



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

**BIOACCESIBILIDAD Y PERMEABILIDAD INTESTINAL *IN VITRO* DE UNA
LECTINA RECOMBINANTE DE FRIJOL TEPARI (*Phaseolus acutifolius*)
UTILIZANDO EL ENSAYO DE INTESTINO INVERTIDO.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctora en Ciencias Biológicas

PRESENTA

M. en C. Lineth Juliana Vega Rojas

DIRIGIDO POR

Dra. Margarita Teresa De Jesús García Gasca

Querétaro, Qro, Mayo de 2021



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

**BIOACCESIBILIDAD Y PERMEABILIDAD INTESTINAL *IN VITRO* DE UNA
LECTINA RECOMBINANTE DE FRIJOL TEPARI (*Phaseolus acutifolius*)
UTILIZANDO EL ENSAYO DE INTESTINO INVERTIDO.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctora en Ciencias Biológicas

PRESENTA

M. en C. Lineth Juliana Vega Rojas

DIRIGIDO POR

Dra. Margarita Teresa De Jesús García Gasca

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Presidente

Dr. Alejandro Blanco Labra
Secretario

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Sinodal

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez
Sinodal

Dr. Konisgmar Escobar García
Sinodal

Centro Universitario, Querétaro, Qro
Mayo 2021
México

RESUMEN

Las lectinas del frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) exhiben efectos biológicos diferenciales *in vitro* e *in vivo*, pero sus interacciones gastrointestinales y con el proceso de digestión aún no se han evaluado. Este trabajo tuvo como objetivo determinar la bioaccesibilidad y permeabilidad intestinal de la rTBL-1 de frijol Tépari mediante un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro/ ex vivo*. Se desarrolló un anticuerpo policlonal para detectar selectivamente rTBL-1 mediante Western blot (WB) y análisis inmunohistoquímico. No fue posible identificar lectina recombinante integra en un análisis *in vivo*, por lo que se realizó un ensayo *in vitro/ex vivo*. Se confirmó la viabilidad del saco intestinal invertido hasta los 60 min, donde la bioaccesibilidad de las proteínas, el coeficiente de permeabilidad aparente y la relación de flujo mostraron digestión y absorción parcial de rTBL-1. Los ensayos de inmunotransferencia sugirieron internalización de rTBL-1 ya que la lectina se detectó en la fracción digestible. El ensayo inmunohistoquímico detectó la presencia de rTBL-1 en el lado apical del intestino delgado, potencialmente debido a la interacción con la membrana celular intestinal. Las interacciones *in silico* entre rTBL-1 y algunos sacáridos o derivados mostraron una alta afinidad de unión al ácido siálico (-6.70 kcal/mol) y N-acetilglucosamina (-6.10 kcal / mol). El análisis UHPLC-ESI-QTOF /MS mostró la presencia de rTBL-1 en el contenido gástrico y la fracción no digerible después de las condiciones de simulación intestinal. Los resultados indicaron que rTBL-1 resistió parcialmente las condiciones digestivas e interactuó con la membrana intestinal, mientras que su digestión permitió la absorción o internalización de la proteína o los péptidos derivados. Es necesario realizar una purificación adicional de las muestras de digestión para identificar la proteína rTBL-1 intacta y los péptidos digeridos para evaluar sus efectos fisiológicos.

Palabras clave: frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*), bioaccesibilidad, permeabilidad aparente, lectina recombinante, proceso gastrointestinal *in vitro/ ex vivo*, ensayo de intestino invertido

SUMMARY

Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) lectins exhibit differential *in vitro* and *in vivo* biological effects, but their gastrointestinal interactions and digestion have not yet been assessed. This work aimed to determine the bioaccessibility and intestinal permeability of a Tepary bean lectin (rTBL-1) through an *in vitro/ex vivo* gastrointestinal digestion model. A polyclonal antibody was developed to selectively detect rTBL-1 by Western blot (WB) and immunohistochemical analysis. It was not possible to identify whole recombinant lectin in analysis *in vivo*. Everted gut sac viability was confirmed until 60 min, where protein bioaccessibility, apparent permeability coefficient, and efflux ratio showed rTBL-1 partial digestion and absorption. Immunoblot assays suggested rTBL-1 internalization since the lectin was detected in the digestible fraction. The immunohistochemical assay detected rTBL-1 presence at the apical side of the small intestine, potentially due to the interaction with the intestinal cell membrane. The *in-silico* interactions between rTBL-1 and some saccharides or derivatives showed high binding affinity to sialic acid (-6.70 kcal/mol) and N-acetylglucosamine (-6.10 kcal/mol). UHPLC-ESI-QTOF/MS analysis showed rTBL-1 presence in the gastric content and the non-digestible fraction after intestinal simulation conditions. The results indicated that rTBL-1 partially resisted the digestive conditions and interacted with the intestinal membrane, whereas its digestion allowed the absorption or internalization of the protein or the derivative peptides. However, it was not detected in serum. Further purification of digestion samples should be conducted to identify intact rTBL-1 protein and digested peptides to assess their physiological effects.

Keywords: Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), bioaccessibility, apparent permeability, recombinant lectin, *in vitro/ ex vivo* gastrointestinal process, *ex vivo* everted intestine assay

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me brindo por medio de una beca (573058).

A la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado en un programa de calidad.

A mi comité tutorial por siempre ser propositivo para poder sacar adelante este proyecto. Al Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada LAVIS UAQ-UNAM, con financiamiento CONACyT a Laboratorios Nacionales.

A la Dra. Teresa García Gasca por ser mi directora de tesis, por su apoyo incondicional durante estos 4 años, por sus recomendaciones y comentarios los cuales me ayudaron a sacar adelante este trabajo, por ser en muchas oportunidades más que mi jefa, toda mi admiración para usted porque más que ser una investigadora completa, es una mujer integra, sensible, abierta al diálogo y muy poderosa.

Al Dr. Juan Mosqueda por brindarme un lugar en su laboratorio, por todo el tiempo brindado durante estos años, por compartir su conocimiento en inmunología y biología molecular, por sus revisiones continuas y comentarios oportunos, por retarme cada vez más, por darme una visión diferente respecto a mis estudios de doctorado, por darme la oportunidad de conocer más que a uno de mis jefes a un excelente ser humano.

Al Dr. Diego Josimar por compartir y enseñar su conocimiento teórico y experimental, por tenerme paciencia, por ser mi amigo y escuchar mis risas y quejas cuando algo no salía.

A los técnicos el Josué López y Elizabeth Mendiola por su apoyo en el laboratorio y hacer más fácil la realización de los experimentos.

Al Dr. Iván Luzardo y la Dra. Dulce Palmerin por aceptar colaborar conmigo, por compartir sus conocimientos en sus respectivas áreas, por siempre dar alternativas para mejorar y sobre todo por su compromiso, entusiasmo y siempre estar abiertos a escuchar mis comentarios.

A mis amigos Guisel Rivera, Natalia Rincón, Edwin Esaú, Diego Jiménez, Ana María Jiménez, Alexa Rincón, Roberto Molina, Lybia Alejandra por estar presente en este largo proceso, por ser testigos de mis caídas y mis aciertos, por siempre dar palabras de apoyo, por recordarme que si puedo lograrlo y que lo logré.

Y no los menos importantes a mi familia, a mi señor padre Sergio Vega y mi madre Azucena Rojas por siempre estar al pendiente, por siempre estar orgulloso de todo el esfuerzo y trabajo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE CUADROS	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Lectinas y su aplicación en biomedicina	3
2.2 Efecto biológico de lectinas de frijol Tépari	6
2.3 Obtención lectinas de frijol Tépari mediante métodos biotecnológicos	12
2.4 Farmacocinética de proteínas terapéuticas	17
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. HIPÓTESIS.....	28
V. OBJETIVOS.....	28
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
6.1 Producción y purificación de la lectina recombinante (rTBL-1).....	29
6.2 Producción del anticuerpo policlonal anti-rTBL.....	30
6.3 Experimento <i>In vivo</i>	32
6.4 Digestión gastrointestinal <i>in vitro/ex vivo</i>	33
6.4.1 Evaluación de viabilidad del tejido intestinal.....	35
6.4.2 Evaluación de la bioaccesibilidad.....	36
6.4.3 Coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app})	37
6.5 Electroforesis desnaturizante de proteínas (SDS- PAGE) y Western blot	37
6.6 Análisis de la rTBL-1 y de las muestras digeridas por UHPLC-ESI-QTOF/MS.....	38
6.7 Análisis inmunohistoquímico.....	39
6.8 Docking Molecular.....	40
6.9 Análisis estadístico.....	41

VII. RESULTADOS	42
7.1 Generación de un anticuerpo policlonal (Anti-rTBL-1)	42
7.2 Experimento <i>in vivo</i>	43
7.2.1 Perfil de electroforesis y western blot de sueros de rata administradas con rTBL-1	43
7.2.2 Geles de electroforesis y western blot de raspado intestinal y heces de ratas administradas con rTBL-1	44
7.3. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	45
7.3.1 Evaluación de la viabilidad del tejido intestinal	45
7.3.2 Bioaccesibilidad y permeabilidad intestinal de rTBL-1	47
7.4 Perfil electroforético y análisis de western blot de rTBL-1 a través de la digestión <i>in vitro/ex vivo</i>	48
7.5 Análisis de rTBL-1 y muestras digeridas por medio de UHPLC-ESI-QTOF/MS	50
7.6 Análisis inmunohistoquímico	52
7.7 Evaluación <i>in silico</i> de la interacción rTBL-1 con carbohidratos o derivados del intestino delgado	53
VIII. DISCUSION	55
IX. CONCLUSIONES	61
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Perfiles de purificación de las dos principales fracciones enriquecidas de proteínas de frijol Tépari.....	7
Figura 2. Efecto citotóxico de una fracción rica en lectinas (FCL) sobre células transformadas y no transformadas	8
Figura 3. Efecto de la una fracción rica en lectinas (FCL) sobre la proliferación de células cancerosas.....	9
Figura 4. Histopatologías del íleon después del tratamiento con FCL	10
Figura 5. Alineación múltiple de la secuencia amplificada (rTBL-1), la secuencia deducida por de lectinas de <i>P. acutifolius</i> (Número de acceso: AAA82181.1) y secuencias de péptidos de LA y LB de TBFL (<i>P. acutifolius</i>).....	13
Figura 6. Interacciones de estructura, N-glicosilación e interfaz en el tetrámero de rTBL-1	15
Figura 7. Alineamiento entre las secuencias de rTBL-1 y leucoaglutininas de leguminosas.....	16
Figura 8. Actividad aglutinante de heces de ratas después de una única administración con FCL (50 mg/kg).....	25
Figura 9. Esquema de inmunización con liofilizado de lectina recombinante	31
Figura 10. Esquema de administración intragástrica de lectina recombinante (rTBL-1) en una única dosis.....	33
Figura 11. Esquema general del proceso de digestión gastrointestinal <i>in vitro/ex vivo</i>	34
Figura 12. Títulos totales de un conejo inmunizado con Lectina	42
Figura 13. Perfil de electroforesis con tinción con Coomassie y Schiff de sueros de rata después de una única dosis de administración de rTBL-1	43
Figura 14. Western blot de sueros de rata administradas con una única dosis de rTBL-1.....	44
Figura 15. Perfil de electroforesis y western blot de raspado intestinal y heces de rata administradas con una única dosis de rTBL	45
Figura 16. Integridad del yeyuno invertido de ratas Sprague-Dawley durante la absorción en el intestino delgado	46
Figura 17. Imágenes representativas de hematoxilina y eosina (H&E) durante la incubación (30, 60 y 90 min).....	47
Figura 18. Efectos de la digestión simulada <i>in vitro/ex vivo</i> en rTBL-1.....	48

Figura 19. Perfil electroforético y western blot para el efecto gastrointestinal sobre rTBL-1	49
Figura 20. Espectro de masas de lectina recombinante (rTBL-1).....	50
Figura 21. Espectrometría de masas para rTBL-1 y muestras de la digestión gastrointestinal.....	51
Figura 22. Imágenes de inmunohistoquímicas de yeyuno invertido de rata después de la incubación con rTBL-1.	52
Figura 23. Interacciones potenciales in silico entre rTBL-1 y carbohidratos o derivados intestinales.....	54

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Peso molecular como factor determinante del mecanismo de eliminación de péptidos y proteínas	20
Cuadro 2. Métodos bioanalíticos aplicados para el estudio de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de proteínas terapéuticas	21
Cuadro 3. Modelos para evaluar absorción intestinal	23
Cuadro 4. Energía libre de unión entre rTBL-1 y cada ligando. Manosa, N acetil-glucosamina, ácido siálico, N acetil-galactosamina y glucosa	53

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

I. INTRODUCCIÓN

Las lectinas se han investigado debido a su valor como agentes fitoterapéuticos ya que proporcionan beneficios para la salud (Liu y col., 2010; Singh y col., 2016). En particular, las lectinas del frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) han ganado interés debido a su menor grado de toxicidad que las lectinas de otras leguminosas (Ferriz-Martínez y col., 2015). Sin embargo, pueden ocurrir potenciales efectos adversos derivados de su consumo, sugiriendo la necesidad de profundizar su comportamiento digestivo a lo largo del tracto gastrointestinal.

La fracción concentrada en lectinas de frijol Tépari (FCL), obtenida mediante cromatografía de exclusión de peso molecular, ha mostrado efectos citotóxicos diferenciales sobre células cancerígenas (García-Gasca y col., 2012). La FCL administrada vía intragástrica es capaz de inhibir lesiones premalignas tempranas, lo que sugiere su potencial efecto terapéutico contra cáncer colorrectal (Moreno-Celis y col., 2017). Induce la muerte de las células humanas de cáncer colorrectal HT-29 a través de la inducción de apoptosis y provoca cambios en el ciclo celular como el arresto de la fase G₀/G₁. La apoptosis está relacionada con la activación de la caspasa 3 y la fosforilación de p53 (Moreno-Celis y col., 2020). Experimentos *in vivo* reportan que la FCL activa el sistema inmune al inducir cambios en la relación linfocitos-granulocitos, elevando los niveles de IL-6 y NF- κ B y aumentando también el número de folículos linfoides en las placas de peyer (Alatorre-Cruz y col., 2018). No obstante, se reporta también atrofia intestinal, hipertrofia pancreática y disminución de la ganancia de peso corporal, los animales, sin embargo, se recuperaron parcialmente después de un período de reposo de 2 semanas. Además, la FCL también puede afectar negativamente a la integridad intestinal, disminuyendo la digestibilidad de las proteínas y cambiando la distribución de ocludina (Pita-López y col., 2020).

