromatografía de intercambio iónico, utilizando un cartucho Econo Pack High Q, en un equipo ECONO BioRad, a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se colectaron 120 fracciones, a las cuales se les determinaron las unidades aglutinantes de forma independiente. De igual manera, se separaron dos fracciones que contenían proteína con actividad aglutinante (TBL-IE1 y TBL-IE2).

3.4 Actividad aglutinante

La cuantificación de proteína y determinación de la actividad aglutinante se realizó mediante el método descrito por Bradford (1976), Jaffé (1980) y Adamová y col. (2014), utilizando como control positivo la fracción concentrada de lectina (FCL) de frijol Tépari, cuya actividad aglutinante contra eritrocitos humanos A+ es aproximadamente 5,565 UA/mg proteína, de acuerdo con datos reportados por García-Gasca y col. (2012).

3.5 Perfil electroforético monodimensional, tinción con ácido periódico, Western Blot y electroforesis en 2D

Las lectinas purificadas fueron separadas por medio de la técnica SDS-PAGE, empleando el método de Laemmli (1970), con geles al 10%, teñidos con Azul de Coomassie. Además, se realizó la detección de polisacáridos a través de la tinción con ácido periódico reactivo de (Schiff) a través del método descrito por Walker (1994). Otro gel fue transferido a membrana de nitrocelulosa, la membrana fue bloqueada con solución salina tamponada con Tris-TBS. Se utilizó un anticuerpo primario anti conejo diseñado previamente en el laboratorio, en el cual se incubó durante 2 h, seguido de tres lavados con TBST, posteriormente se incubó en un anticuerpo secundario AffiniPure Goat no Anti-Rabbit IgG (Santa Cruz, CA), durante 1 h. Después del lavado final, las proteínas inmuno-reactivas se visualizaron con el kit ECL Western Blotting Analysis System Amersham™.

Para la electroforesis bidimensional, se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% y tiras de pH 4-7. La electroforesis isoelectrica (IEF) se realizó siguiendo el protocolo

de Amersham Biosciences. Brevemente, la muestra de proteína se diluyó con solución de rehidratación (urea 8.0 M, CHAPS al 2%, DTT al 0.8%, tampón IPG al 0.5%, pH 4-7 y azul de bromofenol al 0.002%), se colocó en un soporte para tiras y se cubrió con DryStrip durante 15 h a temperatura ambiente. El IEF se realizó con un procedimiento de gradiente: 250 V, 1 h; 500 V, 0.5 h; 1000 V, 0.5 h; 8000 V, 3 h y 25,000 V h. Las tiras se equilibraron luego en un buffer A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, urea 6 M, glicerol al 30%, SDS al 2% y DTT 65 mM) y se reequilibraron a través de un buffer B que contenía yodoacetamida 130 mM en lugar de DTT. Después de cargar los geles de poliacrilamida al 10% para la separación de la segunda dimensión (Sistema de Electroforesis Hoeffer, Amersham), la SDS-PAGE se tiñó con nitrato de plata.

3.6 Marcaje de TBL-IE2 con glutaraldehído

El marcaje de TBL-IE2 con glutaraldehído se realizó colocando en un vaso de precipitado 20 µg de proteína con 10 mL de agua destilada, la mezcla se mantuvo en agitación con un agitador magnético a 60 rpm en ausencia de luz. Se colocaron 0.10 mg/mL de QD, posteriormente, por goteo, se agregaron 50µL de glutaraldehído al 2%, la mezcla se mantuvo en agitación por 10 minutos para después llevar la mezcla a diálisis contra agua para su observación en microscopía.

3.7 Acoplamiento Lectina-Quantum Dot por el método de microfluídica

El marcaje se realizó con un microchip de polidimetilsiloxano con diámetro de poro de 7 µm proporcionado por el laboratorio de la Dra. Natalia Hassan en la Universidad Metropolitana de Chile. Como se muestra en la Figura 4, se realizó un primer lavado del microchip con una combinación de H₂O₂: HCl: H₂O, 1:1:5 mL a una velocidad de flujo de 1.2 mL/h, seguido por un segundo lavado con 1mL de agua milliQ a una velocidad de flujo de 6 mL/h, tras el cual se utilizó aire para retirar el exceso de agua. Posteriormente, se colocaron 300 µL de Neat Trimethyl octadecyl silanol, y se realizó un lavado secuencial con 2 mL de DMSO, 2 mL agua milliQ y 2 mL de

acetona, se aplicó aire a presión para dejar el chip seco, posterior a esto se colocaron mangueras nuevas de 15 cm en los orificios del chip y se continuó con el acoplamiento lectina-QD.

Se colocaron 20 μg de lectina diluidos en 10 mL de buffer MES pH7 en una jeringa Terumo de 10 mL, a una velocidad de flujo de 1.8 mL/h, con una bomba de infusión Kds Scientific modelo 100. Por otro lado, los QD diluidos en PBS 1X pH 7 a una concentración de 0.0095 mg/mL, fueron colocados en una jeringa de 10 mL marca Terumo, a una velocidad de flujo de 2.4 mL/h. El conjugado se dializó a través de una membrana de 3.5 kDa para eliminar los QD no acoplados, posteriormente se realizaron las pruebas correspondientes de caracterización.

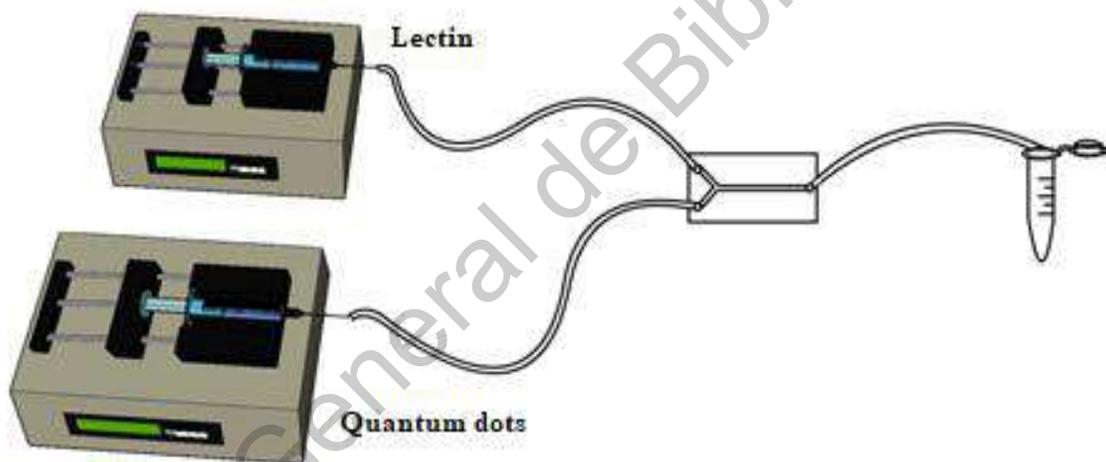


Figura 4. Esquema de técnica de acoplamiento por microfluídica de lectina con Quantum dots.

3.8 Determinación del espectro de emisión de TBL-IE2-QD por microscopía multifotón

Los QD se disolvieron en un buffer de fosfato a 0.16 M, pH 7.4 y se mantuvieron a 4 °C. Posteriormente, se conjugaron con la lectina por método de microfluídica. Los QD, la proteína TBL-IE2 y TBLiE2-QD fueron tratados de la misma forma, las muestras se colocaron en portaobjetos de vidrio y se cubrieron con cubreobjetos Zeiss

de alto rendimiento ($D = 0.17 \text{ mm} \pm 0.005 \text{ mm}$, índice de refracción = 1.5255 ± 0.0015 , número de Abbe = 56 ± 2) y se observaron en microscopio multifotón LSM 880-NLO, Zeiss, Alemania).

La detección del espectro de emisión de los QD se realizó utilizando el sistema de microscopía multifotón mencionado, equipado con láser Ti: Sapphire (Chameleon vision II, Coherent, Escocia) capaz de sintonizar los rangos de 690 a 1060 nm. Las condiciones utilizadas fueron; Chameleon láser operado a 1.0% de potencia y orificio abierto (pinhole), esta tecnología permite un mejor análisis de la muestra. Las áreas completas para las observaciones se llevaron a cabo en el objetivo de inmersión 60X/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 (450–550 nm) y región roja (560–730 nm). La exploración del "modo lambda" para la detección de la emisión espectral del complejo TBL-IE2-QD se realizó por excitación en dos longitudes de onda, a 780 nm y 850 nm. Todas las micrografías fueron capturadas en formato CZI a 1131 x 1131 píxeles y RGB.

3.9 Análisis morfológico de TBL-IE2-QD por microscopía electrónica de transmisión (MET)

La morfología del complejo TBL-IE2-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 μL 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 (EHT), en alta ampliación 1,000 - 180,000 X, presión de trabajo: $5 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ ($5 \times 10^{-5} \text{ Torr}$). 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.

3.10 Determinación de potencial Z y tamaño de partícula de TBL-IE2 y TBL-IE2-QD

El potencial Z y el diámetro del complejo TBL-IE2-QD se determinaron mediante dispersión dinámica de luz en un nanoanalizador Zetasizer Nano 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 TBL-IE2-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). Con los datos obtenidos de la lectina y TBL-IE2-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.

Para determinar el tamaño de partícula se usó el equipo nanoanalizador Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments) y una celda de polipropileno de 2 mL, como buffer se utilizó agua desionizada. Se realizó la medición por triplicado para cada ensayo la lectina y el complejo TBL-IE2-QD, para determinar si existían diferencias estadísticas. Se realizó un análisis de varianza entre los ensayos y el control empleando un alfa de 0.05. Se realizaron pruebas de rango post hoc de Tukey para la comparación de pares de medias.