Debido al bajo rendimiento, largo proceso y altos costos para obtener la FCL, en nuestro laboratorio se ha desarrollado un método de producción de una lectina recombinante (rTBL-1) expresada en levaduras (*Pichia pastoris*) (Martínez-Alarcón y col., 2020). Esta lectina tiene similitud estructural y funcional con la lectina nativa (Martínez-Alarcón y col., 2019; Torres Arteaga y col., 2016), y también presenta efectos citotóxicos similares (Palmerín-Carreño y col., 2021).

La actividad de las lectinas depende de su degradación por el tracto gastrointestinal, por lo que resulta importante determinar su bioaccesibilidad. Los modelos *ex vivo* ofrecen ventajas competitivas de bajo costo, como el uso de órganos completos o perfundidos a través de las secciones intestinales, lo que permite estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos de compuestos biológicos específicos (Alam y col., 2012; Antunes y col., 2012). Del mismo modo, estudios *in vivo* también se han desarrollado para determinar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de moléculas bioactivas administradas por diferentes vías (Anupama y col., 2017; Barton y col., 2016). La mayoría de estos procedimientos se pueden combinar con métodos analíticos como HPLC para identificar y cuantificar metabolitos biológicamente activos derivados del proceso digestivo (Aguillón-Osma y col., 2019; Luzardo-Ocampo y col., 2020). Específicamente para las leguminosas, los péptidos biológicamente activos generados durante la digestión gastrointestinal *in vitro* del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) se han identificado mediante electroforesis y espectrometría de masas (MS) (Luna Vital y col., 2014; Tagliazucchi y col., 2015). De manera similar, se han generado e identificado péptidos del proceso digestivo de las proteínas de la leche mediante RP-HPLC-MS/MS (Picariello y col., 2015).

Considerando que los efectos adversos más significativos de las lectinas están relacionados con su actividad antinutricia, y que es necesario conocer parámetros farmacocinéticos de la rTBL-1, este trabajo se enfocó en evaluar la bioaccesibilidad y la permeabilidad intestinal de rTBL-1 mediante un procedimiento de digestión gastrointestinal *ex vivo/in vitro*.

II. ANTECEDENTES

2.1 Lectinas y su aplicación en biomedicina

Las lectinas son un grupo de proteínas termolábiles de origen no-inmune que se pueden enlazar de forma específica y reversible a carbohidratos, ya sean libres o forman parte de estructuras más complejas en la membrana celular en forma de glicoproteínas, glicolípidos y polisacáridos (Sharon, 2007; Sharon y Lis, 2002). Son capaces de aglutinar de manera específica células como linfocitos, eritrocitos, espermatozoides, plaquetas, bacterias y células tumorales y pueden inducir mitosis y tener efectos citotóxicos en los linfocitos (Ferriz-Martinez y col., 2010). Se encuentran ampliamente distribuidas en virus, bacterias, hongos, plantas y vertebrados superiores (Hernández y col., 2005). Sus actividades biológicas son muy variadas, dependiendo de los organismos: juegan un papel determinante para la especificidad del reconocimiento del huésped en procesos simbióticos entre leguminosas y bacterias del género (Sharon y Lis, 2004), determinan la patogenicidad de bacterias y de parásitos, son conocidas como adhesinas ya que su principal función está asociada a la adhesión y procesos de colonización. En animales intervienen en el control de proliferación y apoptosis, reconocimiento y diferenciación celular, regulación de migración y adhesión celular, endocitosis y translocación intracelular de glicoproteínas fagocitosis (Sharon, 2007; Sharon y Lis, 2004).

En los últimos años han sido ampliamente utilizadas para la purificación de proteínas, glicoproteínas, enzimas y de otras lectinas mediante cromatografía de afinidad, gracias a la capacidad de reconocer moléculas de manera específica mediante uniones a carbohidratos (Hernández Díaz y col., 1999). Las glicosilaciones aberrantes de proteínas están implicadas en muchas enfermedades por lo que los ensayos de inmunoabsorción ligados a lectinas (LISA) son técnicas ampliamente utilizadas para analizar cambios en las glicosilaciones (Li y col., 2013). Se consideran herramientas valiosas en el campo de la genética, biomedicina e inmunología como por ejemplo (Hernández Díaz y col., 1999):

- Evaluación de la producción de citocinas (interferón e interleucinas)
- Determinación de fenómenos de la respuesta inmune (inmunosupresión)
- Relación entre virus patógenos y la resistencia a ellos
- Evaluación de terapias antirretrovirales
- Efectos de la nutrición en la proliferación de linfocitos
- Detección de anomalías cromosómicas
- Caracterización e identificación de grupos sanguíneos

Las lectinas aisladas de leguminosas son la familia de lectinas vegetales más estudiada, generalmente se encuentran constituidas por dos o cuatro subunidades idénticas de 25 a 30 kDa, cada una de las sub-unidades contiene un sitio de unión para iones metálicos Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} (Hernández y col., 2005). En la planta pueden tener diversas funciones: participan en las interacciones entre las bacterias fijadoras de nitrógeno con la raíz de las plantas de leguminosas, tienen efectos protectores contra la acción patogénica de ciertos microorganismos como los nemátodos mediante la acumulación de lectinas en las semillas y estructura de la planta (Freed, 1999; Merritt y col., 1994). Las lectinas vegetales suelen clasificarse por su especificidad hacia monosacáridos, oligosacáridos y estructura molecular (Rüdiger, 1996). Entre las lectinas de origen vegetal más estudiadas están la fitohemaglutinina (PHA) proveniente del frijol común (*Phaseolus vulgaris*), Concanavalina A, lectinas de muérdago (*Viscum*), aglutinina de germen de trigo (WGA) (Lagarda-Díaz y col., 2017; Lee y col., 2010).

Lectinas como la de semillas de ricino pueden ser tóxicas en células de mamíferos, tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que pueden reducir el crecimiento e interferir con la absorción de nutrientes, provocar cambios atróficos en el timo y el bazo y en altas concentraciones pueden ser letales (Santoro y col., 1997; Sharon, 1998). Muchos de los efectos tóxicos de las lectinas son dependientes de su interacción con la flora intestinal (Rhodes, 1999) ya que son resistentes a la digestión tanto gástrica como intestinal, lo que provoca lesiones e interferencia con la absorción de nutrientes (Lewis, 1984). Además, las lectinas de la dieta pueden ser internalizadas y circular

de manera intacta en la sangre periférica (Rhodes, 1999). Se ha reportado que las rutas de administración de las lectinas juegan un papel importante en su toxicidad

Los efectos antitumorales *in vitro* e *in vivo* de las lectinas vegetales se asocian con su efecto sobre el crecimiento, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis (De Mejía y Prisecaru, 2005). Entre las alteraciones que sufren las células cancerígenas están los cambios en los patrones de glicosilación de membrana (Nishimura y col., 2004). Muchos estudios han mostrado una fuerte correlación entre ciertos modelos de unión a lectinas y su acción biológica en varios tumores. (Fik y col., 2001) describieron el efecto *in vitro* de las lectinas sobre células normales y cancerígenas.

Una de las lectinas con mayor número de estudios realizados es la lectina de Muérdago *Viscum álbum* (VCA) ya que se ha observado una disminución en los daños producidos por cancerígenos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los efectos son representativos tanto en la proliferación celular, así como en la inducción de apoptosis (Lyu y col., 2002; Maier y Fiebig, 2002). Los efectos de las lectinas sobre líneas celulares transformadas son altamente específicos ya que dependen tanto de la fuente de obtención de la lectina como de la línea celular tratada (Ferriz-Martinez y col., 2010). La lectina del trigo (WGA) ha probado ser altamente tóxica en estudios *in vitro* sobre las células de carcinoma pancreático humano, en las cuales se ha observado la internalización de la lectina. La exposición a la WGA indujo la condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y liberación del DNA, la cual es consistente con apoptosis (De Mejía y Prisecaru, 2005).

En un estudio sobre tres líneas celulares de cáncer colorectal (LoVo, HCT-15 y SW837) se utilizaron lectinas de *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Griffonia simplicifolia* (GSA), Con-A, *Triticum vulgare* (WGA) y *Arachis hypogea* (PNA). Se pudo observar que la proliferación celular disminuyó en función de la concentración y el tipo de lectinas, en el caso de PHA se reportó que a una concentración de 100 µg/mL, es capaz de inducir la muerte del 75% de células de cáncer de colon de la línea HCT-15, mientras que a esta misma concentración únicamente indujo el 25% de muerte en células de cáncer de colon de la línea SW837 (Kiss y col., 1997).

2.2 Efecto biológico de lectinas de frijol Tépari

El frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) es una leguminosa que pertenece a la familia de las *Fabaceae*, posee resistencia a condiciones adversas de clima y suelo, como son: tolerancia a altas concentraciones salinas en el suelo, estrés hídrico y a ciertas plagas de insectos y de microorganismos (Camacho Barrón y González de Mejía, 1998). Es una fuente importante de proteínas y a pesar de que tiene baja disponibilidad de aminoácidos azufrados, su contenido de proteína es ligeramente mayor a los reportados en otras variedades de frijol cultivadas en condiciones ecológicas menos adversas. Sin embargo, presenta compuestos antinutricios como lectinas e inhibidores de proteasas que, aunque presenta concentraciones relativamente altas en el extracto crudo desaparecen en su mayoría después de la cocción, por lo que al ser consumidos no constituyen un riesgo para la salud, no obstante se puede encontrar alguna actividad residual cuando no son tratadas con métodos de cocción adecuados y a tiempos cortos. Por otro lado, los factores antinutricionales residuales en la dieta humana pueden ser de importancia si éstos son capaces de sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal para ejercer su actividad biológica (Lajolo y Genovese, 2002; Rhodes, 1999).

Lectinas del frijol Tépari son muy tóxicas en su estado crudo por vía oral ya que provocan pérdida de peso, proporción de eficiencia negativa de proteínas, pobre digestión de proteínas y la muerte de ratas y ratones al cabo de 10 días. Sin embargo, al introducir a la autoclave un extracto crudo de proteína, se observó la pérdida de la toxicidad por vía intraperitoneal, del mismo modo, se ha sugerido que la administración oral es menos tóxica que por vía intraperitoneal (Osman y col., 2003). La dosis letal media (DL_{50}) observada para la lectina de frijol Tépari administrada por vía intraperitoneal a ratones CD-1, fue de 1100 y 1120 mg/kg de peso corporal para machos y hembras, respectivamente. En comparación con otras leguminosas como la ricina, con una DL_{50} de 0.028 mg/kg, se observa que la lectina de frijol Tépari presenta una toxicidad relativamente baja, por lo tanto, se propone pueda ser utilizada en estudios que pueden potencialmente conducir a terapias contra el cáncer (Reynoso-Camacho y col., 2003).

En nuestro grupo de trabajo, (Torres Arteaga y col., 2016) estudiaron la composición de una fracción concentrada de lectinas (FCL) de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) purificada por medio de una columna de exclusión de peso molecular. Se identificaron dos familias de lectinas (LA y LB) con pesos moleculares entre 28 y 36 kDa pero con actividades biológicas diferentes (Figura 1).

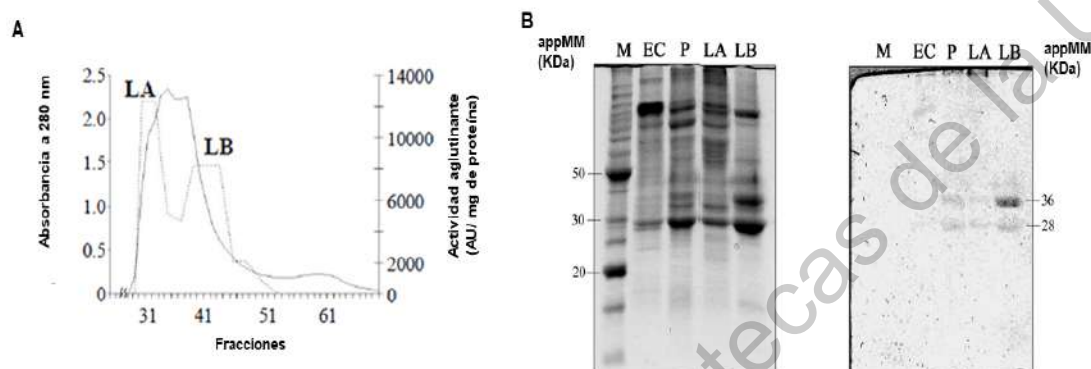


Figura 1. Perfiles de purificación de las dos principales fracciones enriquecidas de proteínas de frijol Tépari. A) Cromatografía de exclusión de peso molecular de fracciones de frijol Tépari o y actividad aglutinante. **B)** Geles de electroforesis SDS-PAGE de proteínas de frijol Tépari de los primeros pasos de purificación. M: marcador de peso molecular, EC: extracto crudo, P: proteínas precipitadas con sulfato de amonio. appMM: masa molecular aparente. LA y LB: picos con actividad aglutinante.

Solo las lectinas del pico A (LA) presentaron afinidad a eritrocitos tipo A. Las lectinas del pico B (LB) no presentaron diferencia en actividad aglutinante para eritrocitos tipo A+, B+, O+. En ensayos citotóxicos sobre células de cáncer HT-29 se demostró que la fracción de LB tiene un mayor efecto antiproliferativo comparado con LA (IC₅₀ 166 y 256 µg proteína/mL) respectivamente. Respecto a la caracterización estructural de las lectinas de frijol Tépari, se detectaron N-glicanos de alta manosa predominantemente manosa 6 considerando que se debe cumplir con el requisito de tener la secuencia consenso Asn-x-Ser/Thr para que se lleven a cabo las N-glicosilaciones (Demain y Vaishnav, 2009). De esta forma, se pudo predecir satisfactoriamente un solo sitio de glicosilación en la Asn-13.

Experimentos *in vitro* han mostrado que la FCL de frijol Tépari provoca efecto citotóxico diferencial entre células cancerígenas y no cancerígenas (Figura 2). Se

determinó el efecto antiproliferativo en función de la concentración (Figura 3) sobre líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, ZR-75-1), cérvix (HeLa, SiHa, y C33A) y colon (CaCo2). Las células más sensibles al efecto citotóxico fueron las células de cáncer de colon CaCo2 y cáncer de mama MCF-7 (García-Gasca y col., 2012). Del mismo modo, en células de cáncer de colon humano HT-29, la FCL provocó arresto del ciclo celular en G_0/G_1 y apoptosis mediante activación de caspasas, particularmente caspasa 3 y se observó un aumento en la fosforilación de p53 en la serina 46, que está muy involucrada en el proceso apoptótico (Moreno-Celis y col., 2020).