3.11 Efecto citotóxico del complejo TBL-IE2 y TBL-IE2-QD sobre células HT-29

La línea celular HT-29, de adenocarcinoma rectal humano, fue obtenida de ATTC®. Se sembraron 1×10^4 células por pozo en microplacas de 24 pozos (Corning®) (Sacramento, CA, E. U.), se colocaron 0.5 mL de medio basal de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (Biowest, Nuaille, Francia). Después de 48 h, el medio se sustituyó con 1 mL de DMEM con 2% de FBS para la sincronización del ciclo celular. Después de 24 h se realizaron dos replicas por separado de los siguientes tratamientos: 0.005, 0.001, 0.05, 0.01 y 0.1 mg/mL de TBL-IE2 y por otra parte de TBL-IE2-QD, ambos por triplicado. Las proteínas fueron disueltas en 1 mL de medio DMEM con albúmina sérica bovina al 2% (ASB). Los pozos control se llenaron con 1 mL de DMEM y ASB al 2%. Las

células se tripsinizaron y se colectaron después de 8 h de tratamiento, posteriormente se colocaron en una cámara Neubauer para su contabilización, y se determinó el porcentaje de células vivas. Todos los conteos se realizaron por cuadruplicado, en ensayos independientes.

3.12 Análisis estadístico

Para determinar si los efectos citotóxicos de la lectina TBL-IE2 y el complejo TBL-IE2-QD fueron significativamente diferentes, se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) utilizando la concentración como covariable. El análisis de los datos se realizó con el software R (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria), versión 3.5.3.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

4. Resultados

4.1 Purificación y caracterización de TBL-IE2

Las proteínas obtenidas de frijol Tépari precipitadas con sulfato de amonio se cromatografiaron en Sephadex G-75 (Figura 5). Para determinar la actividad biológica de cada fracción, se analizó la aglutinación de los eritrocitos humanos tipo A RH positivos. Se obtuvieron fracciones ricas en lectinas de frijol Tépari, se agruparon y se sometieron a cromatografía de intercambio aniónico (Figura 6), eluyendo con NaCl 1.0 M, lo que produjo dos picos principales, ambos exhibiendo actividad aglutinante. Estas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y los geles se tiñeron para determinar la presencia de proteína (Figura 2a), la detección de carbohidratos se realizó por tinción con ácido periódico (Schiff) (Figura 2b), y también mediante un anticuerpo específico para lectina (Figura 2c). Solo el pico 2 mostró una única proteína y una única banda de carbohidratos cuando se sometió a una electroforesis en 2D, exhibiendo un peso molecular de 30 kDa, con un punto isoeléctrico de 4.5 (Figura 2d). Esta glicoproteína, que se nombró TBL-IE2 por sus siglas en inglés (Tepary Bean Lectin Fraction Ionic Exchange peak 2) fue seleccionada para acoplarse a nanopartículas Quantum Dot.

Se realizó una SDS-PAGE de la FCL al salir de la cromatografía de exclusión de peso molecular y de las fracciones al salir de la cromatografía de intercambio iónico (Figura 7). Se determinó la presencia de glicoproteínas mediante la tinción de PASS. Se identificó la presencia de lectinas de frijol Tépari por Western blot y se corrió una electroforesis en 2D para purificarla (Figura 8). Posteriormente se corrió una SDS-PAGE en 2D en un rango más estrecho de pH para mejorar la purificación (Figura 9) y se realizó un Western blot para identificar a la lectina (Figura 10).

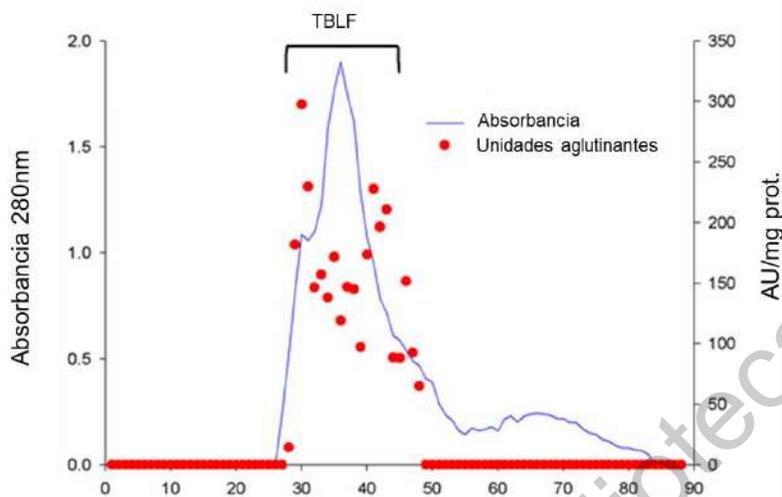


Figura 5. Cromatograma de filtración en gel (Sephadex G-75) para obtener la FCL. En el eje de las X, se observan las fracciones proteicas obtenidas tras la cromatografía; en el eje de las Y, lado izquierdo, se representa la absorbancia de las fracciones a 280 nm; y en el eje de las Y, lado derecho, las unidades aglutinantes por mg de proteína. Los puntos rojos indican las unidades aglutinantes sobre mg de proteína de las fracciones, la línea azul indica la absorbancia a 280 nm. El corchete indica las fracciones de proteína colectadas, que conforman la FCL (fracción concentrada en lectinas).

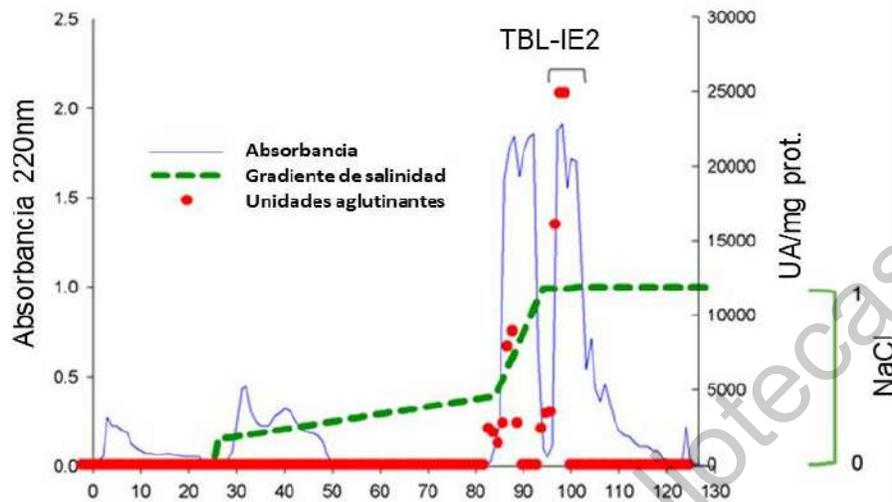


Figura 6. Cromatograma de intercambio iónico (Econo Pac High Q) de la FCL. En el eje de las X, se muestran las fracciones proteicas obtenidas tras la cromatografía; en el eje de las Y, del lado izquierdo, se representa la absorbancia de las fracciones a 220 nm; en el eje de las Y, lado derecho, se muestran las unidades aglutinantes por mg de proteína, y el gradiente de Cloruro de sodio. Los puntos rojos señalan las unidades aglutinantes sobre mg de proteína de las fracciones, la línea azul indica su absorbancia a 220 nm, y la línea punteada verde muestra el gradiente de salinidad que va de 0 a 1 M de Cloruro de Sodio. Los corchetes muestran la fracción TBL-IE2 obtenida en la cromatografía.

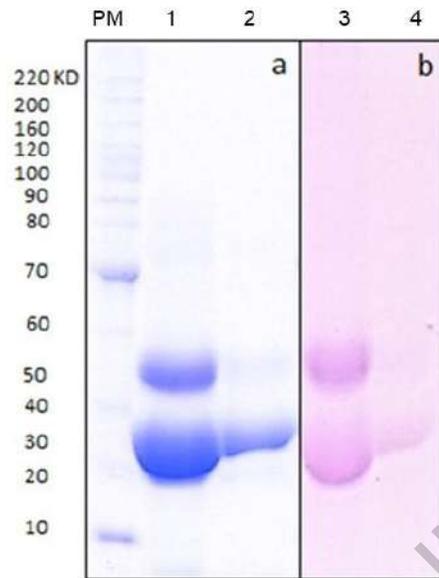


Figura 7. Electroforesis de FCL y TBL-IE2. a) SDS-PAGE 10%: Peso Molecular (MP). 1) FCL de Frijol Tépari, 2) Proteína TBL-IE2 obtenida de intercambio iónico. b) Tinción ácida periódica de Schiff el número uno muestra la FCL, mientras que el número dos se muestra la proteína TBL-IE2.

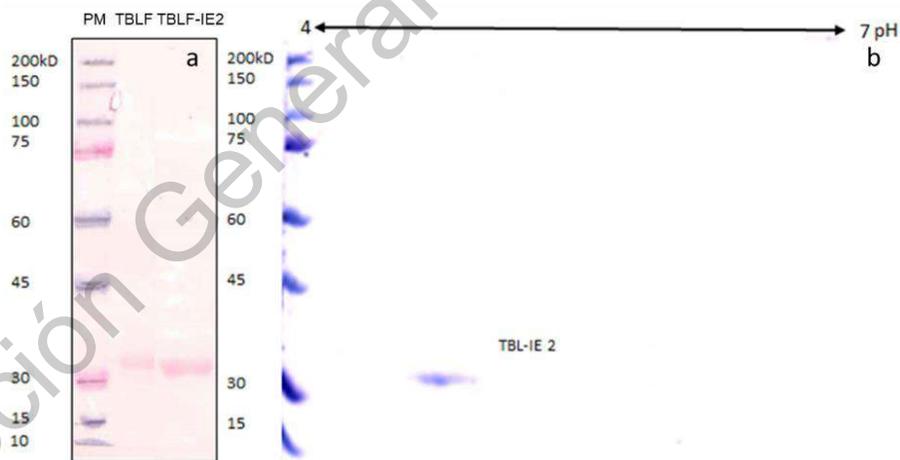


Figura 8. Caracterización bioquímica de TBL-IE2. a) Western blot de la FCL y TBL-IE2, respectivamente, donde se observa el reconocimiento de una proteína de peso molecular aparente de 30 kDa, b) Perfil electroforético bidimensional de TBL-IE2 con rango de pH 4-7.



Figura 9. SDS PAGE en 2D de la proteína TBL-IE2. Electroforesis en dos dimensiones con rango de pH 4.5 a 5.5. Se observa una banda de peso molecular aparente (PMA) de 30 kDa, distribuida a lo largo del gel.