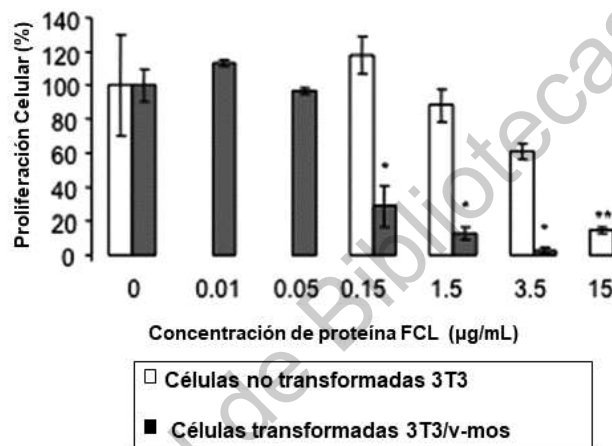


Figura 2. Efecto citotóxico de una fracción rica en lectinas (FCL) sobre células transformadas y no transformadas (Ferriz-Martinez y col., 2010; García-Gasca y col., 2012).

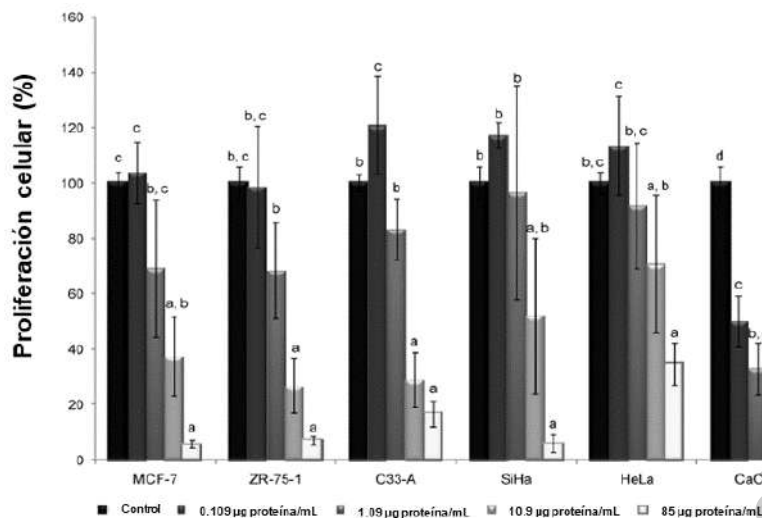


Figura 3. Efecto de la una fracción rica en lectinas (FCL) sobre la proliferación de células cancerosas (Ferriz-Martinez y col., 2010; García-Gasca y col., 2012).

Respecto a la toxicidad aguda y subcrónica, (López-Sánchez y col., 2010) estudiaron una fracción rica en lectinas de (FCL) y observaron que a una dosis de 50 mg/kg administrada a ratas Sprague Dawley vía intragástrica, presenta baja toxicidad aguda, mientras que las dosis mayores de 50 mg/kg de peso (300 y 2000 mg/kg de peso corporal) provocaron diarrea, letargo y piloerección dentro de las primeras 24 h, sin embargo, los animales se recuperaron en su totalidad después de las 48 h. No se observaron alteraciones macroscópicas ni diferencias en el peso de los órganos como colon, intestino delgado, hígado, riñones timo, bazo corazón y estómago, aunque se observó una disminución ($p \leq 0.05$) en el peso de los riñones para los grupos administrados con 50 y 300 mg con respecto al control. En el estudio de la toxicidad subcrónica con FCL se utilizó la dosis máxima sin efectos adversos (NOAEL) encontrada en el estudio de toxicidad aguda y dos dosis inferiores (5, 10, 50 mg/kg de peso). Se observó una disminución al séptimo día de consumo de alimento con la dosis más baja. No se observaron cambios significativos en colon, estómago, páncreas, hígado, bazo, timo, corazón y pulmones; el peso del intestino delgado y riñones presentó una disminución ($p \leq 0.05$) en el grupo de 5 mg/kg con respecto a los diferentes tratamientos, los marcadores bioquímicos de función renal, hepática, pancreática y el estado nutricional no mostraron alteraciones. Dichos

resultados sugieren que, a dicha concentración, la FCL podría ser utilizada en estudios contra cáncer.

En estudios preclínicos se ha observado que la FCL administrada vía intragástrica cada tercer día (6 semanas) a ratas Sprague Dawley, provocó disminución en el consumo de alimento en las primeras etapas de la administración reflejándose en la pérdida del 10% en la ganancia de peso corporal; sin embargo, se observó recuperación antes del final de la administración, lo que sugiere el efecto antinutricional de la FCL (Ferriz-Martínez y col., 2015). También se presentó aumento en la longitud del intestino igual que un adelgazamiento de las paredes intestinales, así como ensanchamiento de las vellosidades debido a la fusión de 2 o más vellosidades, dado que una vellosidad presenta en su base 2 o 3 criptas de Liberkühn, lo que sugiere atrofia intestinal (Figura 4) relacionada con la adhesión y obstrucción por parte de las lectinas en el tracto intestinal.

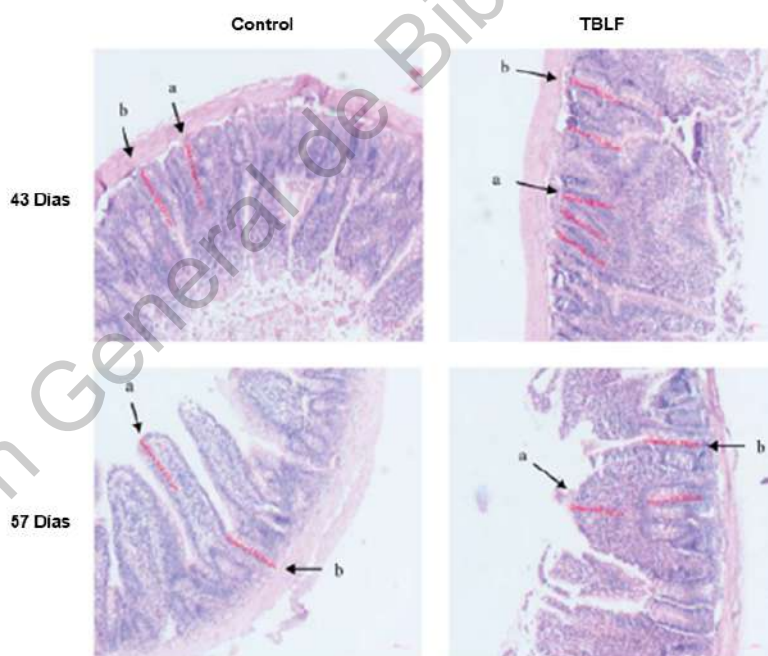


Figura 4. Histopatologías del íleon después del tratamiento con FCL. a) atrofia en las vellosidades. b) incremento en la altura de las criptas (Alatorre-Cruz y col., 2018).

Lo anterior se relaciona con disminución la digestibilidad ileal aparente de proteínas, mientras que la digestibilidad fecal aparente de proteínas disminuyó alrededor del 3% para grupo de la FCL. Se demostró que el consumo de agavinas previamente iniciar el tratamiento con la FCL disminuye los efectos adversos generados en el intestino y no se observó disminución en la ganancia de peso (Alatorre-Cruz y col., 2018). Del mismo modo, la FCL activó de forma diferencial células del sistema inmune a través del cambio de la relación linfocitos-granulocitos y también se observó un ligero aumento de la pulpa blanca esplénica al final del tratamiento. Además, se presentó incremento de IL-6, Nfκ-β y el número de folículos linfoides en las placas intestinales de Peyer (Alatorre-Cruz y col., 2018; Ferriz-Martínez y col., 2015).

Por otro lado, el estudio histopatológico del páncreas mostró un incremento en el tamaño del acino pancreático en las ratas administradas con la FCL. La presencia de vacuolas y contenido granuloso sugiere una hiperactividad del páncreas. Los efectos perjudiciales en el intestino delgado, en consecuencia, afectan a otros órganos digestivos como el páncreas. Se encontró una hipertrofia del acino pancreático exocrino, donde se secretan las enzimas digestivas. La presencia de vacuolas puede estar relacionada con un aumento exacerbado en la producción de enzimas pancreáticas, para compensar la atrofia del intestino y los problemas de digestión asociados con la administración de FCL (Alatorre-Cruz y col., 2018).

El efecto anticancerígeno de la FCL se probó en ratas Sprague Dawley tratadas con 1,2 dimetilhidrazina (DMH) y azoximetano (AOM)/dextrano sulfato sódico (DSS) como agentes inductores de cáncer de colon. La administración vía intragástrica de 50 mg/kg de peso de FCL disminuyó el número de lesiones premalignas de bajo grado de forma significativa ($p \leq 0.05$) provocadas por DMH o AOM/DSS, sin efecto sobre las lesiones de alto grado y neoplasias. La co-administración de AOM/DSS-FCL reveló p53 y PCNA en niveles basales, sugiriendo efecto antiproliferativo de la FCL, la apoptosis fue confirmada por incremento en la expresión del gen de caspasa

9, disminución de Bcl-2 y el incremento de proteínas de caspasa 3 y citocromo-c (Moreno-Celis y col., 2017).

2.3 Obtención lectinas de frijol Tépari mediante métodos biotecnológicos

La extracción y purificación de la FCL de frijol Tépari se ha llevado a cabo con el uso de estrategias convencionales que tienen bajo rendimiento a elevados costos (García-Gasca y col., 2012; Torres Arteaga y col., 2016). Por lo anterior, se probó, como primera opción, el sistema de secreción de raíces ya que esta alternativa podría aumentar el rendimiento y simplificar el procesamiento de purificación. Este sistema permite la expresión de proteínas en las especies originales, lo que garantiza el correcto plegamiento y el procesamiento postraduccional de proteínas complejas (Drake y col., 2009). Se propuso la producción de una cis-lectina por rizosecreción en plantas genéticamente modificadas (Martínez-Alarcón y col., 2019). Se utilizaron cebadores degenerados para la amplificación de los transcritos de frijol Tépari y los productos obtenidos se secuenciaron. Se determinó una secuencia de 831 nucleótidos que corresponde a una cadena polipeptídica de 277 aminoácidos. Esta secuencia tiene una alta identidad (97.83% de cobertura) con las dos secuencias parciales de lectinas de FCL (Lectina A y Lectina B) obtenidas a través de espectrometría de Masas (nano Lc-Ms/Ms) por (Torres Arteaga y col., 2016) y con la secuencia peptídica previamente deducida por (Mirkov y col., 1994) (Acceso No. AAA82181.1, <https://www.uniprot.org/uniprot/Q40750>). En la Figura 5 se puede observar con las flechas verdes cambios en 6 aminoácidos; en la posición 17 hay un cambio de P a A, en la posición 139 R por K, en la posición 180 GQ por VN, en posición 228 R por S y en la posición 239 T por S. Del mismo modo, se confirmó la presencia de una única glicosilación por medio de la tinción con reactivo de Schiff en el exudado de raíz de plantas de frijol Tépari genéticamente modificadas y también se observó una actividad aglutinante similar respecto a la FCL (11.95815 y 12.01859 AU/mg proteína). No obstante, las plántulas murieron muy jóvenes, debido posiblemente a efectos tóxicos de la propia lectina en los exudados radiculares (Martínez-Alarcón y col., 2019).

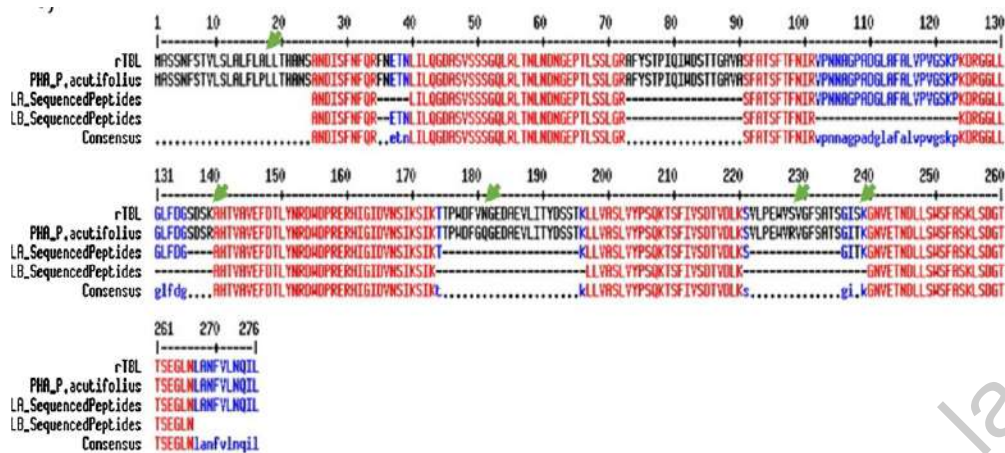


Figura 5. Alineación múltiple de la secuencia amplificada (rTBL-1), la secuencia deducida por de lectinas de *P. acutifolius* (Número de acceso: AAA82181.1) y secuencias de péptidos de LA y LB de TBFL (*P. acutifolius*). Los aminoácidos que coinciden en todas las secuencias están en rojo y que no coinciden se indican en negro y azul (Martínez-Alarcón y col., 2019).

La obtención heteróloga de proteínas podría facilitar el costo efectivo de la producción de lectinas bioactivas con fines farmacéuticos. Estos sistemas ofrecen rendimientos más altos en comparación a los mecanismos convencionales de purificación, reducen los costos, disminuyen el tiempo de obtención y proporcionan productos con propiedades más homogéneas y mejor definidas debido a que se tiene control y pleno conocimiento de la secuencia nucleotídica expresada, además permite el estudio de la relación secuencia-función por medio de mutagénesis dirigida (Araújo y col., 2015; Martínez-Alarcón y col., 2018). Los modelos más importantes que han sido propuestos en la producción heteróloga incluyen el uso de bacterias y levaduras. Cada modelo ofrece ventajas y desventajas que se deben considerar para cada proteína en particular (Martínez-Alarcón y col., 2018).

Saccharomyces cerevisiae ha sido la levadura más utilizada para la expresión de proteínas recombinantes. Sin embargo, en el caso de las glicoproteínas, existen múltiples inconvenientes asociados al empleo de este modelo, tales como la alta antigenicidad de sus glicosilaciones, la acumulación del producto dentro de vacuolas y citoplasma, el procesamiento incompleto de sus péptidos de señalización y bajo rendimiento (Martínez-Alarcón y col., 2018). Por lo tanto, *Pichia*

pastoris, puede ser considerada como la levadura más utilizada para la obtención de lectinas (PHA, Nictaba, ConA y frutalina) debido a que entre sus ventajas es no adicionar el residuo de α -1-3 manosa responsable de la alta naturaleza antigénica de las glicoproteínas secretadas por *S. cerevisiae* y, en su lugar, típicamente adiciona cadenas de Man8 GlcNAc2 y Man9 GlcNAc2 (Barnes y Thorner, 1986; Córdoba Ruiz y col., 2003; Romanos y col., 1992). No secreta altas cantidades de proteínas endógenas, por consiguiente, las proteínas foráneas secretadas por el cultivo son relativamente puras (Cereghino y Cregg, 2000). Además, el contenido de carbohidratos para las cadenas N-oligosacárido en *P. pastoris* parece ser semejante, al menos en tamaño, a los oligosacáridos de los organismos superiores (Lannoo y col., 2007).