Figura 10. Western Blot de 2D de la proteína TBL-IE2. Se realizó la electroforesis en dos dimensiones, en un rango de pH 4.5 a 5.5 y se realizó un Western blot. Se observa el reconocimiento del anticuerpo antilectina a la lectina de interés.

4.2 Marcaje y caracterización de TBL-IE2 con QD

El acoplamiento de la TBL-IE2 a QD mediante microfluídica se observó mediante microscopía multifotón (Figura 11). Se analizaron cuatro variables: luz visible, fluorescencia a 570 nm, combinado luz visible y fluorescencia 570 nm y análisis de lambda. Se registró una lectura cada 4 nm desde 400 hasta 700 nm (espectro de luz visible). El tamaño de los QD fue de 4-6 nm a una resolución de 180,000 Kv (Figura 12).

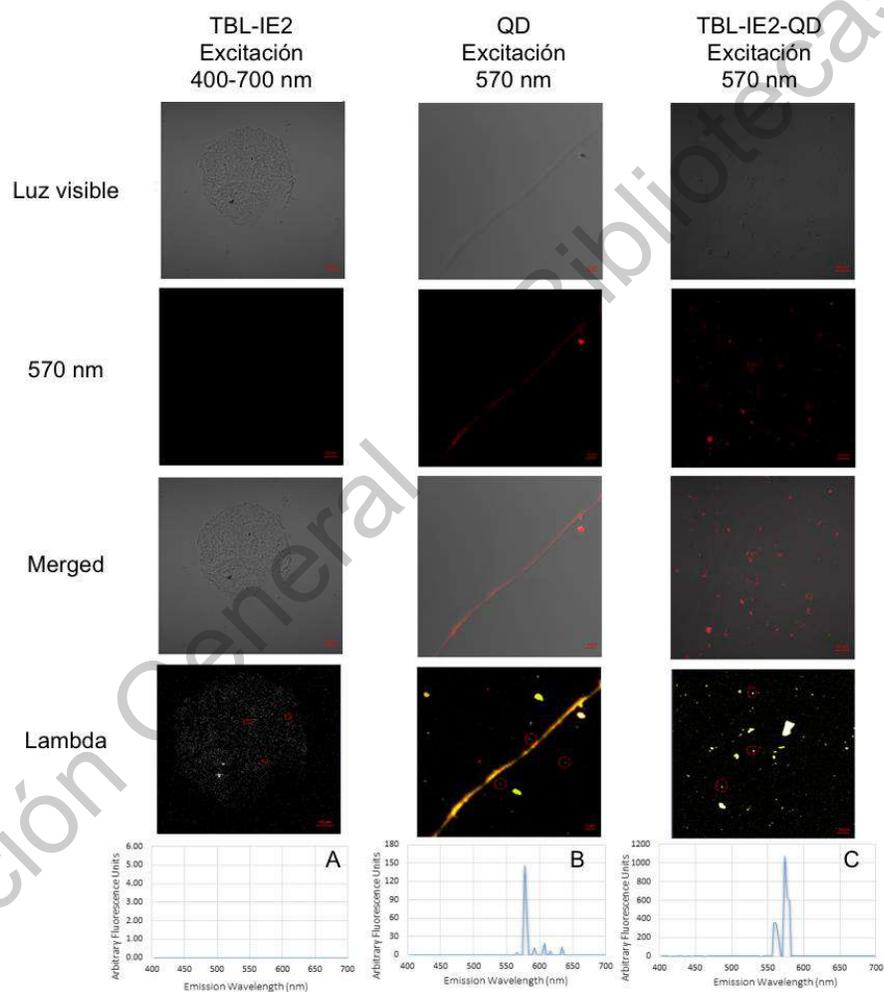


Figura 11. Análisis óptico del acoplamiento de la TBL-IE2 a QD. Imágenes de fluorescencia: análisis en luz visible, análisis de excitación a 570 nm, luz visible y excitación a 570 nm fusionados, análisis lambda de 400 a 700 nm con una distancia de 4 nm entre lecturas y longitud de onda de emisión de: a) TBL-IE2, no hay presencia de fluorescencia, como se muestra en las micrografías; b) Quantum Dot, se puede observar un solo pico a 570 nm en el gráfico como lo describe el proveedor de nanopartículas; c) Análisis del complejo TBL-

IE2-QD, se puede observar un pico a 580 nm y un segundo pico a 560 nm con menor intensidad.

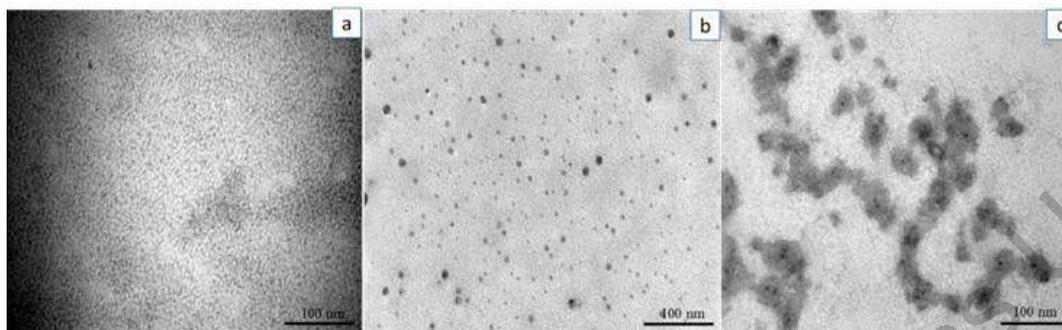


Figura 12. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión para la lectina acoplada a QD. a) TBL-IE2 se puede observar una distribución homogénea de la proteína y ausencia de QD b) Complejo TBL-IE2-QD se puede observar la presencia de QD en toda la microfotografía, c) Marcaje de lectina (TBL-IE2) con QD por la técnica de glutaraldehído al 2%, se muestran clústeres de diversos tamaños además de la presencia de QD.

4.3 Actividad aglutinante

Posterior a la purificación se determinaron las unidades aglutinantes (UA) para TBL-IE-2 y para TBL-IE2-QD, donde se observaron 12,300 UA/mg y para TBL-IE2, 9,300 UA/mg de proteína, la presencia de fluorescencia se observa en la Figura 13.

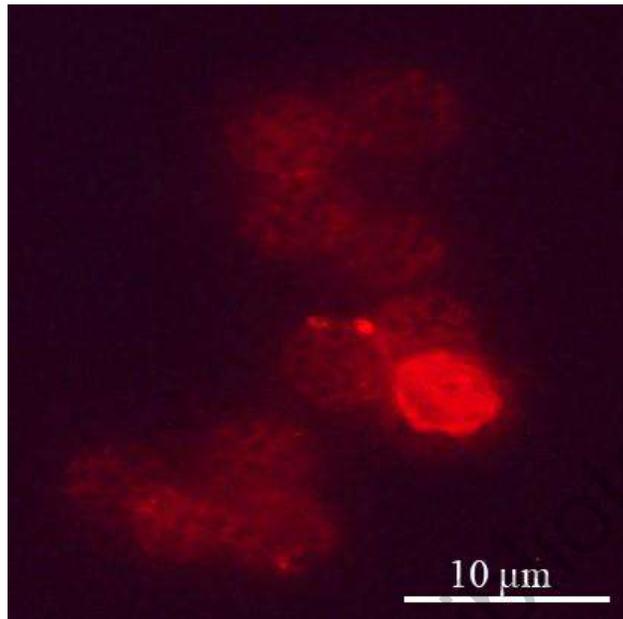


Figura 13. Actividad aglutinante del complejo TBL-IE2-QD. Microfotografía por microscopía de fluorescencia, donde se observa la aglutinación de eritrocitos A⁺ de humano por el complejo TBL-IE2-QD, posterior a 2 h de incubación a 37 °C.

4.4 Potencial Z y tamaño de partícula

Los resultados obtenidos en el Zetasizer determinaron que el potencial zeta promedio de TBL-IE2 fue de -8.52mV, mientras que para el complejo TBL-IE2-QD fue de -18.51 mV ($p < 0.05$) (Figura 14). Por su parte, el análisis de tamaño de partícula no mostró diferencia significativa entre TBL-IE2 y TBL-IE2-QD. La estandarización de la metodología de marcaje presentó diversas problemáticas dado que los análisis de potencial zeta y tamaño de partícula necesitan condiciones controladas. En la Figura 15, se observa la distribución del tamaño de partícula en relación con los pasos de purificación y marcaje. Se muestran algunos cambios de tamaño de la proteína TBL-IE2 posterior al marcaje con QD, aunado a la presencia de QD libres que no se acoplaron a la lectina. Posterior a la diálisis, se pudo observar la eliminación de los QD presentes.