En nuestro grupo de trabajo, (Martínez-Alarcón y col., 2020) utilizó *Pichia pastoris* como sistema heterólogo de producción de lectinas del frijol *Phaseolus acutifolius*, obteniendo un rendimiento de 316 mg/L. Los resultados indicaron que la lectina obtenida conserva su actividad biológica contra células de cáncer de colon HT-29 con una CL_{50} 2.47 ± 0.2 y 2.71 ± 0.47 $\mu\text{g/mL}$ para la lectina nativa y recombinante respectivamente). Posteriormente se observó que la lectina recombinante (rTBL-1) indujo el arresto del ciclo celular en la fase G_0/G_1 y disminuyó la fase S sobre células de cáncer de colon HT-29, con inducción de apoptosis de manera similar a la FCL de frijol Tépari, por lo que se considera que la rTBL-1 conserva la actividad biológica de las lectinas contenidas en la FCL. Fue posible determinar que uno de los mecanismos de acción de la rTBL-1 está relacionado con su interacción con EGFR, al igual que la activación de caspasa 3, fosforilación de p-53 (Dena Beltran, 2020, datos no publicados). Por otro lado, también se demostró que la rTBL-1 tiene características estructurales similares a la lectina nativa de frijol Tépari (LN) (Figura 6), que incluyen dos cationes divalentes (Ca^{2+} y Mn^{2+}), una única N-glicosilación, que se encuentra unida a la asparagina-13 (Martínez-Alarcón y col., 2020).

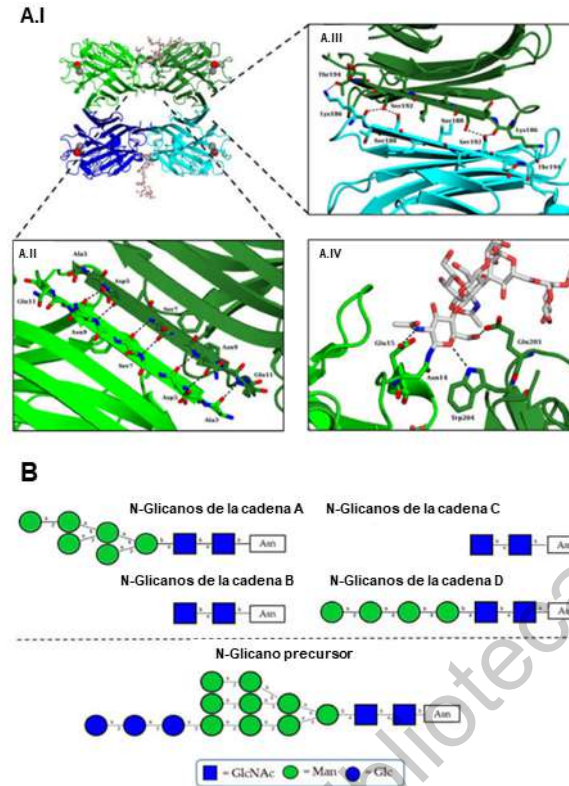


Figura 6. Interacciones de estructura, N-glicosilación e interfaz en el tetrámero de rTBL-1. **A.I)** Tetrámero de rTBL-1 coloreado por cadenas con cadenas A, B, C y D en verde claro, verde oscuro, azul oscuro y azul claro, respectivamente, con Ca^{2+} representado en esferas rojas y Mn^{2+} representado en esferas grises. **A.II)** Interacciones entre las cadenas A y B. **A.III)** Interacciones de la interfaz entre las cadenas B y D. **A.IV)** Interacciones GlcNAc en la interfaz de dos cadenas adyacentes. **B)** Estructura de los N-glicanos identificados en cada monómero de rTBL-1 (Martínez-Alarcón y col., 2020).

Las lectinas tienen la capacidad de unirse a carbohidratos mediante un dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC), el cual se encuentra definido por residuos conservados, que determinan su conformación y su función (Dodd y Drickamer, 2001). La selectividad del DRC está dada por una combinación entre puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo del azúcar y un embalaje con fuerzas de Van der Waals (Martínez-Alarcón y col., 2018). El rápido avance en las técnicas cristalográficas, ha permitido caracterizar con precisión los DRC de algunas lectinas, tal es el caso de dos fitohemaglutininas de *Phaseolus vulgaris* (PHA:E y PHA:L), para las cuales se encontraron 7 residuos distribuidos a lo largo de su secuencia polipeptídica que convergen espacialmente en la misma hendidura y son

responsables de establecer las interacciones con glicoconjugados (Dodd y Drickamer, 2001; Nagae y col., 2014). Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de algunas leucoaglutininas y se encontró que todas contienen exactamente el mismo DRC (Figura 7, triángulos negros), con un único cambio para la rTBL-1 en la posición 103, en donde hay una R en lugar de K (Martínez-Alarcón, 2017, Palmerín-Carreño y col., 2021).

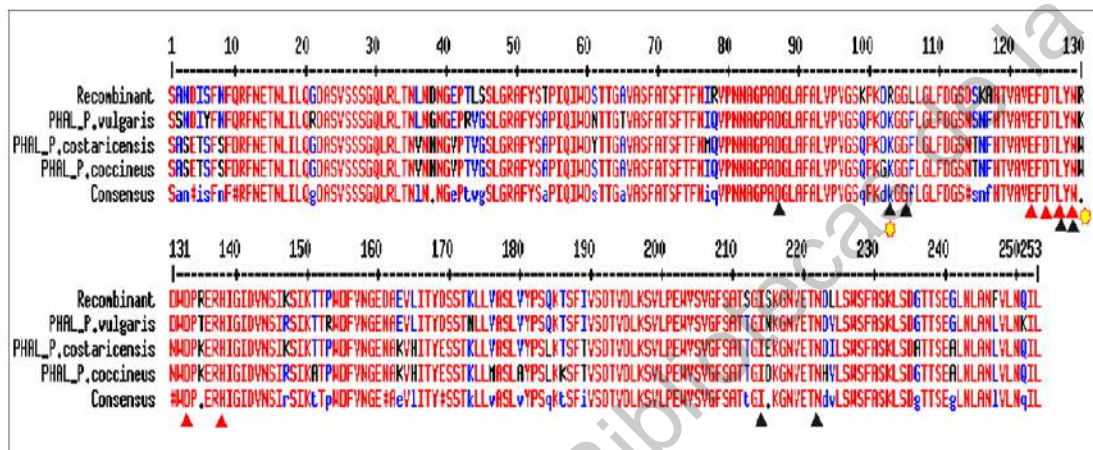


Figura 7. Alineamiento entre las secuencias de rTBL-1 y leucoaglutininas de leguminosas. En rojo se muestran las regiones completamente conservadas, en azul las que se encuentran conservadas para la mayoría de secuencias y en negro las que no están conservadas. Los triángulos rojos indican los residuos responsables de establecer interacciones con los cationes metálicos, los triángulos negros indican los residuos responsables de establecer interacción con los ligandos de las lectinas y los asteriscos amarillos muestran dos de los residuos presuntamente responsables del efecto citotóxico de LN2 (Martínez-Alarcón y col., 2019; Palmerín-Carreño y col., 2021)

Las lectinas reconocen de manera específica a carbohidratos de membrana como manosa, glucosa, fructosa, N-acetilglucosamina (Hernández y col., 2005; Mahmood y Green, 2005). Sin embargo, mediante un marcaje con isotiocianato de fluoresceína (FITC), se identificó que la lectina recombinante reconoce β 1-6 N-glicanos ramificados independientemente de su tamaño, muchos de estos glicanos están sobreexpresados en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de colon e incluyen residuos de β -D-manosa, β -D-galactosa, β -D-N-acetilglucosamina, α -D-fucosa, y α -ácido neuramínico (ácido siálico) (Martínez-Alarcón y col., 2020).

2.4 Farmacocinética de proteínas terapéuticas

El tracto gastrointestinal es el principal sitio de degradación proteica debido a la alta actividad proteolítica. El intestino delgado es el principal responsable de la absorción de nutrientes y fluidos a través de la membrana intestinal, proceso dinámico y complejo mediante el cual se llevan a cabo los mecanismos de absorción paracelular y transcelular. En ambos sistemas de transporte se involucran dos conceptos principales: bioaccesibilidad y biodisponibilidad. El intestino delgado es el principal responsable de la absorción de nutrientes y fluidos a través de la membrana intestinal, proceso dinámico y complejo mediante el cual se llevan a cabo los mecanismos de absorción paracelular y transcelular. En ambos sistemas de transporte se involucran dos conceptos principales: bioaccesibilidad y biodisponibilidad (Nunes y col., 2016).

Los dos tipos celulares principales en el epitelio intestinal son los enterocitos y las células caliciformes. El lado apical de los enterocitos se caracteriza por un borde en cepillo que produce varias enzimas y que aumenta la superficie para la absorción de nutrientes. Las células caliciformes secretan moco, que cubre la membrana apical de las células intestinales y limita parcialmente la absorción de moléculas al igual que la biodisponibilidad y bioaccesibilidad sistémica de proteínas terapéuticas por administración oral (Crommelin y col., 2013). Cualquier péptido en la luz intestinal debe atravesar este entorno antes de ser absorbido (Sánchez-Rivera y col., 2014). Los estudios de bioaccesibilidad se refieren al total del compuesto bioactivo que aún se encuentra disponible para ejercer un efecto biológico relevante, teniendo en cuenta la exposición del compuesto a diferentes condiciones fisicoquímicas, se podría incrementar o reducir la bioactividad y bioeficacia (Gunathilake y col., 2018). La biodisponibilidad se refiere a la tasa y capacidad de un compuesto bioactivo de ser absorbido y estar disponible en los sitios de acción, incluyendo la presencia de los metabolitos circulantes en el torrente sanguíneo (Rein y col., 2013).

La biodisponibilidad es afectada principalmente por dos factores: 1) actividad de enzimas gastrointestinales 2) disminución en la permeabilidad a través de la mucosa gastrointestinal que puede afectar la estabilidad, tiempo de tránsito gastrointestinal y la tasa de la proteína o péptido (Crommelin y col., 2013). Del mismo modo, el tamaño molecular, la hidrofiliidad y la degradación gástrica son los principales factores que interfieren en la absorción de proteínas terapéuticas por vía gastrointestinal. La distribución está determinada por el tamaño, peso molecular, propiedades fisicoquímicas (carga, lipofiliidad, entre otros) y la unión a proteínas de transporte para atravesar membranas. La mayoría de las proteínas terapéuticas con pesos moleculares elevados presentan volúmenes aparentes de distribución pequeños y limitados al volumen del espacio extracelular debido a su limitada movilidad. Los péptidos y proteínas terapéuticas también interactúan frecuentemente con proteínas endógenas, las cuales están implicadas en el transporte y regulación de estas proteínas mismas proteínas, además, pueden permitir o facilitar procesos de captación celular y, por lo tanto, afectan su metabolismo y farmacodinamia (Crommelin y col., 2013; Mahmood y Green, 2005).

Los capilares fenestrados son capilares endoteliales que juegan un papel importante en el transporte de proteínas desde las vellosidades intestinales hacia circulación sistémica, permiten el paso de macromoléculas en el rango de tamaño de 5-30 nm. Este proceso depende del tamaño, la forma y la carga de la proteína y también de las propiedades estructurales y fisicoquímicas de los capilares (Mahmood y Green, 2005; Vugmeyster, 2012). Por otro lado, lectinas como Con A, Jacalina, WGA, PNA, LCA han sido ampliamente utilizadas para demostrar uniones específicas e inespecíficas con proteínas y glicoproteínas de suero humano como albumina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina y haptoglobina por medio de cromatografía de afinidad y espectrometría de masas (Lc/MS/MS) (Lee y col., 2010; Madera y col., 2007; Yang y Hancock, 2004).

Las proteínas terapéuticas son removidas desde la circulación o fluido intersticial por diferentes vías: degradación por proteólisis, captación mediada por receptores o endocitosis no específica (Vugmeyster, 2012). La afinidad o captación mediada

por receptores y la internalización por medio de endocitosis o pinocitosis, pueden conducir a la degradación por lisosomas y son mecanismos de distribución a lo largo del torrente sanguíneo para llegar a los órganos diana (Crommelin y col., 2013; Vugmeyster, 2012). La mayoría de las proteínas terapéuticas de tamaño molecular pequeño son degradadas por enzimas proteolíticas las cuales están distribuidas por todo el cuerpo desde endotelio vascular, la sangre, hasta riñones, hígado y tejido gastrointestinal. La tasa metabólica es mayor para proteínas de bajo peso molecular o para péptidos pequeños, sin embargo, también depende de otros factores como tamaño, carga, grupos funcionales, entre otros (Crommelin y col., 2013; Mahmood y Green, 2005).

Los productos finales del metabolismo proteico son péptidos y/o aminoácidos que se reutilizan para la biosíntesis de otras proteínas en el cuerpo humano, pueden eliminarse rápidamente de la circulación por endocitosis mediada por receptores, tales como receptor de manosa, por pinocitosis no selectiva o endocitosis selectiva (Crommelin y col., 2013; Vugmeyster, 2012). Factores como el tamaño, la carga, lipofilidad, grupos funcionales, reconocimiento de azúcares, vulnerabilidad a proteasas, partículas de agregación, formación de complejos con factores de opsonización también afectan la eliminación de proteínas. La endocitosis puede ocurrir a diferente rango de peso molecular (Cuadro 1).

Barton y col. (2016) realizaron un estudio farmacocinético de lectinas derivadas de las algas rojas de *Griffithsia sp.* administradas vía subcutánea, intravenosa y oral. Utilizaron la técnica de ELISA como método de detección de los parámetros farmacocinéticos (AUC , V_d , C_{max} , etc) en suero, pero no pudo ser detectada por vía oral. Del mismo modo, se evaluaron parámetros farmacocinéticos para VISCUM® Fraxini, fármaco anticancerígeno, derivado de lectinas de muérdago (ML) administrada vía subcutánea. Se determinaron algunos parámetros como C_{max} , t_{max} , AUC y CL en sangre a 0.3, 0.7, 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36, 48, 72, y 336 h por medio de ELISA tipo Sandwich con amplificación exponencial por PCR (Huber y col., 2010). Se ha estudiado el efecto antitumoral y antiproliferativo de la lectina aislada del hongo *Sclerotium rolfsii*. El perfil farmacocinético de esta lectina

administrada por vía intraperitoneal mostró la presencia de lectina en suero después de 1 h de administración, se eliminó rápidamente a través del riñón y no se acumuló en ningún órgano, se determinó por medio de una ELISA indirecta (Anupama y col., 2017).

Cuadro 1. Peso molecular como factor determinante del mecanismo de eliminación de péptidos y proteínas.