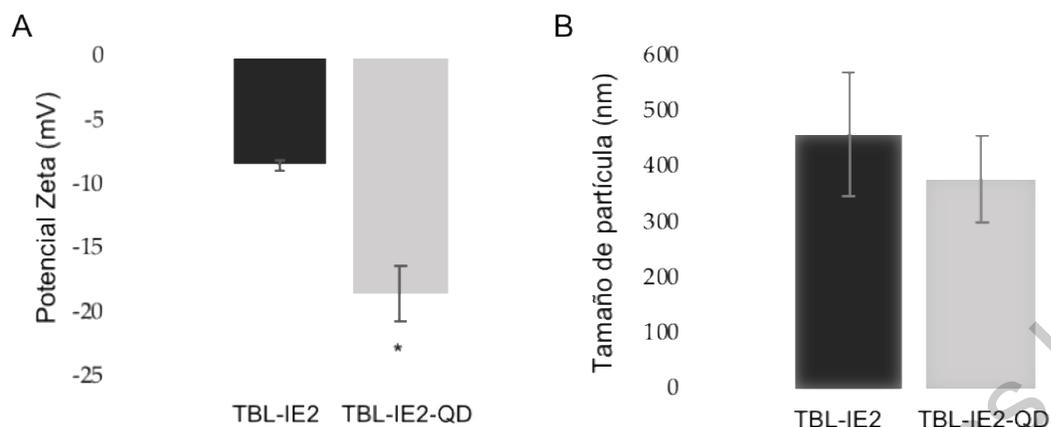


Figura 14. Potencial Zeta y tamaño de partícula de TBL-IE2 y TBL-IE2-QD. A) Potencial zeta promedio de la lectina no marcada (TBL-IE2) y la lectina marcada (TBL-IE2-QD), en mili volts (mV). B) Tamaño de la lectina TBL-IE2 y del complejo TBL-IE2-QD. Análisis post hoc Tukey, comparaciones múltiples de medias 95%.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

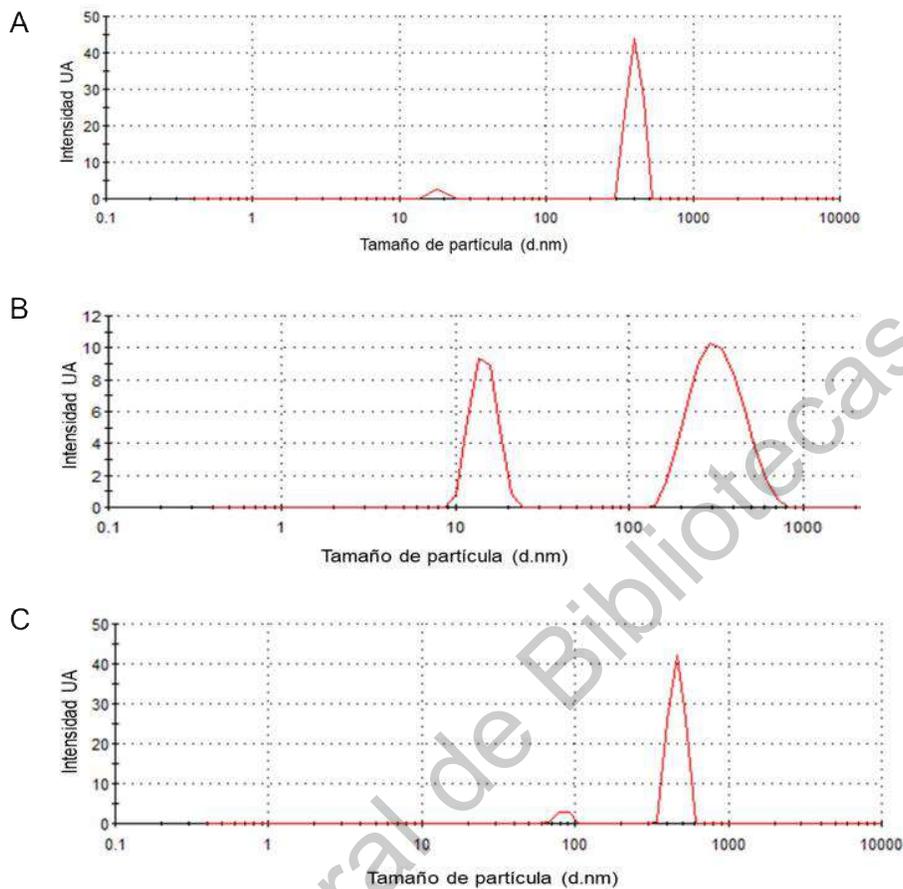


Figura 15. Distribución del tamaño de partícula de TBL-IE2 y TBL-IE2-QD. A) En el caso de la lectina sin acoplar (TBL-IE2) se observa un pico máximo en el eje de 425 nm, indicando que la mayoría de moléculas se encuentran en ese tamaño de partícula, a su vez se muestra un pico de menor tamaño e intensidad. B) Tamaño de partícula de TBL-IE2-QD posterior al marcaje con la técnica de microfluídica, se observan dos picos, el primero se muestra en la escala de 100 nm mostrando una intensidad de 9 UA, el segundo pico se encuentra en el rango de 400 nm. C) Tamaño de partícula TBL-IE2-QD posterior a diálisis contra agua. Se observa un pico pequeño en el rango de 80 nm con una intensidad menos a las 3 UA, y a su vez, se muestra un pico bien definido a los 375 nm, con una intensidad aparente de 42 UA.

4.5 Efecto citotóxico de TBL-IE2 y de TBL-IE2-QD sobre células HT-29

Posterior a la purificación, caracterización y marcaje de TBL-IE2 con QD, se realizó un análisis de citotoxicidad de TBL-IE2 y de TBL-IE2-QD contra células HT-29, determinando la CL_{50} y las diferencias entre tratamientos como se muestra en la Figura 16.

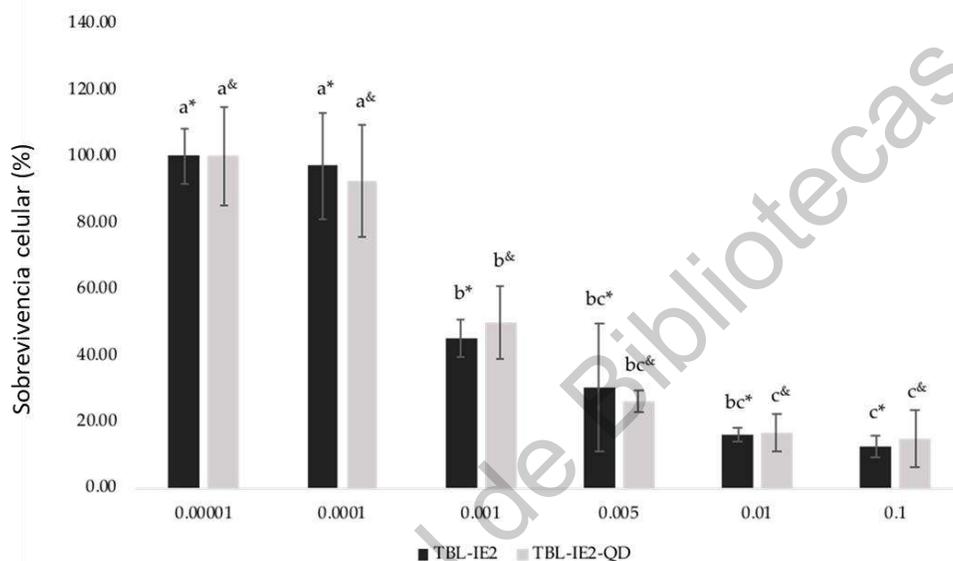


Figura 17. Efecto citotóxico de TBL-IE2 y el complejo TBL-IE2-QD sobre la línea celular HT-29. El porcentaje de sobrevivencia celular se muestra después de diferentes tratamientos con TBL-IE2 y TBL-IE2-QD. Letras minúsculas (*) TBL-IE2 y (&) TBL-IE2-QD indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones para cada tratamiento, (Tukey, $p < 0.05$). Se realizaron tres experimentos independientes con las células HT-29.

Tanto la lectina TBL-IE2, como el complejo TBL-IE2-QD, presentaron actividad citotóxica contra células HT-29, de manera estadísticamente significativa con respecto a los controles, en todas las concentraciones. El porcentaje de sobrevivencia celular no fue estadísticamente diferente entre la lectina marcada y la no marcada, lo que indica que, tras el marcaje, la lectina conservó su efecto citotóxico.

5. Discusión

Existe abundante información sobre la purificación de lectinas, sin embargo, las publicaciones referentes a su marcaje para la visualización microscópica, son limitadas. En el presente trabajo se logró purificar por diversos métodos cromatográficos una lectina de frijol Tépari. Métodos como el de exclusión molecular y cromatografía de intercambio iónico se han descrito para la purificación de lectinas como la de *Morone saxatilis* (Feng y Vasta, 2020) o la de *Galanthus nivalis* (Van Damme, 2020). Estos métodos permiten continuar con el estudio de dichas proteínas, presentando moléculas viables para análisis moleculares, aunque se obtienen rendimientos bajos. La lectina TBL-IE2 fue purificada por cromatografía de exclusión molecular, seguido de una cromatografía de intercambio iónico. La metodología utilizada es reproducible, pero de alto costo, comparado con el rendimiento que se podría obtener al utilizar metodologías para la producción de lectinas recombinantes (Martínez-Alarcón y col., 2019).

En cuanto a la actividad aglutinante, en este caso fue de 12,300 UA/mg de proteína, comparada con las 5,566 UA/mg de proteína de la FCL de frijol Tépari reportada por Ferríz-Martínez y col. (2015). El incremento de actividad aglutinante puede estar relacionado al mayor grado de pureza que presenta la proteína, que a su vez mejora la interacción con los carbohidratos de membrana de los eritrocitos. Al cuantificar la actividad aglutinante de la lectina unida a QD, TBL-IE2-QD, se observó un total de 9,300 UA/mg de proteína, lo que sugiere que la unión de los QD puede estar provocando obstrucción de los sitios de reconocimiento de la proteína con la membrana celular del eritrocito. Esta interacción puede ser dependiente de la cantidad de nanopartículas acopladas a cada proteína, sin embargo, hacen falta más estudios para confirmarlo. Aunque se ha reportado en trabajos previos que el marcaje no representa una afectación en la actividad citotóxica, sí se han observado alteraciones en la actividad aglutinante (Babu y col., 2007; Cunha y col., 2018b).

La proteína TBL-IE2 presentó un punto isoeléctrico aparente de 4.5, igual a lo reportado por Torres-Arteaga y col. (2016), y ligeramente diferente a lo reportado en

otros trabajos con lectinas de Concanavalina A, que describieron un pH de 5.5 (Sperling y Parak, 2010). La técnica de purificación utilizada en este trabajo presentó modificaciones a lo reportado por García y col. (2012) y Torres-Arteaga y col. (2016), en donde se pudo obtener un mayor grado de pureza, pero un bajo rendimiento en la cantidad de proteína obtenida.

Estudios previos definen lectinas de frijol Tépari con características similares en respecto a peso molecular aparente, punto isoeléctrico, reconocimiento a carbohidratos por tinción de Schiff, y reconocimiento a anticuerpos antilectina, según lo reportado por Torres-Arteaga y col. (2016) y Moreno-Salgado (datos sin publicar). Sin embargo, anteriormente se había obtenido una menor actividad aglutinante específica, lo que sugiere que el método empleado mejoró la recuperación de la proteína de interés.

Pocas lectinas han sido acopladas a nanopartículas como los QD, ya sea por unión covalente como estreptavidina-biotina, glutaraldehído, EDC-NHS o adsorción (Cunha y col., 2018b). Estos métodos suelen ser los más comunes para el etiquetado de proteínas, donde se ha reportado el uso de diversos pH para acoplar proteínas con QD (Zhang 2014; Cunha y col., 2018). En este caso se utilizó el método de microfluídica y se determinó que el pH apropiado para el etiquetado TBL-IE2 con QD es de 7. Diversos trabajos reportan esta misma condición para otras lectinas como la fitohemaglutinina de frijol, Con A o lectina de Cramoll (Santos y col., 2006; Kara y col., 2014; Cunha y col., 2018). Pequeños cambios en el pH pueden ocasionar obstrucción del sitio de reconocimiento, unión deficiente a moléculas receptoras, baja fluorescencia o fluorescencia nula (Cunha y col., 2018a).

La microscopía de fluorescencia ha permitido que la ciencia pueda dar avances a saltos en las áreas de física, química o la biomedicina. Estos avances han permitido poder etiquetar moléculas orgánicas e inorgánicas con nanopartículas fluorescentes para describir procesos biológicos (Cunha y col., 2018a; Pashazadeh-Panahi y Hanzadeh, 2019), ya sea para la detección de células cancerosas, bacterias, hongos o moléculas que presenten carbohidratos (Kloepfer y col., 2003).

El análisis de espectrometría para TBL-IE2 no mostró fluorescencia, corroborando lo reportado por Albani (2004), Bird-Lieberman y col. (2012) y Baeten y col. (2014), quienes describen que las lectinas son moléculas que no presentan fluorescencia. Por otro lado, el análisis de QD mostró una emisión espectral con un pico máximo de fluorescencia a 574 nm, emisión que corresponde a las características señaladas por el fabricante, así como a los registros de otros trabajos que utilizan QD de telurio de cadmio (TeCd) en procesos de etiquetado de proteínas (Joglekar y col., 2017). El análisis del complejo TBL-IE2-QD mostró una emisión espectral entre 568 nm y 586 nm mientras que los QD mostraron un único pico de fluorescencia a 570 nm. Resultados similares se encontraron en el trabajo de Arruda y col., en 2019, donde se etiquetó una lectina de la planta *Moringa oleifera* con QD de CdTe mostrando estabilidad en la longitud de onda de emisión y buena intensidad de fluorescencia en el reconocimiento de la matriz de larvas del mosquito *Aedes aegypti*.

La intensidad de emisión de los QD alcanzó las 150 unidades arbitrarias, mientras que el complejo TBL-IE2-QD alcanzó 1000 unidades arbitrarias, lo que contrasta con lo reportado por Li y col. (2020), donde se describe que la unión de aminoácidos o moléculas orgánicas puede disminuir la intensidad de fluorescencia de los QD. El incremento observado en este caso puede estar basado en el acomodo tridimensional que permite la técnica de microfluídica al unirse con los grupos amino de la lectina. Lo anterior muestra que el acoplamiento no produjo cambios significativos en la longitud de onda de emisión de fluorescencia.

Los resultados obtenidos con la microscopía electrónica de transmisión (MET) mostraron diferencias entre TBL-IE2 y TBL-IE2-QD. El uso de MET permite observar el acomodo y la interacción de moléculas como las proteínas ADN o ARN acopladas con nanopartículas como los QD. Las proteínas son difíciles de observar por sus características y estructura ya que forman estructuras icosaédricas en la periferia de los puntos cuánticos (Li-Chan y Lacroix, 2018; Bagchi A 2018). Al acoplar la lectina al QD utilizando glutaraldehído se observaron clústeres 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 proteína a los QD.

Hasta el momento existen pocos trabajos de MET que muestren los conjugados de lectinas de manera homogénea, como se obtuvieron en el presente trabajo. La formación de complejos de diferente tamaño fue observada por Zhang y col. (2013a) y Ahmed y col. (2015). En trabajos como el de Babu y col. (2007) se mostró que la proteína Con A puede formar clústeres o aglutinación con azúcares acoplados a QD, llevando a alteraciones en la medición de dispersión de luz, pero siendo funcionales para la detección de carbohidratos en células HepG2.

La disminución del potencial zeta entre TBL-IE2 y TBL-IE2-QD puede estar relacionado a la cantidad de nanopartículas acopladas a la lectina, ya que los grupos carboxilo en la periferia de los QD le confiere una carga negativa, disminuyendo considerablemente este potencial, el cual está dado por la totalidad de cargas negativas presentes en el complejo TBL-IE2-QD. Gao y col. (2018), reportaron la unión de una lectina de germen de trigo WGA a QD de CdSe/ZnS, funcionalizados con Metil-PEG-PLA y maleimida-PEG-PLA complejo (WGA-QD-NP). estas proteínas son potenciales herramientas de diagnóstico para el reconocimiento de microorganismos aunado al reconocimiento de tejidos y células tumorales. Dicho complejo no presentó diferencias significativas en el potencial zeta, dado que estos polímeros no ejercen una carga en el QD y su estabilidad está en el rango de las 24 h.

Para el tamaño de partícula, Kumar y col. en 2012 reportan que la albumina sérica bovina incrementó significativamente su tamaño al acoplarse a moléculas de QD de ZnS, utilizando el método de unión con glutaraldehído. Gao y col. en 2008 encontraron que el complejo WGA-QD-NP no presentó diferencias significativas en tamaño de partícula comparándolo con la proteína WGA nativa. En el presente trabajo, el escaneo que se realizó para determinar la presencia de moléculas diferentes a las esperadas mostró resultados favorables, donde sólo se observó un pico perteneciente a la lectina, mientras que posterior al marcaje se observaron dos picos, uno en la longitud de tamaño de los QD no acoplados, y el otro respectivo a la TBL-IE2-QD. Posterior a la diálisis, se observó el complejo TBL-IE2-QD libre de residuos de QD que no fueron acoplados (Cunha y col., 2018a; Cunha y col., 2018b; Wang y

col., 2010). Se ha reportado que el tamaño de partícula puede intervenir en la interacción y el destino de las moléculas en la célula (Rejman y col., 2004).

La técnica microfluídica y la posterior diálisis favorecen la formación equimolecular de lectina-QD, lo que ayuda a tener un complejo más pequeño y que se comporte más parecido a la lectina, además de que favorece la observación en microscopía y el análisis de potencial zeta ya que los QD aportan una fluorescencia y potencial zeta estables. La publicación de otros trabajos como el reportado por Chang y col. (2012) fue muy útil para el acoplamiento de lectinas con QD. Gao y col. (2008) determinaron que la lectina WGA y un complejo llamado WGA-QD-NP aplicado en células CaCo2 no presentó diferencias significativas en toxicidad, las moléculas del complejo WGA-QD-NP se internalizaron al aparato de Golgi y a los lisosomas, posiblemente por endocitosis mediada por el reconocimiento de N-acetil-glucosamina y ácido siálico en la superficie celular, seguido de mecanismos regulados por clatrina y caveolina. Cunha y col. en 2018 reportaron endocitosis y exocitosis de la proteína WGA conjugada a QD, en células de carcinoma de pulmón A549. Dichos resultados fueron probados con células cancerígenas que presentan sobre expresadas diversas glicosilaciones en membrana que permiten este reconocimiento celular.

La citotoxicidad de TBL-IE2 sobre líneas celulares de cáncer de colon HT-29, no mostró diferencias significativas con TBL-IE2-QD. La concentración letal media (CL_{50}) fue de 1.0×10^{-3} y 1.7×10^{-3} mg/mL, respectivamente. Existe poca información sobre la citotoxicidad de lectinas acopladas a puntos cuánticos, lo que se ha reportado indica que preserva su funcionalidad para reconocer distintos glúcidos o carbohidratos en la membrana celular como la N-acetil-glucosamina o el ácido siálico (Läubli y Varki 2019).

Diversos QD como CdTe, ZnS, ZnOCa entre otros, muestran su factibilidad para acoplarse a proteínas, por lo que es posible determinar la interacción de los complejos contra células cancerígenas (Zhang y col., 2013b; Cunha y col., 2018a). Los resultados obtenidos con complejos lectina-QD en células sugieren que el desarrollo

de proteínas acopladas a nanopartículas fluorescentes sería una buena opción para diagnosticar tejidos cancerosos (Ahmed y col., 2015). Se tienen reportes de la citotoxicidad que presentan los QD cuando se aplican a diversos tipos celulares, pero ésta se ve disminuida cuando se acoplan a proteínas (Chowdhury y col., 2018).

6. Conclusiones

Trabajos previos con lectinas de frijol Tépari han demostrado la efectividad de estas proteínas para aglutinar los eritrocitos A+ y desencadenar efectos citotóxicos en células de cáncer de colon y en experimentos *in vivo*. En el presente trabajo se logró la purificación y caracterización de una fracción de lectina (TBL-IE2) de este grano. Posteriormente, la lectina se acopló a nanopartículas QD, por medio de la técnica microfluídica, formando el complejo TBL-IE2-QD; el cual también se caracterizó, y se pudo comprobar la conservación de sus actividades biológicas, tanto aglutinación como citotoxicidad. El proceso de etiquetado realizado a través de la técnica de microfluídica permitió mantener características fisicoquímicas similares a las de la lectina sin marcar, permitiendo así la permanencia de sus efectos, y así mismo su visualización en microscopía. El complejo TBL-IE2-QD mostró estabilidad y capacidad para ser utilizado en el futuro, con el fin de lograr la trazabilidad de las lectinas en sistemas *in vitro* e *in vivo*, como una herramienta para el diagnóstico molecular del cáncer.