Peso molecular (Da)	Sitio de eliminación	Mecanismos de eliminación predominantes	Factor determinante
< 500	Sangre, hígado	Hidrólisis extracelular, difusión pasiva	Estructura, lipofilicidad
500 - 1.000	Hígado	Difusión pasiva mediante un acarreador	Estructura, lipofilicidad
1.000 - 50.000	Riñones	Filtración glomerular y subsecuentemente proceso de degradación	Peso molecular
50.000 - 200.000	Riñones, hígado	Endocitosis mediada por receptor	Carga, glicosilaciones
200.000 - 400.00		Opsonización	α_2 Macroglobulina, IgG
> 400.000		Fagocitosis	Agregación de partículas

Se han desarrollado diferentes estudios farmacocinéticos en productos naturales con potencial anticancerígeno, en donde análisis instrumentales como espectrometría de masas (MS) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) son buenas alternativas para medir fármacos de pequeño peso molecular en fluidos biológicos a niveles de picogramos (pg) sin embargo, para macromoléculas como péptidos y/o proteínas los métodos analíticos son más complejos (Crotti y col., 2017; Mahmood y Green, 2005). De acuerdo a lo anterior, para el estudio de proteínas y péptidos terapéuticos el área de la farmacología ha utilizado técnicas de inmunodetección para determinar la concentración y la presencia de estos en órganos, plasma, suero y orina (Cuadro 2) (Mahmood y Green, 2005; Vugmeyster, 2012). Es importante recordar que para ensayos en farmacocinética es necesario validar y desarrollar el método analítico o bioanalítico en plasma o en otra matriz biológica *in vitro* para posteriormente continuar con ensayos *in vivo*. Las técnicas de

bioensayos pueden tener interferencia de otras moléculas de carácter proteico por lo que no es posible distinguir entre metabolitos y/o productos degradados del fármaco o proteína de interés (Mahmood y Green, 2005).

Cuadro 2. Métodos bioanalíticos aplicados para el estudio de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de proteínas terapéuticas.

Métodos	Tipo de ensayo	Sensibilidad	Muestra	Sensibilidad
Inmunoensayos: (ELISA), radio-inmunoensayos (RIA), Ensayos de inmunoradiometría (IRMA)	Total, libre, intacta	Alta para suero, baja para tejidos, requerimiento de homogenización	Principalmente suero/plasma, fluidos fisiológicos	Usualmente alto para suero/plasma
Bioensayos	Actividad de objetivos, biomarcadores, eficacia <i>ex vivo</i>	Mediana a baja, requiere muestras frescas para algunos análisis	Suero/plasma y tejidos	Depende del ensayo
Radioactividad (¹²⁵I), (³H), (¹⁴C), (³⁵S)	Total, intacta y degradado	Alta, se requiere preparación de la sonda y caracterización	Suero/plasma, tejidos, fluidos biológicos y excreta	Usualmente alto, depende del material marcado
Espectrometría de Masas (MS)	Total, libre, intacta y degradado	Alta para péptidos en suero/ plasma, se requiere homogenización para tejidos Mediana a baja para proteínas en plasma/suero, requiere purificación (Inmunocaptura) y digestión para pesos moleculares grandes	Suero/plasma, tejidos, fluidos biológicos y excreta	Usualmente alto para péptidos Bajo para proteínas grandes
Imágenes	Total, intacta y degradado	Mediana a baja se requiere preparación de la sonda y caracterización	Animales vivos, estudios clínicos en humanos, células y tejidos	Depende de la sonda utilizada

Auto-radiografía	Total, intacta y degradado	Baja, requiere cortar tejidos en películas delgadas	Tejidos	Depende del material marcado
-------------------------	----------------------------	---	---------	------------------------------

Para la evaluación de bioaccesibilidad de compuestos, se han desarrollado diferentes técnicas *in vitro* (uso de tejidos o cultivo celular), membranas artificiales, coeficiente de partición octanol-agua (Log P), perfusión *in situ* e *in vivo* y métodos *in silico* que modulan la permeabilidad o absorción de fármacos o moléculas pequeñas (Cuadro 3).

Entre los estudios *in vitro*, el modelo que utiliza células CaCo-2 diferenciadas es el más extendido, aunque presenta limitantes en el estudio de permeabilidad, como son la presencia de uniones celulares mayores a las que realmente se encontrarían en un tejido intestinal, carece de la interacción de otras células clave en los procesos de absorción (células caliciformes, endocrinas y M), solo modula el transporte transcelular y sobreestima los valores de bioaccesibilidad al presentar sobreexpresión de glicoproteína P por lo que restringe enormemente sus aplicaciones (Lozoya-Agullo y col., 2017).

La unión estrecha célula-célula de la parte apical del intestino, forma una barrera que impide el paso de bacterias, endotoxinas y macromoléculas que atraviesan el epitelio con lo cual, logra el mantenimiento de la polaridad celular y la regularización de la permeabilidad intestinal. La unión estrecha está dada por proteínas transmembranales tales como ocludinas o claudinas y proteínas periféricas de membrana como las zonas de oclusión. La eficacia de la barrera va a depender de la cantidad y distribución de las proteínas (Yoshida y col., 2009).

Los modelos *ex vivo* ofrecen ventajas competitivas sobre los modelos *in vitro*. Desde la implementación de los primeros estudios *ex vivo* utilizando la técnica del intestino invertido, se han desarrollado diferentes estudios farmacocinéticos (Alam y col., 2012; Nunes y col., 2016). Incluso se ha integrado junto a otras etapas de la digestión gastrointestinal como la digestión oral y la estomacal (Campos-Vega y col., 2015). Avances en los modelos *ex vivo* son el uso de la perfusión de sustancias a nivel intestinal para estudiar farmacocinética y farmacodinamia utilizando secciones

de intestino u órganos completos por los que se hace pasar el compuesto de interés (Roeselers y col., 2013).

Cuadro 3. Modelos para evaluar absorción intestinal (Herrera y col., 2012).

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

CLASIFICACIÓN	MODELO	INVERSIÓN	TIEMPO	VENTAJAS/DESVENTAJAS	
<i>In silico</i>		Algoritmos matemáticos	Computadora + Software	Inmediato	Predicción de diferentes propiedades y mecanismos
<i>In vitro</i>	Físicoquímicos	Log P	Reactivos	Horas	Lipofilicidad, "regla de oro", no animales, describe paso transcelular
		MAI	1, 400.00 USD por columna + reactivos	Un día	Uso fácil, no animales, únicamente describe paso transcelular
		PAMPA	Des 200 USD (5 placas) + reactivos	Hasta 24 h	
	Líneas celulares	MDCK-II	3500 USD por línea celular + reactivos y cuarto de cultivo	3 días de cultivo y 24 h de ensayo	Permeación transcelular, paracelular y transportadores activos y de eflujo. Uso fácil, transporte direccional, grosor de uniones estrechas más grande, velocidad aparente
		CaCo-2		21 días de cultivo y 24 h de ensayo	
	Tejidos	Enterocitos aislados	Línea celular + reactivos y cuarto de cultivo	Algunas horas	Captación del fármaco por las células, no permeabilidad
		Intestino invertido	Costo de los animales + reactivos		Permeabilidad intestinal en diferentes segmentos, transporte direccional, con o sin flujo sanguíneo, consumo de animales, ensayo complejo.
		Perfusión			Absorción en diferentes segmentos, transporte direccional, tejidos animales y humanos.
	<i>In vivo</i>	Absorción	Animales		Costo de los animales + reactivos
Humanos			Aprox 60,000 USD por fármaco	Días	Parámetros farmacocinéticos

Durante los últimos años se ha cuestionado si el uso de sistemas de *digestión in vitro* o *ex vivo* simulan o predicen de manera exitosa el comportamiento de diferentes compuestos de origen vegetal en condiciones fisiológicas (Alam y col., 2012; Barba y col., 2017; Dupont y col., 2019; Sousa y col., 2020). Diferentes investigadores han utilizado la digestión gastrointestinal y la fermentación colónica *in vitro* para evaluar diferentes parámetros de bioaccesibilidad, biodisponibilidad, coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) y la cuantificación de metabolitos secundarios generados por este proceso por medio de HPLC (Aguillón-Osma y col., 2019; Luzardo-Ocampo y col., 2020). Se ha identificado péptidos biológicamente activos generados durante la digestión gastrointestinal *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) por medio de técnicas como electroforesis y espectrometría de masas (Tagliacruzchi y col., 2015).

Mejoras de los estudios *ex vivo* han incorporado el uso de cámaras de difusión que ayudan a preservar la integridad del tejido intestinal e incorporan variables típicas de la fisiología intestinal como son la anaerobiosis y el mantenimiento de la temperatura corporal. Al respecto, Sjöberg y col. (2013) utilizaron estas cámaras usando soluciones amortiguadoras e inyección de carbógeno para simular el microambiente intestinal. Por su parte, Arnold y col. (2019) propusieron el uso de soluciones mejoradas de simulación del fluido intestinal y su correlación con variables tradicionalmente usadas en los estudios *ex vivo* como son los coeficientes de permeabilidad aparente y aproximaciones *in silico* de posibles transportadores intestinales involucrados. Si bien estos estudios han contribuido al mejoramiento de la técnica y su afinidad con una aproximación *in vivo*, se requieren más estudios que mejoren las características del mantenimiento de la viabilidad del epitelio intestinal y su correlación con muchos componentes dietarios de los que aún no existe información disponible.

Particularmente, las lectinas son típicamente proteínas globulares altamente resistentes a las enzimas proteolíticas de los mamíferos, ya que presentan una unión efectiva con los receptores de superficie de las células epiteliales del intestino (Lajolo y Genovese, 2002; Rhodes, 1999). Además, resisten la degradación por

bacterias (Santoro y col., 1997), por lo que sobreviven al paso a través del tracto digestivo y permanecen en su forma biológica e inmunológica intactas (Lajolo y Genovese, 2002; Rhodes, 1999). Ratones administrados por cánula de intubación gástrica con lectina del frijol Kintoki, alcanzaron hasta el 78.6% de lectina en tracto digestivo después de 24 h posteriores a la intubación (Hara y col., 1984). La Concanavalina A fue recuperada en cantidades significativas en las heces de ratas a partir de las 4 h después de su administración oral, pasados 4 días de la administración se recuperó el 90 % de la lectina, indicó que dicha lectina es estable durante su paso por el tracto gastrointestinal (Nakata y Kimura, 1985).

Después de la administración intragástrica de una única dosis de 50 mg/kg de peso de la FCL de frijol Tépari, se encontró actividad aglutinante en heces de rata después de las 24 h de administración lo que muestra que las lectinas de frijol Tépari son resistentes a enzimas proteolíticas en el tracto gastrointestinal (Figura 8). Es importante mencionar que a las 72 h se presenta mayor actividad aglutinante, posiblemente la lectina que se encuentra en heces a las 24 h es proteína que no se unió al epitelio intestinal (Ferriz-Martínez y col., 2015).

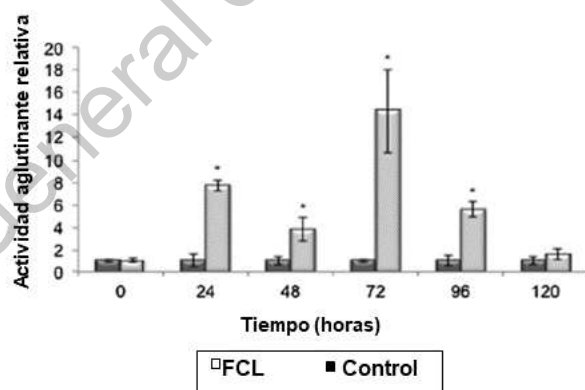


Figura 8. Actividad aglutinante de heces de ratas después de una única administración con FCL (50 mg/kg) (Ferriz-Martínez y col., 2015)

La unión de las lectinas a las células epiteliales interfieren con la eficacia de la unión estrecha y provocan un aumento la permeabilidad epitelial, lo que resulta en disminución de las células maduras y afecta la integridad celular del intestino,

principalmente del yeyuno e íleon. Asimismo, se ha observado que la unión de las lectinas a las células epiteliales ocasiona una reducción de la expresión de ocludina y ZO-1, lo cual aumenta la permeabilidad de la membrana (Pita-López y col., 2020; Thompson y col., 1987).

Diversos estudios en modelos murinos, encontraron una relación entre la adhesión de lectinas a los carbohidratos de la membrana intestinal y el aumento de la permeabilidad de la pared intestinal, lo cual permite la internalización de lectinas, péptidos y bacterias y los subsecuentes efectos sobre el sistema inmune y algunos otros órganos. Estudios en pollos han observado que la permeabilidad dada por las lectinas es dependiente de la dosis y se debe a que las lectinas disminuyen el entrecruzamiento de las proteínas de barrera, ocludina y ZO1 (Pellegrina y col., 2005, 2009; Zhao y col., 2011).

La administración a ratas de la FCL (50 mg/kg), por cánula intragástrica durante 6 semanas, tres veces por semana mostró atrofia intestinal de vellosidades e hiperplasia críptica. Incrementó la producción de moco intestinal, aumentó la permeabilidad y disminuyó la digestibilidad ileal aparente de la proteína cruda. La permeabilidad de la membrana se evaluó mediante inmunohistoquímica para ocludina en yeyuno y se observó pérdida de la continuidad de la ocludina membranar. Sin embargo, después de 6 semanas de recuperación post-tratamiento con la FCL, se observó incremento parcial de la ubicación de ocludina, lo que sugiere recuperación de permeabilidad de la membrana (Pita-López y col., 2020).

III. JUSTIFICACIÓN

La realización de estudios de bioaccesibilidad y permeabilidad de compuestos bioactivos son indispensables porque generan información sobre la absorción, el comportamiento en el tracto gastrointestinal y la biodisponibilidad de compuestos de interés farmacológico. El uso de modelos de digestión *in vitro* permite predecir posibles mecanismos de acción y cantidad de compuesto presente después de un proceso gástrico simulado. Resultados del grupo de trabajo han permitido determinar que la FCL de frijol Tépari tiene efectos inhibitorios de la tumorigénesis temprana en colon. La producción de una lectina recombinante hace posible el desarrollo de un fitofármaco con potencial comercial. La rTBL-1 mantiene el efecto citotóxico *in vitro* a través de la inducción de apoptosis. Dado el conocimiento de los efectos adversos de las lectinas de frijol Tépari en el tracto digestivo, y a la necesidad de administrar esta proteína por vía oral para lograr su efecto contra cáncer de colon, resulta necesario evaluar su bioaccesibilidad y permeabilidad intestinal. Lo anterior permitirá conocer el nivel de internalización y/o absorción, tanto de la proteína intacta como de sus derivados. Esta información contribuirá al avance en el conocimiento del mecanismo de acción de la proteína y sus derivados así como sobre su farmacocinética y farmacodinamia.