7. Referencias

- Adamová, L., Malinovská, L., & Wimmerová, M. (2014). New sensitive detection method for lectin hemagglutination using microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 77(10), 841-849.
- 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.
- Alatorre-Cruz, J. M., Pita-López, W., López-Reyes, R. G., Ferriz-Martínez, R. A., Cervantes-Jiménez, R., Carrillo, M. D. J. G., Gutiérrez-Sánchez, H., Reis de Souza T, Blanco-Labra A, García-Gasca T. (2018). Effects of intragastrically-administered Tepary bean lectins on digestive and immune organs: Preclinical evaluation. *Toxicology Reports*, 5, 56-64.
- Albani, J. R. (2004). Tertiary structure of human α 1-acid glycoprotein (orosomucoid). Straightforward fluorescence experiments revealing the presence of a binding pocket. *Carbohydrate Research*, 339(3), 607-612.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). Analyzing protein structure and function. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science. New York, USA.
- Amano, M., Hinou, H., Miyoshi, R., Nishimura, S. I. (2014). Potential usage for in vivo lectin screening in live animals utilizing cell surface mimetic glyco-nanoparticles, phosphorylcholine-coated Quantum dots (PC-QDs). *Lectins: Methods and Protocols*, 361-369
- Ambrosi, M., Cameron, N. R., Davis, B. G. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3(9), 1593-1608.

- Appell, M., Hurst, W. J., Finley, J. W., & de Man, J. M. (2018). Amino acids and proteins. In Principles of Food Chemistry Springer, Cham, 117-164.
- Arruda, C. C., Freitas, D. V., Seabra, M. A., Xavier-Júnior, F. H., Figueiredo, R. C., Napoleão, T. H., Paivae M.G., M.A.F. Marcelo., Navarro, M. (2019). CdTe-GSH as luminescent biomarker for labeling the larvicidal action of WSMoL lectin in (*Aedes aegypti*) larvae. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 110672.
- Babu, P., Sinha, S., Surolia, A. (2007). Sugar- quantum dot conjugates for a selective and sensitive detection of lectins. Bioconjugate Chemistry, 18(1), 146-151.
- Baeten, J., Suresh, A., Johnson, A., Patel, K., Kuriakose, M., Flynn, A., Kademani, D. (2014). Molecular imaging of oral premalignant and malignant lesions using fluorescently labeled lectins. Translational Oncology, 7(2), 213-220.
- Bagchi, A. (2018). Protein-protein Interactions: Basics, Characteristics, and Predictions. In Soft Computing for Biological Systems. Springer, Singapore. 111-120.
- Bhalla, N., Chiang, H. J., & Shen, A. Q. (2018). Cell biology at the interface of nanobiosensors and microfluidics. In Methods in Cell Biology Academic Press. (148), 203-227.
- Bhutia, S. K., Panda, P. K., Sinha, N., Praharaj, P. P., Bhol, C. S., Panigrahi, D. P., Mahapatra, K. K., Saha, S., Patra, S., Mishra, S. R., Behera, B. P., Patil, S., Mahiti, T. K. (2019). Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. Pharmacological Research, 144 (2019) 8–18.
- Bilan, R., Nabiev, I., Sukhanova, A. (2016). Quantum dot-based nanotools for bioimaging, diagnostics, and drug delivery. Journal of Chemical Biology, 17(22), 2103-2114.

- Bird-Lieberman, E. L., Neves, A. A., Lao-Sirieix, P., O'donovan, M., Novelli, M., Lovat, L. B., William S., Mahal L K., Brindle KM., Fitzgerald, R. C. (2012). Molecular imaging using fluorescent lectins permits rapid endoscopic identification of dysplasia in Barrett's esophagus. *Nature medicine*, 18(2), 315.
- Blair, M. W., Pantoja, W., Munoz, 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.
- Boyd, W. C., Shapleigh, E. (1954). Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. *The Journal of Immunology*, 73(4), 226-231.
- Bozhanova, N. G., Baranov, M. S., Klementieva, N. V., Sarkisyan, K. S., Gavrikov, A. S., Yampolsky, I. V., Elena V. Zagaynova E. V., Lukyanov S. A., Lukyanov K. A., Mishin, A. S. (2017). Protein labeling for live cell fluorescence microscopy with a highly photostable renewable signal. *Chemical Science*, 8(10), 7138-7142.
- 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.
- Brooks, S. A. (2017). Lectin Histochemistry: Historical Perspectives, State of the Art, and the Future. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ), 1560, 93-107.
- Cabral Filho, P. E., Pereira, M. I., Fernandes, H. P., de Thomaz, A. A., Cesar, C. L., Santos, B. S., Barjas C. M., Fontes, A. (2015). Blood group antigen studies using CdTe Quantum dots and flow cytometry. *International Journal of Nano-Medicine*, 10, 4393.
- Carlini, C. R., Grossi-de-Sá, M. F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40(11), 1515-1539.

Carvalho, M. E. T., Oliveira, W. F., Cunha, C. R., Coelho, L. C., Silva, M. V., Junior, L. B. C., Correia, M. T. S. (2019) Evaluating the glyco phenotype on breast cancer tissues with Quantum dots-Cramoll lectin conjugates. *International Journal of Biological Macromolecules* 138, 302-308

Castillo-Villanueva, A., Caballero-Ortega, H., Abdullaev-Jafarova, F., Garfias, Y., del Carmen Jiménez-Martínez, M., Bouquelet, S., ... Zenteno, E. (2007). Lectin from *Phaseolus acutifolius* var. *escumite*: chemical characterization, sugar specificity, and effect on human T-lymphocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5781-5787.

Cavada, B. S., Osterne, V. J. S., Oliveira, M. V., Pinto-Junior, V. R., Silva, M. T. L., Bari, A. U, Nascimento, K. S. (2020). Reviewing Mimosoideae lectins: A group of under explored legume lectins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 154, 159-165

Chan, W. C., Maxwell, D. J., Gao, X., Bailey, R. E., Han, M., Nie, S. (2002). Luminescent Quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(1), 40-46.

Chang, S., Kang, B., Liu, X., Dai, Y., & Chen, D. (2012). The combined influence of surface modification, size distribution, and interaction time on the cytotoxicity of CdTe Quantum dots in PANC-1 cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 44(3), 241-248.

Chen, K., Fan, H. (2016). *Introduction to Microfluidics*. Hugh Fan, Z. Circulating Tumor Cells: Isolation and Analysis. NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 33-50.

Chen, W., Shao, F., & Xianyu, Y. (2020). Microfluidics-implemented biochemical assays: from the perspective of readout. *Small*, 16(9), 1903388.

- Chowdhury, A. D., Ganganboina, A. B., Park, E. Y., Doong, R. A. (2018). Impedimetric biosensor for detection of cancer cells employing carbohydrate targeting ability of Concanavalin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 122, 95-103.
- Coelho, L. C. B. B., Silva, P. M. D. S., Lima, V. L. D. M., Pontual, E. V., Paiva, P. M. G., Napoleao, T. H., & Correia, M. T. D. S. (2017). Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017;2017:1594074
- Cong, Y., Katipamula, S., Trader, C. D., Orton, D. J., Geng, T., Baker, E. S., Kelly, R. T. (2016). Mass spectrometry-based monitoring of millisecond protein–ligand binding dynamics using an automated microfluidic platform. *Lab on a Chip*, 16(9), 1544-1548.
- Coulibaly, F. S.; Youan, B.-B. C. (2017) Current status of lectin based cancer diagnosis and therapy. *AIMS Molecular Science*, (4), 1–27.
- Cunha, C. R. A, Andrade, C. G., Pereira, M. I., Cabral Filho, P. E., Carvalho Jr, L. B., Coelho, L. C., Santos B.S., Fontes A., Correia, M. T. (2018a). Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178, 85-91.
- Cunha, C. R. A., Oliveira, A. D. P. R., Firmino, T. V. C., Tenório, D. P. L. A., Pereira, G., Carvalho Jr, L. B., Santos B.S. Correia M.T.S., Fontes A, (2018b). Biomedical applications of glyconanoparticles based on Quantum dots. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1862(3), 427-439.
- Da Silva, L. C. N., Correia, M. T. D. S. (2014). Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. *Frontiers in Microbiology*, (5), 20.
- Da Silva, M. L. S. (2018). Lectins as Biorecognition Elements in Biosensors for Clinical Applications in Cancer. *Frontiers in Natural Product Chemistry*, (4), 156-203.

- Damodaran, S. (2008). Amino acids, peptides and proteins. Fennema's Food Chemistry, (4), 217-329.
- Dan, X., Liu, W., Ng, T. B. (2016). Development and applications of lectins as biological tools in biomedical research. Medicinal Research Reviews, 36(2), 221-247.
- Davenport, A. P., Scully, C. C., de Graaf, C., Brown, A. J., Maguire, J. J. (2020). Advances in therapeutic peptides targeting G protein-coupled receptors. Nature Reviews Drug Discovery, 1-25.
- De Schutter, K., Van Damme, E. (2015). Protein-carbohydrate interactions as part of plant defense and animal immunity. Molecules, 20(5), 9029-9053.
- Debouck, D. G. (1999). Diversity in Phaseolus species in relation to the common bean. In Common bean improvement in the twenty-first century Springer, Dordrecht. (25-52).
- Estrada-Martínez, L. E., Moreno-Celis, U., Cervantes-Jiménez, R., Ferriz-Martínez, R. A., Blanco-Labra, A., García-Gasca, T. (2017). Plant lectins as medical tools against digestive system cancers. International Journal of Molecular Sciences, 18(7), 1403.
- Feng, C., Vasta, G. R. (2020). Purification and Biochemical Characterization of Selected F-Type Lectins. Lectin Purification and Analysis: Methods and Protocols, 241-255.
- Ferriz-Martínez, R. A., García-García, K., Torres-Arteaga, I., Rodríguez-Mendez, A. J., Guerrero-Carrillo, M. J., Moreno-Celis, U., Ángeles-Zaragoza, M. A., Blanco-Labra, A., Gallegos-Corona, M. A., Robles-Álvarez, J. P., Mendiola-Olaya, E., Andrade-Montemayor, H. M., García, O. P., García-Gasca, T. (2015). Tolerability assessment of a lectin fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats. Toxicology Reports, (2), 63-69.

- Ferriz-Martinez, R. A., Torres-Arteaga, I. C., Blanco-Labra, A., Garcia-Gasca, T. (2010). The role of plant lectins in cancer treatment. *Nova Science* 71-90.
- Fontes, A., de Lira, R. B., Seabra, M. A. B. L., da Silva, T. G., de Castro Neto, A. G., Santos, B. S. (2012). Quantum dots in biomedical research. *Biomedical engineering-technical applications in medicine*, 1st edn. InTech, Rijeka, 269-290.
- Fu, L. L., Zhou, C. C., Yao, S., Yu, J. Y., Liu, B. O., Bao, J. K. (2011). Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(10), 1442-1449.
- Fukuda, Y., Sugahara, T., Ueno, M., Fukuta, Y., Ochi, Y., Akiyama, K., Tatsuhikod M., Seizoe M., Akihirof K., Kato, K. (2006). The anti-tumor effect of *Euchema serra* agglutinin on colon cancer cells in vitro and in vivo. *Anti-cancer Drugs*, 17(8), 943-947.
- Gao, X., Wang, T., Wu, B., Chen, J., Chen, J., Yue, Y., Jiang, X. (2008). Quantum dots for tracking cellular transport of lectin-functionalized nanoparticles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(1), 35-40.
- García-Gasca, T., García-Cruz, M., Hernandez-Rivera, E., López-Martínez, J., Castaneda-Cuevas, A. L., Yllescas-Gasca, L., Rodríguez-Méndez, A. J., 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.
- Gautam, A. K., Gupta, N., Narvekar, D. T., Bhadkariya, R., & Bhagyawant, S. S. (2018). Characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) lectin for biological activity. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(3), 389-397.
- 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.

- Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S. B. (2011). A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica*, 113(3), 236-247.
- González De Mejía, E. G., Prisecaru, V. I. (2005). Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(6), 425-445.
- Grandhi, N.J.; Mamidi, A.S.; Surolia, A (2015). Pattern recognition in legume lectins to extrapolate amino acid variability to sugar specificity. In *Biochemical Roles of Eukaryotic Cell Surface Macromolecules*; Chakrabarti, A., Surolia, A., Eds.; Springer International Publishing: Switzerland 199–215.
- Gupta, B., Sadaria, D., Warriar, V. U., Kirtonia, A., Kant, R., Awasthi, A. Garg, M. (2020). Plant lectins and their usage in preparing targeted nanovaccines for cancer immunotherapy. In *Seminars in cancer biology*. Journal Pre-proof. 1-68
- Hamid, R., Masood, A., Wani, I. H., Rafiq, S. (2013). Lectins: Proteins with diverse applications. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(4), 93-103
- Hanrahan, A. J., Iyer, G., Solit, D. B. (2020). Intracellular signaling. In *Abeloff's Clinical Oncology* (pp. 24-46).
- Hashim, O. H., Jayapalan, J. J., Lee, C. S. (2017). Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. *PeerJ*, 5, e3784.
- He, X. P., Zeng, Y. L., Zang, Y., Li, J., Field, R. A., Chen, G. R. (2016). Carbohydrate CuAAC click chemistry for therapy and diagnosis. *Carbohydrate Research*, 429, 1-22.
- Higuchi, Y., Oka, M., Kawakami, S., & Hashida, M. (2008). Mannosylated semiconductor Quantum dots for the labeling of macrophages. *Journal of Controlled Release*, 125(2), 131-136.

- Hou, X., Zhang, Y. S., Santiago, G. T., Alvarez, M. M., Ribas, J., Jonas, S. J., Khademhosseini, A. (2017). Interplay between materials and microfluidics. *Nature Reviews Materials*, 2(5), 17016.
- Jaffé W. (1980). Hemagglutinins (lectins). In: *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. New York: Academic Press, pp. 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.
- Jiang, Q.-L., Zhang, S., Tian, M., Zhang, S.-Y., Xie, T., Chen, D.-Y., Chen, Y.-J., He, J., Liu, J., Ouyang, L. & Jiang, X. (2015). Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. *Cell Proliferation*, 48(1), 17-28.
- Joglekar, S. S., Gholap, H. M., Alegaonkar, P. S., & Kale, A. A. (2017). The interactions between CdTe Quantum dots and proteins: understanding nano-bio interface. *Journal of Material Science*, 4(1), 209-222.
- Kabir, S. R., Nabi, M. M., Nurujjaman, M., Reza, M. A., Alam, A. K., Zaman, R. U., Khandaker Md. Khalid-Bin-Ferdous, Ruhul Amin, Md. Masudul Khan H, Hossain A, & Uddin, M. S. (2015). *Momordica charantia* seed lectin: toxicity, bacterial agglutination and antitumor properties. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(5), 2616-2628.
- Kara, A., Ünak, P., Selçuki, C., Akça, Ö., Medine, E. İ., Sakarya, S. (2014). PHA-L lectin and carbohydrate relationship: conjugation with CdSe/CdS nanoparticles, radiolabeling and in vitro affinities on MCF-7 cells. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 299(1), 807-813.
- Kessel, A., Ben-Tal, N. (2010). *Introduction to proteins: structure, function, and motion*. CRC Press. 592 pp. USA.

- Khandaker Ferdaus K. B., Amin R., Khan M. H., Hossain A., Uddin, M. S. (2015). (*Momordica charantia*) seed lectin: toxicity, bacterial agglutination and antitumor properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(5), 2616-2628.
- Kloepfer, J. A., Mielke, R. E., Wong, M. S., Neilson, K. H., Stucky, G., Nadeau, J. L. (2003). Quantum dots as strain-and metabolism-specific microbiological labels. *Appl. Environ. Microbiology.*, 69(7), 4205-4213.
- Kumar, P., Deep, A., Sharma, S. C., & Bharadwaj, L. M. (2012). Bioconjugation of InGaP Quantum dots for molecular sensing. *Analytical Biochemistry*, 421(1), 285-290.
- Kumar, S., Barros, U. (2020). Purification and partial characterization of a haemagglutinin from *Ulva fasciata*. *Current Science*, 118(4), 621.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A., Vazquez-Moreno, L. (2017). Legume lectins: proteins with diverse applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1242.
- Läubli, H., Varki, A. (2019). Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (Siglecs) detect self-associated molecular patterns to regulate immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-13.
- Li, C., Plamont, M. A., Sladitschek, H. L., Rodrigues, V., Aujard, I., Neveu, P., ... & Gautier, A. (2017a). Dynamic multicolor protein labeling in living cells. *Chemical Science*, 8(8), 5598-5605.
- Li, C., Tebo, A., & Gautier, A. (2017b). Fluorogenic labeling strategies for biological imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1473.

- Li, G., Fei, X., Liu, H., Gao, J., Nie, J., Wang, Y., Tian Z., Caicai He., Jiang-Long W, Ji C, Oron, D. (2020). Fluorescence and Optical Activity of Chiral CdTe Quantum dots in Their Interaction with Amino Acids. *ACS nano* 14, 4, 4196-4205.
- Liao, Z., Zhang, Y., Li, Y., Miao, Y., Gao, S., Lin, F., Deng Y., Geng, L. (2019). Microfluidic chip coupled with optical biosensors for simultaneous detection of multiple analytes: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 126, 697-706.
- Li-Chan, E. C. Y., & Lacroix, I. M. E. (2018). Properties of proteins in food systems: an introduction. In *Proteins in food processing* (2nd ed.), (1-25). Oxford UK: Woodhead Publishing.
- Lis, H., y Sharon, N. (1998). Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews*, 98(2), 637–674.
- Liu, B., Bian, H. J., Bao, J. K. (2010). Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters*, 287(1), 1-12.
- Liu, J., Willför, S., Xu, C. (2015). A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 31-61.
- Liu, S. L., Zhang, Z. L., Sun, E. Z., Peng, J., Xie, M., Tian, Z. Q., Pang, D. W. (2011). Visualizing the endocytic and exocytic processes of wheat germ agglutinin by quantum dot-based single-particle tracking. *Biomaterials*, 32(30), 7616-7624.
- Liu, Z., Luo, Y., Zhou, T. T., Zhang, W. Z. (2013) Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? *Cell Proliferation*, 46(5), 509-15
- López, A. N. A., Oliván, L. M. G., Heredia, J. B., Jiménez, R. B., García, H. S., Martínez, L. X. L. (2019). Características nutricionales y bioactivas del frijol Ayocote (*Phaseolus coccineus* L.): una leguminosa subutilizada cultivada en México. *CyTA: Journal of Food*, 17(1), 199-206.

López-Sánchez C, López-Martínez FJ, Castañeda-Cuevas AL, Yllescas-Gasca L, Ferríz-Martínez RA, Torres-Arteaga IC, Gallegos-Corona MA, Rodríguez-Méndez AJ, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A, García-Gasca T. 2010. Evaluación de la Toxicidad *In Vitro* e *In Vivo* de Lectinas de Frijol Tépari. Revista Ciencia@UAQ. (3), 3-13

Manning, J. C., Romero, A., Habermann, F. A., Caballero, G. G., Kaltner, H., Gabius, H. J. (2017). Lectins: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochemistry and Cell Biology*, 147(2), 199-222.

Martínez-Alarcón, D., Mora-Avilés, A., Espinoza-Núñez, A., Cruz-Hernández, A., Rodríguez-Torres, A., Castro-Guillen, J. L., Blanco-Labra, A., García-Gasca, T. (2019). Rhizosecretion of a cisgenic lectin by genetic manipulation of Tepary bean plants (*Phaseolus acutifolius*). *Journal of Biotechnology: X*, (3), 100013.

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), 654.

Mo, D., Hu, L., Zeng, G., Chen, G., Wan, J., Yu, Z., ... Cheng, M. (2017). Cadmium-containing Quantum dots: properties, applications, and toxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(7), 2713-2733.

Moghaddam-Taaheri, P., y Karlsson, A. J. (2018). Protein labeling in live cells for immunological applications. *Bioconjugate Chemistry*, 29(3), 680-685.

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.

Moreno-Celis, U., López-Martínez, J., Blanco-Labra, A., Cervantes-Jiménez, R., Estrada-Martínez, L. E., García-Pascalín, A. E., Guerrero-Carrillo, M. J., Rodríguez-Méndez, A., J., Mejía, C., Ferríz-Martínez, R. A. García-Gasca, T. (2017). (*Phaseolus acutifolius*) lectin fractions exhibit apoptotic effects on colon cancer: Preclinical studies using dimethylhydrazine or azoxi-methane as cancer induction agents. *Molecules*, 22(10), 1670.