IV. HIPÓTESIS

La lectina recombinante de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) modifica la permeabilidad la membrana intestinal, lo que permite su absorción o internalización.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar bioaccesibilidad y permeabilidad intestinal de la rTBL-1 de frijol Tépari mediante un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro/ex vivo*.

Objetivos específicos

- Obtener y titular un anticuerpo policlonal contra la lectina recombinante (rTBL-1) de frijol Tépari para su detección en muestras biológicas.
- Determinar la capacidad de absorción y eliminación en heces de la rTBL-1 administrada por vía intragástrica a ratas Sprague Dawley por medio electroforesis y Western blot.
- Evaluar la bioaccesibilidad de la rTBL-1 sometida a digestión gástrica e intestinal *in vitro* utilizando el modelo de intestino invertido.
- Determinar la permeabilidad intestinal de la rTBL-1 durante a digestión gastrointestinal *in vitro* utilizando el modelo de intestino invertido.
- Analizar la degradación de la lectina recombinante a lo largo de la digestión gástrica e intestinal *in vitro* mediante electroforesis, Western blot y espectrometría de masas.
- Evaluar la afinidad de la rTBL-1 al epitelio intestinal mediante inmunohistoquímica y predicción mediante docking molecular

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Producción y purificación de la lectina recombinante (rTBL-1)

La proteína recombinante se obtuvo de acuerdo a la metodología propuesta por (Martínez-Alarcón y col., 2020). Brevemente, las células de *Pichia pastoris* se cultivaron en placas de glicerol mínimo (MD) que contenían base de nitrógeno de levadura al 1.34% (p/v) sin aminoácidos (YNB), biotina 4×10^{-5} % (p/v), 2% (p/v) glicerol y agar zeocina al 2% (p/v) y se almacena a 4°C. Los stocks fueron preparados como lo recomendado Invitrogen (*Pichia* Expression Kit, Versión M) y almacenado a -80°C. Para la producción de rTBL-1, se utilizó una única colonia de *Pichia pastoris* (cepa SMD1168H) para inocular 5 mL de extracto de levadura-peptona-glicerol (YPG): extracto de levadura al 1% (p/v), peptona al 2% (p/v), 2% (p/v) de glicerol y 4×10^{-5} % (p/v) de biotina. El cultivo se hizo crecer durante la noche a 30 °C. Se inoculó un matraz con deflectores de 0.5 L con 0.5 ml del cultivo durante la noche y se incubó a 30 °C para generar el inóculo para el biorreactor. Las fermentaciones se llevaron a cabo en un volumen de 2.1 L utilizando un In-Control (Applikon, Delft, Países Bajos) interconectado con el software Lucullus PIMS Lite versión 3.7.2 (Applikon) para la adquisición de datos y el control de supervisión. Un volumen inicial de 1.1 L de medio de sales basales modificado ((MSM), 0.93 g/L $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 18.2 g/L K_2SO_4 , 14.9 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.13 g/L KOH, 26.7 mL/L H_3PO_4 , 40 g/L glicerol) y 0.5 mL de antiespumante (VRF-30, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) se esterilizó dentro del reactor. Se utilizó hidróxido de amonio (15%, v/v) como agente de control del pH y fuente de nitrógeno (pH 5.0). Se agregaron aseptícamente sales de PTM1 (CuSO_4 24 mM, NaI 0.53 mM, MnSO_4 19.87 mM, Na_2MnO_4 0.83 mM, ácido bórico 0.32 mM, CoCl_2 2.1 mM, ZnCl_2 0.15 mM, FeSO_4 0.23 M y biotina 0.82 mM) a 4.35 mL/L después de la esterilización antes de la inoculación. El proceso se cambió a 0.5 L alimentados por lotes usando glicerol-MSM 1:1 agregado al biorreactor con una tasa de flujo de alimentación constante (F) de 0.06 mL/min. Después del sistema de alimentación por lotes, el sobrenadante de fermentación se clarificó a través de un filtro de membrana de 0.22 μm y se purificó del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad con níquel usando

columnas HisTrap de alto rendimiento. La proteína resultante se dializó, liofilizó y almacenó a -20 °C. Una vez liofilizadas las muestras se cuantificó la proteína por el método de (Bradford, 1976) y por medio espectrofotometría NanoDrop a 280 nm (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific), se determinó actividad aglutinante (Jaffé, 1980) utilizando eritrocitos humanos A⁺ fijados con glutaraldehído (Turner y Liener, 1975).

6.2 Producción del anticuerpo policlonal anti-rTBL

Para llevar a cabo este procedimiento experimental el Comité de Bioética del Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro lo aprobó con el Código de aprobación: 44FCN2015. Se utilizaron 2 conejos Nueva Zelanda machos de 9-10 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en el Rancho Amazcala de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ. Los animales se colocaron en cajas con agua y alimento (Conejina T, Purina, St. Louis, MO, US) *ad libitum* con un ciclo circadiano de 12:12 luz-oscuridad, a 21 ± 2 °C y humedad relativa de $60 \pm 5\%$ durante el periodo adaptativo de una semana y el experimental. Los animales se inocularon tres veces con 1000 µL del inóculo a partir de una solución stock de 1 mg/mL de lectina recombinante liofilizada de frijol Tépari (rTBL-1) en PBS 1x, pH 7.4. Para la preparación del inóculo, se mezclaron 100 µL de la solución madre con 400 µL de PBS y 500 µL de adyuvante Montanide 71G (Seppic, París, Francia) a los 21 y 15 días. Se realizaron sangrados preinmune y posinmune de la arteria auricular y la sangre se centrifugó 1500 g durante 15 min para separar el suero y posteriormente se almacenó a -80 °C. Diez días después de la última inmunización los animales fueron sacrificados (Figura 9).

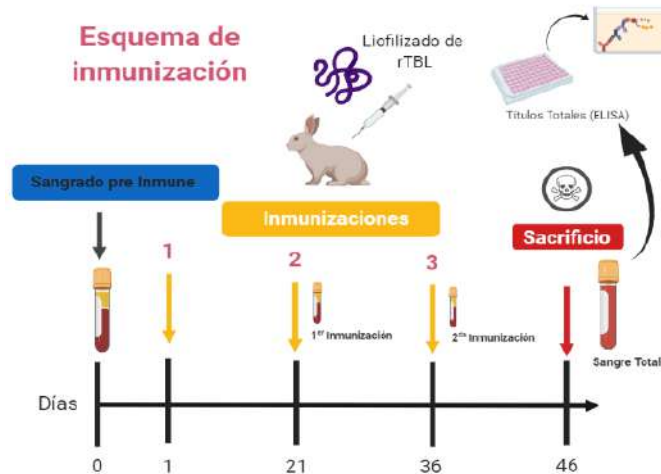


Figura 9. Esquema de inmunización con liofilizado de lectina recombinante. Sangrado Pre inmune día 0. Primera inmunización día 1, segunda inmunización día 21 y última inmunización día 36. El sacrificio de los conejos fue 10 días después (Día 46).

La evaluación de los títulos de anticuerpos se realizó mediante ELISA indirecto. Las placas de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos se forraron con 100 μL de rTBL-1 durante la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$. Para ello, se preparó rTBL-1 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en una solución de tampón carbonato/bicarbonato 0.1 M, pH 9.6. Luego se lavaron 3 veces con PBS 1x suplementado con 0.05% Tween-20 (v/v) (PBST) a temperatura ambiente para descartar todos los péptidos no unidos. Las placas se bloquearon con 200 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de PBS pH 7.4, Tween-20 al 0.05% (v/v) y leche baja en grasa al 5% y se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Posteriormente se lavaron 3 veces y se golpearon suavemente sobre papel secante limpio.

Se agregaron proporciones 1:100 de cada suero probado (anticuerpo primario, 100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$), se cargaron e incubaron diluciones seriadas por triplicado (37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h) hasta 1:12800. Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando dos veces con PBST al 0.05%. Se utilizó como anticuerpo secundario un anti-conejo IgG, H+L conjugado con peroxidasa de rábano picante anticuerpo hecho en cabra (Cat. No. 111-035-003 Jackson ImmuneResearch, Baltimore, MD, EE. UU.) diluido a 1:10000 con PBS 1x y leche desnatada al 2 % y se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h. Las placas se lavaron tres veces para eliminar los anticuerpos no unidos y se revelaron con 0.4 mg/mL de diclorhidrato de O-fenilendiamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y 4 μL de

H₂O₂ (30% v/v) en una solución tampón de citrato 0.1 M/ácido cítrico 0.1 M. Las lecturas de las placas se llevaron a cabo en un lector de placas ELISA (Microplate Absorbance Reader, Bio Rad, Hercules, CA, EE. UU.) a 450 nm 20 min después de añadir la solución de revelado. Se utilizó el software MPM 6 (Bio Rad) para analizar las lecturas, cada muestra se analizó por triplicado y se calculó el límite de corte con las muestras negativas (suero preinmune), considerando la media \pm 3 desviaciones estándar. Todas las muestras por debajo de este valor se consideraron negativas. La fórmula utilizada para calcular el punto de corte es:

$x+(3*\sigma)$, donde x = promedio de las tres repeticiones del suero control negativo de referencia seleccionado, σ = desviación estándar del suero control negativo de referencia seleccionado. Todos los sueros que presentaron absorbancias mayores al punto de corte se consideraron positivos a la presencia de anticuerpos contra la rTBL-1. Los sueros que presentaron absorbancias menores al punto de corte se consideraron negativos.

6.3 Experimento *In vivo*

El procedimiento experimental fue aprobado por el Comité de Bioética del Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (Código de aprobación: 44FCN2015) y cumplió con la guía del Instituto Nacional de Salud (NIH) para el cuidado y uso de Animales de Laboratorio. Se utilizaron 34 ratas Sprague Dawley machos de 5-6 semanas de edad con alimentación y agua *ad libitum* y se ajustó el ciclo circadiano a 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Se realizó un experimento hasta las 8 h con una única dosis de 27.15 mg/Kg de peso corporal de rata (en total 250 mg de rTBL-1). Se utilizaron 4 ratas para el grupo control y 4 ratas para el grupo tratado por cada tiempo de sacrificio (Figura 10), los animales se sacrificaron por medio de decapitación con una guillotina para roedores. La disección se llevó a cabo realizando un corte en el abdomen, se colectó el intestino delgado y el colon, al igual que sangre, orina y heces. Se separó el suero por centrifugación (1500 g x 15 min). Los órganos, sueros, orina y heces se

almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Las muestras se procesaron por medio de electroforesis SDS-PAGE y western blot.

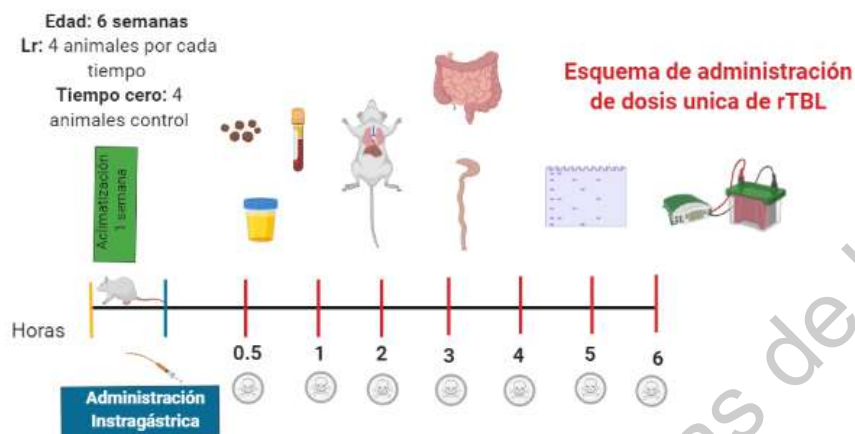


Figura 10. Esquema de administración intragástrica de lectina recombinante (rTBL-1) en una única dosis.

6.4 Digestión gastrointestinal *in vitro/ex vivo*

El procedimiento experimental fue aprobado por el Comité de Bioética del Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (código de aprobación: 44FCN2015) y cumplió con la guía del Instituto Nacional de Salud (NIH) para el cuidado y uso de Animales de Laboratorio. En la Figura 11 se muestra el esquema general del procedimiento seguido.

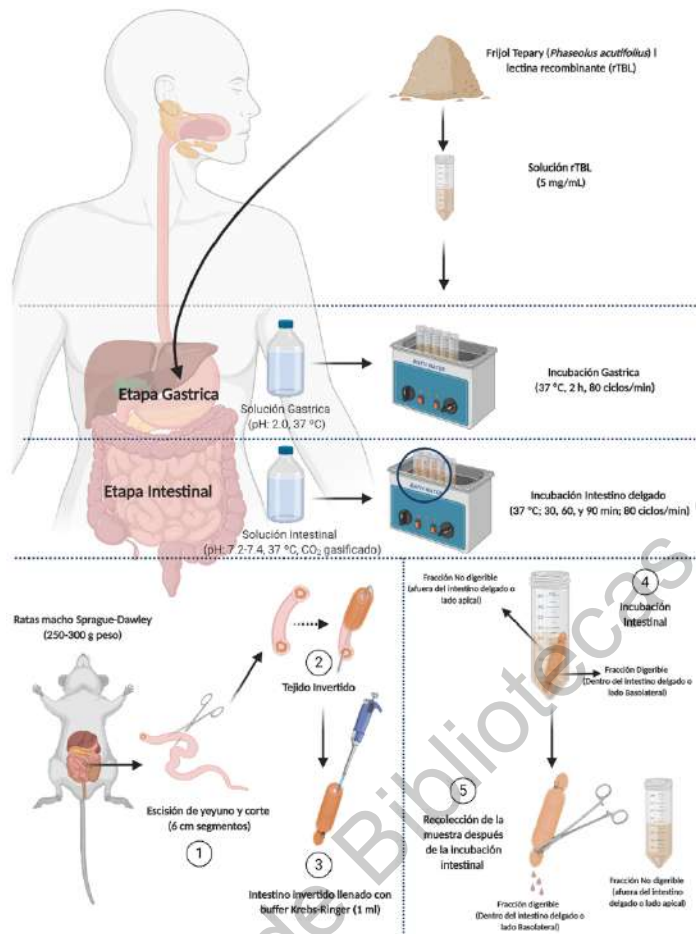


Figura 11. Esquema general del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro/ex vivo*.

1) La incubación intestinal se simuló *ex vivo* usando un yeyuno extirpado de ratas macho Sprague-Dawley, 2) el tejido se invirtió cuidadosamente, 3) se llenó el lado interno (lado basolateral) con tampón Krebs-Ringer (1 mL). 4) Una vez atado en ambos lados, el tejido intestinal relleno se colocó en la solución intestinal (muestra de pH ajustado a 7.2-7.4, adicionada con enzimas intestinales: pancreatina y bilis bovina) y se incubó (30-90 min). 5) Después de ser incubada, la muestra del lado externo del tejido del intestino delgado se denominó fracción no digerible (lado apical), y el lado interno del tejido intestinal se consideró como fracción digerible (lado basolateral).

Para llevar a cabo la simulación de la digestión gastrointestinal se siguió la metodología reportada por Campos-Vega y col. (2015). Brevemente, se simuló el proceso digestivo desde la digestión gástrica hasta la absorción intestinal, considerando que la lectina se administra intragástricamente evitando el contacto oral. Para la digestión estomacal, la lectina recombinante (5 mg/mL) se resuspendió en una solución de pepsina (0.055 g en 0.94 mL de HCl 20 mM) (≥ 2500 U/mg de

proteína, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y se ajustó a pH 2.0, seguido de incubación (37 °C, 2 h). La fase intestinal se simuló ajustando la fracción gástrica a pH 7.2-7.4 y se añadió una mezcla de enzimas intestinales: 2.6 mg de pancreatina (8x USP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y 3.0 mg de bilis bovina (Sigma-Aldrich) disuelta en 5 mL de solución tampón Krebs-Ringer (pH 6.8, gasificado con CO₂, 37 °C) [NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucosa 11 mM y 2.5 mM CaCl₂, pH 6.8). Dicha solución se mezcló a la muestra proveniente de la digestión estomacal en tubos de ensayo, para posteriormente ser administrada a los intestinos invertidos de rata.

Para la preparación de los intestinos, se emplearon ratas macho Sprague-Dawley (6-8 semanas de edad, 250-300 g de peso), clínicamente sanas, y provistas por el Instituto de Neurobiología (Universidad Nacional Autónoma de México – UNAM, Campus Juriquilla, Querétaro, México). Dieciséis horas previas al sacrificio, las ratas se sometieron a ayuno y consumo de agua *ad libitum*. Los animales se sacrificaron mediante decapitación. Se extrajo el yeyuno, el cual fue lavado con solución amortiguadora de Krebs-Ringer, cortado en segmentos de 6 cm de largo, invertido y sellados en la parte inferior. Se llenó con 1 mL de solución de Krebs-Ringer, se sellaron nuevamente y se etiquetaron aleatoriamente para posteriormente ser colocados en la solución intestinal. Los sacos fueron incubados por 30, 60 y 90 min a 37 °C, en agitación constante (80 ciclos/min). Las alícuotas del exterior (lado apical o fracción no digerible FND) e interior (lado basolateral o fracción digerible, FD) del saco invertido se recogieron y almacenaron a -80 °C para análisis adicionales de cromatografía líquida de ultra alta resolución-espectrometría de masas (UHPLC-MS). Un control preparado con agua destilada se sometió al mismo procedimiento. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

6.4.1 Evaluación de viabilidad del tejido intestinal

Para la evaluación histopatológica, el yeyuno de las ratas se fijó en formaldehído al 10%, las laminillas se deshidrataron en una serie de alcoholes desde xilol 100 %, alcohol absoluto-xilol, alcohol absoluto, alcohol 96%, alcohol 80%, y se tiñó con

hematoxilina-eosina para su posterior análisis histológico por microscopía (modelo DM2500, Leica, Wetzlar, Alemania) con lentes de 10x y 63x.

El flujo de agua es un indicador indirecto de la absorción de agua y el flujo de proteína a través del segmento intestinal. El yeyuno invertido se incubó en solución Krebs-Ringer. El flujo de agua (WF) se calculó de acuerdo con la ecuación: $WF = (W_3 - W_2)/W_1$, considerando WF como el flujo de agua (g de agua/g de intestino fresco), W_1 es el peso inicial del intestino delgado (sin solución de Krebs-Ringer), W_2 es el peso del saco invertido lleno de solución tampón antes del tiempo de incubación, y W_3 es el peso del segmento del saco invertido después del período de incubación (Khemiss y col., 2005).

El transporte de glucosa se evaluó utilizando una solución saturada de glucosa (4 g/L, disuelta en tampón Krebs-Ringer sin glucosa) (Caicedo-Lopez y col., 2019). Esta solución se ajustó a pH (7.2-7.4), se mezcló con las enzimas intestinales como se indica en la sección 5.3 (pancreatina y bilis bovina) y se sometió a incubación intestinal en el saco intestinal invertido. El lado apical contenía la solución de glucosa en el tampón Krebs-Ringer sin glucosa y las enzimas intestinales, y el lado basolateral contenía tampón Krebs-Ringer sin glucosa. Después de la incubación (30, 60 y 90 min), se conservaron a 4 °C alícuotas del lado interno y externo del intestino. La concentración de glucosa se midió usando el kit de ensayo de glucosa (GAGO20-1KT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.4.2 Evaluación de la bioaccesibilidad

La cantidad de rTBL-1 durante la digestión gastrointestinal *in vitro/ex vivo* se cuantificó por espectrofotometría NanoDrop a 280 nm (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific). rTBL-1 fue cuantificada al inicio del experimento (C_0) y después de cada etapa del proceso digestivo *in vitro* (grupos con rTBL-1). Un grupo fue probado sin rTBL-1 (grupo control). En cada etapa de los ensayos, la diferencia entre el grupo tratado menos el grupo control fue calculada para obtener la concentración total de proteína (C_f) después de la etapa gástrica y la digestión

intestinal (30 y 60 min). Estos valores se utilizaron para calcular la bioaccesibilidad de la proteína o los péptidos generados tras el proceso de digestión, utilizando la ecuación (D'Antuono y col., 2015):

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = (C_f/C_0) * 100$$

6.4.3 Coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app})

La P_{app} del lado apical al basolateral ($P_{app\ A\ a\ B}$) y basolateral al lado apical ($P_{app\ B\ a\ A}$) se calculó mediante la ecuación $P_{app}: (dQ/dt) (1/AC_0)$ (Hubatsch y col., 2007), donde P_{app} (cm/s) es el coeficiente de permeabilidad aparente, dQ/dt (mg/s) es la relación entre la cantidad de proteína o péptido transportado a través de la membrana por unidad de tiempo, A es el área intestinal transversal (cm²) que representa el área de superficie del segmento invertido del intestino disponible para la permeación, y el C_0 (mg/mL) expresa la concentración inicial de proteína o péptidos (contenido gástrico) que penetran los sacos intestinales. La relación de flujo (ER) se consideró la relación entre $P_{app\ B\ a\ A}$ y $P_{app\ A\ a\ B}$. La media y los valores estándar se expresaron en unidades de 10⁻⁵ cm/s.

6.5 Electroforesis desnaturalizante de proteínas (SDS- PAGE) y Western blot

La presencia de rTBL-1 en todas las muestras se identificó mediante western blot. La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis Mini-Protean III de Biorad de acuerdo al protocolo reportado por (Sambrook y Russell, 2001). Se corrió a 90 V durante 90 min en una solución tampón de corrida (Tris Base 25 mM, glicina 200 mM, SDS 3.5 mM, pH 8.3), y se utilizó el marcador de peso molecular de Prestained Protein Ladder (BG00364, Bio Basic, Ontario, Canadá). Se preparó un gel al 13% [(29%) acrilamida/bisacrilamida (1%)] y de 1.0 mm de espesor y se corrió en condiciones semidesnaturalizantes. Los geles se realizaron por duplicado. Para la identificación de la rTBL-1 se tiñeron los geles con Coomassie Brilliant Blue (CBB-R250, Serva, Heidelberg, GER).

Para el western blot, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio Rad) a 4 °C y 15 V durante 20 min en una cámara de transferencia electroforética semiseca Trans-Blot® SD (Bio Rad, EE. UU.) usando una solución tampón de transferencia (base Tris 25 mM, Glicina 200 mM, metanol al 20 %, pH 8.3). La transferencia se verificó con una tinción de rojo Ponceau (rojo Ponceau 0.2% w/v y 5% v/v ácido acético). La membrana se lavó con PBST 1x (base Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.05%) y luego se bloqueó usando una solución tampón de bloqueo (TBS Tween-20 (TTBS) al 0.05%, leche desnatada al 5%) durante toda la noche a 4 °C con agitación constante (420 rpm). La membrana se incubó con el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de lectina recombinante) a una dilución 1:30000 en 1x TTBS con leche desnatada al 2% durante 60 min a temperatura ambiente bajo agitación constante, seguido de 3 lavados (1x TTBS, 15 min cada uno). Se bloqueó nuevamente con leche al 5% y TBST 1x durante 1 h a temperatura ambiente y agitación constante. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo, H+L) conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmuneResearch, Baltimore, MD, USA) diluido a 1:15000 en las mismas condiciones. Posteriormente, la membrana se volvió a lavar con 1x TTBS 3 veces por 15 min. La inmunodetección se logró visualizar mediante ChemicDoc Imaging System, utilizando el reactivo de detección de transferencia Western Prime Amersham™ ECL™ (GE Healthcare, Little Chalfont, Bucks, UK) 1:1, 200 µL del reactivo A y 200 µL del reactivo B con exposiciones de 1, 3 y 5 min.

6.6 Análisis de la rTBL-1 y de las muestras digeridas por UHPLC-ESI-QTOF/MS

El análisis de espectrometría de masas de la lectina recombinante se realizó utilizando un cromatógrafo de líquidos de ultra alto rendimiento (UHPLC) (ACQUITY Clase H, Waters Corporation, Milford, MA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución con tiempo de vuelo y una fuente de iones en electrospray (ESI-QTOF) (modelo Xevo G2 QTOF, Waters). Para la detección de proteína intacta se acondicionó una columna C₈ (2.1 x 100 mm, 1.7 µm) (Waters Corporation, Milford, MA, USA) con el 100% de la fase móvil, disolvente A (acetonitrilo al 30%, ACN, en ácido fórmico al 0.1% v/v). El disolvente B fue ácido fórmico al 0.1% v/v en

agua. El gradiente inició con 30% de A a 0 min; 50% A durante 5 min, 60% A durante 12 min, 95% A durante 17 min, 95% B durante 22 min, 30% B durante 27 min y finalmente 30% A durante 35 min. El volumen de inyección fue de 10 μ L para la solución estándar (1 mg/mL) a un flujo de 0.3 mL/min. La temperatura de la columna fue de 40 °C. El espectrómetro de masas se ejecutó en modo positivo (ESI) con un rango de 100 a 2500 m/z. El voltaje capilar fue de 2.5 kV y la resolución del equipo fue de 2000. Para la adquisición de datos se utilizó MassLynx V4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Antes del análisis de espectrometría de masas, las muestras procedentes de la digestión gastrointestinal se desalaron utilizando cartuchos Sep-pak C18 plus (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Para la identificación de la proteína intacta se utilizó el mismo gradiente de disolvente mencionado anteriormente y el volumen de inyección fue de 20 μ L.

6.7 Análisis inmunohistoquímico

Las muestras deshidratadas (tejidos intestinales) se incrustaron en bloques de parafina y se cortaron en portaobjetos Thermo Fisher cargados positivamente de 3 μ m de espesor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) utilizando un micrótopo y posteriormente se rehidrataron. Para ello, se retiró la parafina de las muestras a 60 °C durante 20 min y se rehidrató en xileno al 100%, una serie de lavados con alcohol (99, 96 y 70%), y agua destilada durante 10, 10, 5, 5 y 5 min, respectivamente. Para desenmascarar los epítomos, las muestras se colocaron en un baño de agua a 100 °C durante 15 min en una solución de ácido cítrico 0,1 M, pH 6.0. Los portaobjetos se lavaron tres veces (PBS 1X, pH 7.2) y se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% en PBS 1X (30 min) para eliminar la actividad peroxidasa endógena. Los sitios de unión no específicos se bloquearon usando leche baja en grasa al 5% en PBS-Tween al 0.1% durante 30 min a TA. Los tejidos se incubaron durante la noche a 4 °C con los anticuerpos policlonales anti-lectina, diluidos a 1:10000. Los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo, H+L) conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson

ImmuneResearch, Baltimore, MD, USA) diluido a 1:5000 durante 1 h a temperatura ambiente. La reacción se realizó utilizando una solución de 0.02 mg de diaminobencidina en 72 mL de PBS 1X y 120 μ L de H₂O₂ al 30% durante 15 min. Esta reacción produjo un precipitado de color sepia en las células inmunorreactivas. Las muestras se contrastaron con hematoxilina de Harris y se deshidrataron utilizando agua destilada, alcohol al 70%, alcohol al 96%, alcohol absoluto y xileno, y se montaron con resina. Las muestras se analizaron bajo un microscopio modelo DM2500 (Leica, Wetzlar, GER) con lentes de 10x y 63x y se obtuvieron fotografías.

6.8 Docking Molecular

Se realizó un análisis *in silico* para evaluar las interacciones potenciales entre rTBL-1 digerida y no digerida y ligandos del intestino delgado. La secuencia FASTA reportada de rTBL-1 se descargó del Protein Databank (código: 6TT9). Como los primeros 6 aminoácidos (EAEAAA) corresponden a corte inespecífico de la enzima (secuencia no codificante) se excluyeron de la secuencia. Se modeló en 3D utilizando el software en línea Swiss Model 2.0 (Biasini y col., 2014). Sobre la base de la identidad más alta, la estructura de fitohemaglutinina (6TT9.1.A) se seleccionó como estructura rTBL-1 para el modelado.

Para seleccionar los ligandos intestinales que potencialmente interactúan con rTBL-1, las estructuras reportadas indicadas por (Martínez-Alarcón y col., 2020) se utilizaron para la metodología de acoplamiento. La base de datos PubChem se utilizó para descargar las estructuras 3D de β -D-manosa (PubChem CID: 439680), N-acetil β -D glucosamina (PubChem CID: 24139), ácido siálico (PubChem CID: 906), N-acetil galactosamina (PubChem CID: 35717) y α -D-glucosa (PubChem CID: 79025), β -D-galactosa (PubChem CID: 439353), α -L-Fucosa (PubChem CID: 439554). Si no se reportó una estructura 3D (por ejemplo, ácido siálico), se modeló usando MarvinSketch v.20.9 (ChemAxon, Budapest, Hungría). El procedimiento de acoplamiento (Luna-Vital y col., 2017) se llevó a cabo seleccionando torsiones flexibles, enlaces de hidrógeno y cálculos de acoplamiento proporcionados por las herramientas AutoDock (Trott y Olson, 2010). La visualización de las mejores

interacciones de acoplamiento se realizó en Discovery Studio Visualizer v. 19.1.0.188287 (Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, Francia).