Moura, I. M., Cabral Filho, P. E., Seabra, M. A., Pereira, G., Pereira, G. A., Fontes, A., Santos, B. S. (2018). Highly fluorescent positively charged ZnSe Quantum dots for bioimaging. *Journal of Luminescence*, 201, 284-289.

Obermaier, C., Griebel, A., Westermeier, R. (2015). Principles of protein labeling techniques. In *Proteomic Profiling*. Humana Press, New York, NY. 153-165.

Osman, M. A., Reid, P., Weber, C. W. (2003). The effect of feeding Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) proteinase inhibitors on the growth and pancreas of young mice. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(3), 111-115.

Pashazadeh-Panahi, P., Hasanzadeh, M. (2019). Revolution in biomedicine using emerging of picomaterials: A breakthrough on the future of medical diagnosis and therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 120, 109484

Pearson, A. J., Gallagher, E. S. (2019). Overview of Characterizing Cancer Glycans with Lectin-Based Analytical Methods. In: Haznadar, M. (eds). *Cancer Metabolism. Methods in Molecular Biology*, 1928, 389-408. Humana Press, New York, NY.

Pervin, M., Koyama, Y., Isemura, M., Nakamura, Y. (2015). Plant lectins in therapeutic and diagnostic cancer research. *Int. Journal Plant Biology Research*, (3), 1030-1035.

Peumans, W. J., Van Damme, E. J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109(2), 347.

- Pierobon, P., Cappello, G. (2012). Quantum dots to tail single bio-molecules inside living cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(2), 167-178.
- Pinaud, F., Clarke, S., Sittner, A., Dahan, M. (2010). Probing cellular events, one quantum dot at a time. *Nature Methods*, 7(4), 275.
- Poiroux, G., Barre, A., van Damme, E. J., Benoist, H., Rougé, P. (2017). Plant Lectins Targeting O-Glycans at the Cell Surface as Tools for Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1232.
- Progatzky, F., Dallman, M. J., Celso, C. L. (2013). From seeing to believing: labelling strategies for in vivo cell-tracking experiments. *Interface Focus*, 3(3), 20130001.
- Rashid, M. A., Khatib, F., & Sattar, A. (2015). Protein preliminaries and structure prediction fundamentals for computer scientists. *arXiv preprint arXiv:1510.02775*.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., & Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*, 377(1), 159-169.
- Ribeiro, A. C., Ferreira, R., Freitas, R. (2018). Plant Lectins: Bioactivities and Bioapplications. In *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier. 58, pp. 1-42.
- Ribeiro, A., Monteiro, S., Carrapiço, B., Ferreira, R. (2014). Are vicilins another major class of legume lectins. *Molecules*, 19(12), 20350-20373.
- Robinson, A., Fang, J. M., Chou, P. T., Liao, K. W., Chu, R. M., & Lee, S. J. (2005). Probing Lectin and Sperm with Carbohydrate-Modified Quantum dots. *ChemBioChem*, 6(10), 1899-1905.

Santos B. S., Cabral P. E., Fontes A., Correia M. T. S. (2019). Evaluating the glyco-phenotype on breast cancer tissues with Quantum dots-Cramoll lectin conjugates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 302-308.

Santos, B. S., de Farias, P. M., de Menezes, F. D., de C. Ferreira, R., Júnior, S. A., Figueiredo, R. C., Severino A., Júnior Regina C. B. Q., Carvalho L. B. J., Beltrão, E. I. (2006). CdS-Cd (OH) 2 core shell Quantum dots functionalized with Concanavalin A lectin for recognition of mammary tumors. *Physica Status Solidi c*, 3(11), 4017-4022.

Saran, A. D., Sadawana, M. M., Srivastava, R., & Bellare, J. R. (2011). An optimized quantum dot-ligand system for biosensing applications: Evaluation as a glucose biosensor. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 384(1-3), 393-400.

Shang, L., Cheng, Y., & Zhao, Y. (2017). Emerging droplet microfluidics. *Chemical reviews*, 117(12), 7964-804

Sharon, N., Lis, H. (1990). Legume lectins a large family of homologous proteins. *The FASEB Journal*, 4(14), 3198-3208.

Shi, Z., An, N., Zhao, S., Li, X., Bao, J. K., Yue, B. S. (2013). In silico analysis of molecular mechanisms of legume lectin-induced apoptosis in cancer cells. *Cell Proliferation*, 46(1), 86-96.

Singh, R. S., Walia, A. K. (2018). Lectins from red algae and their biomedical potential. *Journal of Applied Phycology*, 30(3), 1833-1858.

Sitohy, M., Doheim, M., Badr, H. (2007). Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian (*Pisum sativum*) seeds. *Food Chemistry*, 104(3), 971-979.

- Sivaji, N., Suguna, K., Surolia, A., & Vijayan, M. (2019). Structural biology of plant lectins and macromolecular crystallography in India. *Current Science*, 116(9), 1490-1505.
- Sperling, R. A., & Parak, W. J. (2010). Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1915), 1333-1383.
- Tenório, D. P., Andrade, C. G., Cabral Filho, P. E., Sabino, C. P., Kato, I. T., Carvalho Jr, L. B., Alves S M., Ribeirod S., Fontes A. 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.
- Torres-Arteaga, I. T., Guillen, J. C., Olaya, E. M., Gasca, T. G., Zaragoza, M. V. Á., García-Santoyo, V., Torres-Castillo JA, Aguirre C Phinney B., Blanco-Labra, A. (2016). Characterization of two non-fetuin binding lectins from Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) seeds with differential cytotoxicity on colon cancer cells. *J. Glycobiology*, 5, 117.
- Ueno, T., Toi, M., Saji, H., Muta, M., Bando, H., Kuroi, K., Koike M, Inadera H Matsushima, K. (2000). Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 6(8), 3282-3289.
- Valadez-Vega, C., Guzmán-Partida, A. M., Soto-Cordova, F. J., Álvarez-Manilla, G., Morales-González, J. A., Madrigal-Santillán, E., ... Becerril-Flores, M. A. (2011). Purification, biochemical characterization, and bioactive properties of a lectin purified from the seeds of white tepary bean (*Phaseolus acutifolius* variety *latifolius*). *Molecules*, 16(3), 2561-2582.

- Van Damme, E. J. (2014). History of plant lectin research. In *Lectins*. Humana Press, New York, NY. (pp. 3-13).
- Van Damme, E. J. (2020). Purification of GNA-Related Lectins from Natural Sources. In *Lectin Purification and Analysis*. Humana, New York, NY. 413-419.
- Van Damme, E. J., Lannoo, N., Fouquaert, E., Peumans, W. J. (2003). The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins. *Glycoconjugate Journal*, 20(7-8), 449-460.
- Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. A. (2004). Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*, 44(4), 385-403.
- Vijayan, M., y Chandra, N. (1999). Lectins. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6), 707-714.
- Walker MJ. 1994. *Methods in Molecular Biology. Basic Protein and Peptide Protocols*. (32), 120-126.
- Wang, J. H., Li, Y. Q., Zhang, H. L., Wang, H. Q., Lin, S., Chen, J., Zhao. Y. D., Luo, Q. M. (2010). Bioconjugation of concanavalin and CdTe Quantum dots and the detection of glucose. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 364(1-3), 82-86.
- Wang, L. X., Amin, M. N. (2014). Chemical and chemoenzymatic synthesis of glycoproteins for deciphering functions. *Chemistry & Biology*, 21(1), 51-66.
- Welch, C. J., Talaga, M. L., Kadav, P. D., Edwards, J. L., Bandyopadhyay, P., Dam, T. K. (2020). A capture and release method based on noncovalent ligand cross-linking and facile filtration for purification of lectins and glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 295(1), 223-236.

- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101), 368-373.
- Xiong, J. (2006). Protein Structure Basics. In *Essential Bioinformatics*. Cambridge: Cambridge University Press. United Kingdom. pp. 173-186.
- 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.
- Yau, T., Dan, X., Ng, C. C. W., Ng, T. B. (2015). Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules*, 20(3), 3791-3810.
- Zachara, N. E., Hart, G. W. (2004). O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1673(1-2), 13-28.
- Zhang, H., Zhang, L., Liang, R. P., Huang, J., & Qiu, J. D. (2013a). Simultaneous determination of concanavalin A and peanut agglutinin by dual-color Quantum dots. *Analytical Chemistry*, 85(22), 10969-10976.
- Zhang, J., Yan, S., Yuan, D., Alici, G., Nguyen, N. T., Warkiani, M. E., Li, W. (2016). Fundamentals and applications of inertial microfluidics: a review. *Lab on a Chip*, 16(1), 10-34.
- Zhang, M., Liu, H., Chen, L., Yan, M., Ge, L., Ge, S., Yu, J. (2013b). A disposable electrochemiluminescence device for ultrasensitive monitoring of K562 leukemia cells based on aptamers and ZnO@ carbon Quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 79-85.
- Zhang, Y., Park, K. Y., Suazo, K. F., Distefano, M. D. (2018). Recent progress in enzymatic protein labelling techniques and their applications. *Chemical Society Reviews*, 47(24), 9106-9136.

Zhang, Yanjie, (2011) "Surface functionalization of Quantum dots for biotechnological applications" Graduate Theses and Dissertations. 10266.

<https://lib.dr.iastate.edu/etd/10266>

Zhao, J., He, S., Tang, M., Sun, X., Zhang, Z., Ye, Y., Cao X., Sun, H. (2019). Low-pH induced structural changes, allergenicity and in vitro digestibility of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris L.*). Food Chemistry (283), 183-190.

Zhelev Z, Hideki O, Rumiana B, Rajan J, Satoshi F, Toshimi N. (2005) Fabrication of quantum dot–lectin conjugates as novel fluorescent probes for microscopic and flow cytometric identification of leukemia cells from normal lymphocytes. Chemical Communications, (15), 1980-1982.

Dirección General de Bibliotecas UAQ