6.9 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE). Se consideraron dos experimentos independientes, con al menos tres repeticiones, para cada medición de cada incubación. El análisis estadístico se realizó utilizando el software JMP v. 8.0 (SAS Institute, Cary, NC), con un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y la prueba post-hoc de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples donde las diferencias se consideraron significativas en $p \leq 0.05$.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

VII. RESULTADOS

7.1 Generación de un anticuerpo policlonal (Anti-rTBL-1)

La Figura 12 muestra los títulos de anticuerpos después del tratamiento de los animales con rTBL-1 liofilizada. Se pudo observar que el suero preinmune (línea violeta) está por debajo del valor umbral de 0.8. Los datos de la primera inmunización (21 días después de la primera inmunización) comenzó con una densidad óptica (DO) de 0.15. La DO disminuyó a medida que se aumentaron las diluciones seriadas, siendo positivas hasta una dilución 1:1600. Para la segunda (línea rosada) y tercera (línea verde) inmunizaciones (15 y 10 días después de la inmunización), ambas mostraron una DO superior a 0.15, mostrando la misma tendencia que la primera inmunización, pero alcanzaron diluciones más diluidas por encima del punto de corte (1:12800 y 1:25600, respectivamente).

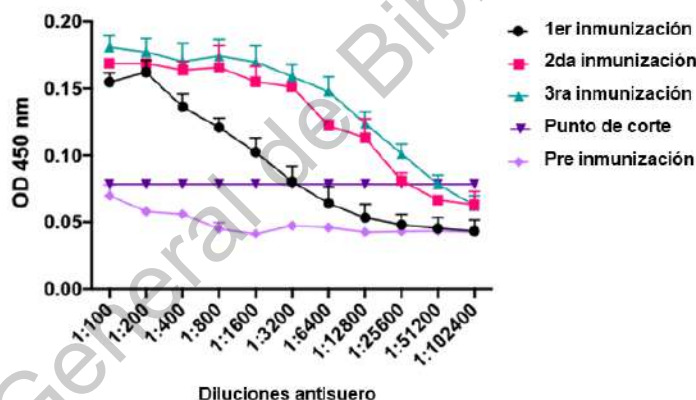


Figura 12. Títulos totales de un conejo inmunizado con Lectina. Títulos de anticuerpos de rTBL-1 de tres inmunizaciones. El suero preinmune correspondió al período anterior al inicio de las inmunizaciones. El punto de corte se calculó con las medias de las muestras negativas más tres desviaciones estándar. Todas las muestras se analizaron por triplicado. OD: densidad óptica. 1^{er} inmunización (Día 1), 2^{do} inmunización (Día 21), 3^{er} inmunización (Día 36).

7.2 Experimento *in vivo*

7.2.1 Perfil de electroforesis y western blot de sueros de rata administradas con rTBL-1

Las glicosilaciones presentes en las muestras fueron confirmadas con los geles de SDS-PAGE teñidos con reactivo de Schiff. Se identificaron bandas características para FCL y rTBL-1 a 28 y 35 kDa y 30 kDa respectivamente en ambos geles. Del mismo modo, una banda definida en el C+rTBL-1 también fue identificada. Bandas abundantes entre los 45-70 kDa corresponden a albúmina, y cadenas pesadas de anticuerpos y las bandas en 25 kDa son de cadenas ligeras de inmunoglobulinas. Se observaron unas ligeras bandas cerca a los 30 kDa en las muestras de suero de 1, 2 y 3 h (Figura 13A).

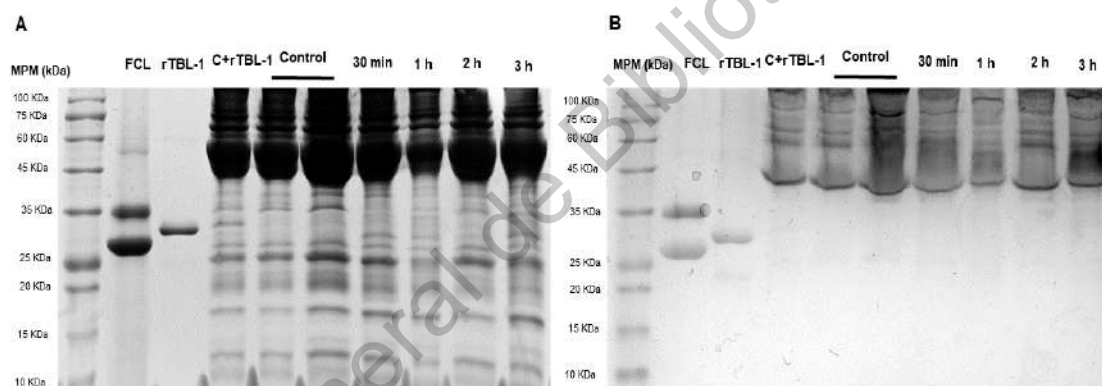


Figura 13. Perfil de electroforesis con tinción con Coomassie y Schiff de sueros de rata después de una única dosis de administración de rTBL-1. A) SDS-PAGE al 15% con azul de Coomassie. B) SDS-PAGE al 15% con reactivo de Schiff. Las columnas corresponden a marcador de peso molecular (MPM), FCL (6 μ g), rTBL-1 (2 μ g), Control +rTBL-1 (0.5 μ g); muestras y controles (\sim 100 μ g). C+rTBL-1: control más rTBL-1 incubados a 37 $^{\circ}$ C por 15 min.

Se realizaron análisis de western blot de los sueros (Figura 14) para la detección de rTBL-1 en las muestras. A \sim 30 kDa y entre 25 y 35 kDa se observaron las bandas características de rTBL-1 y FCL respectivamente. También se detectó rTBL-1 en la muestra de suero control con rTBL-1 (C+rTBL-1). Se identificaron unas ligeras bandas en los sueros control con un peso molecular aparente de \sim 36 kDa. No se

identificó la presencia de rTBL-1 en los sueros desde los 30 min hasta las 6 h. Adicionalmente el anticuerpo anti rTBL-1 fue capaz de detectar FCL (carril 2, Figura 14A).

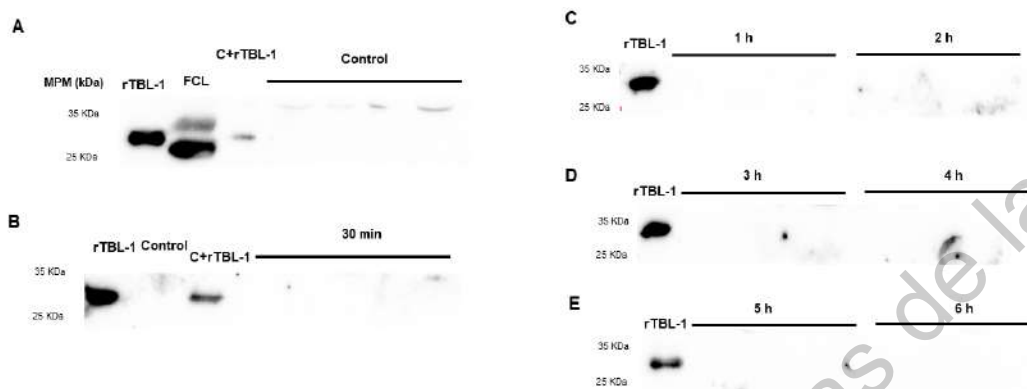


Figura 14. Western blot de sueros de rata administradas con una única dosis de rTBL-1. Las columnas corresponden a marcador de peso molecular (MPM), FCL (6 μ g), rTBL-1 (2 μ g), Control +rTBL-1 (0.5 μ g); muestras y controles (\sim 100 μ g). C+rTBL-1: control más rTBL-1 incubados a 37 $^{\circ}$ C por 15 min. Quimioluminiscencia a 3 min.

7.2.2 Geles de electroforesis y western blot de raspado intestinal y heces de ratas administradas con rTBL-1

La obtención del extracto proteico de intestino se realizó mediante la metodología de (Faure y col., 2002). En la Figura15A se observan los geles de electroforesis y western blot de raspado intestinal, tres bandas a 18, 35 y 45 kDa fueron identificadas como proteínas intestinales. Sin embargo, en el análisis de western Blot no fue posible identificar bandas relacionadas con la rTBL-1. Para el perfil electroforético de heces de rata se encontró un barrido de proteínas desde 28 hasta 75 kDa. Se percibieron ligeras bandas cerca a los 30 kDa en las muestras de heces, no obstante, el western blot no mostró presencia de rTBL-1

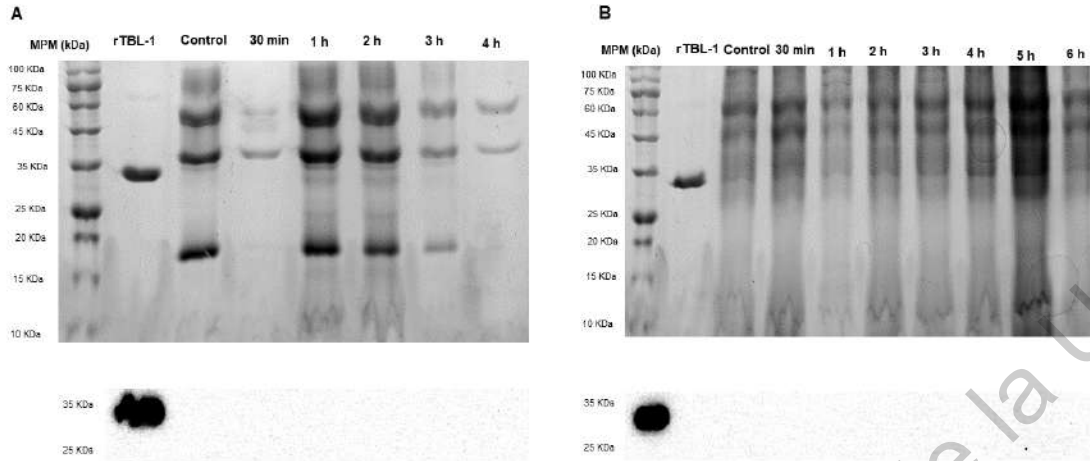


Figura 15. Perfil de electroforesis y western blot de raspado intestinal y heces de rata administradas con una única dosis de rTBL. A) Geles de SDS-PAGE al 15% y Western blot de raspado intestinal. B) Geles de SDS-PAGE al 15% y Western Blot de heces de rata. Carril uno: marcador de peso molecular (MPM), carril dos: rTBL-1 (4 μ g), carril tres-ocho: control y muestras (~12 μ g). Quimioluminiscencia a 3 min.

7.3. Digestión gastrointestinal *in vitro*

7.3.1 Evaluación de la viabilidad del tejido intestinal

La evaluación de la viabilidad después de la incubación en los sacos intestinales invertidos se muestra en la Figura 16. La cuantificación de la glucosa se considera un parámetro funcional debido a la integridad de los transportadores de glucosa (SGLT1 o GLUT2) en el tejido intestinal viable. Cuando la concentración de glucosa es baja en la luz intestinal, solo SGLT1 se ubica en el lado apical para transportarla. No obstante, si la concentración de glucosa es alta, GLUT2 también se ubica en el lado apical para apoyar la absorción de glucosa (Koepsell, 2020). La glucosa entra desde el lado apical al lado basolateral del intestino delgado, lo que confirma la funcionalidad de los transportadores de glucosa y la viabilidad de los sacos intestinales (Chen y col., 2016; Tambe y col., 2019). Pero, si GLUT2 está ubicado en el lado apical, se observa un transporte de glucosa opuesto bajo (Koepsell, 2020) (Figura 16A).

La Figura 16B muestra la viabilidad y el ensayo funcional para el intestino invertido utilizando una concentración alta de glucosa (9.25 ± 0.39 en el lado apical). La concentración de glucosa apical disminuyó (30-90 min) mientras que la concentración basolateral fue opuesta, lo que sugiere un transporte de glucosa apical-basolateral. El flujo de agua es otro parámetro que confirma la viabilidad del tejido. El agua pasa a través de los enterocitos por transporte pasivo (ósmosis), cotransportadores (proteínas de membrana que sirven como canales en la transferencia de agua), proteínas transportadoras (acuaporinas) o transporte paracelular (Zhu y col., 2016). El flujo de agua apical a basolateral produce una ganancia de agua, lo que aumenta el peso del saco intestinal. Por el contrario, el flujo de agua basolateral a apical produce pérdida de peso. Nuestros resultados mostraron una disminución del peso del saco intestinal, lo que indica un movimiento basolateral-apical que incrementó entre 30 y 60 min y con una baja reversión a 90 min.

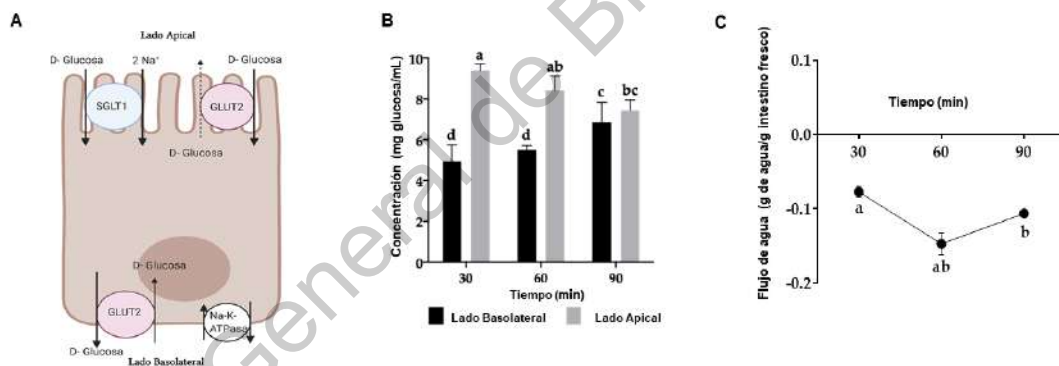


Figura 16. Integridad del yeyuno invertido de ratas Sprague-Dawley durante la absorción en el intestino delgado. A) Esquema del transporte de glucosa en enterocitos. B) Determinación de flujo de glucosa. El yeyuno invertido se incubó en solución tampón de Krebs-Ringer sin glucosa durante 30, 60 y 90 min y la glucosa se determinó a 540 nm. C) Determinación de flujo de agua. El yeyuno invertido se incubó en solución de Krebs-Ringer durante 30, 60 y 90 minutos el agua se calculó como un cambio del peso del saco intestinal. Los resultados se expresan como la media \pm DE de tres experimentos independientes por triplicado del control. Letras pequeñas expresan diferencia significativa entre todas las muestras ($p \leq 0.05$) según la prueba de Tukey-Kramer. El gráfico fue creado con el software BioRender® y adaptado de (Koepsell, 2020).

Las imágenes de yeyuno invertido (Figura 17) teñidas con el procedimiento de hematoxilina y eosina (H&E), mostraron que, durante 30 y 60 min, el tejido intestinal mantuvo su estructura tanto para el control como para las muestras tratadas con rTBL-1. A los 90 min, se observó daño del tejido intestinal, lo que sugiere utilizar este modelo para estudiar la absorción intestinal de matrices derivadas de alimentos hasta 60 min. Por lo tanto, los ensayos posteriores se realizaron hasta ese tiempo.

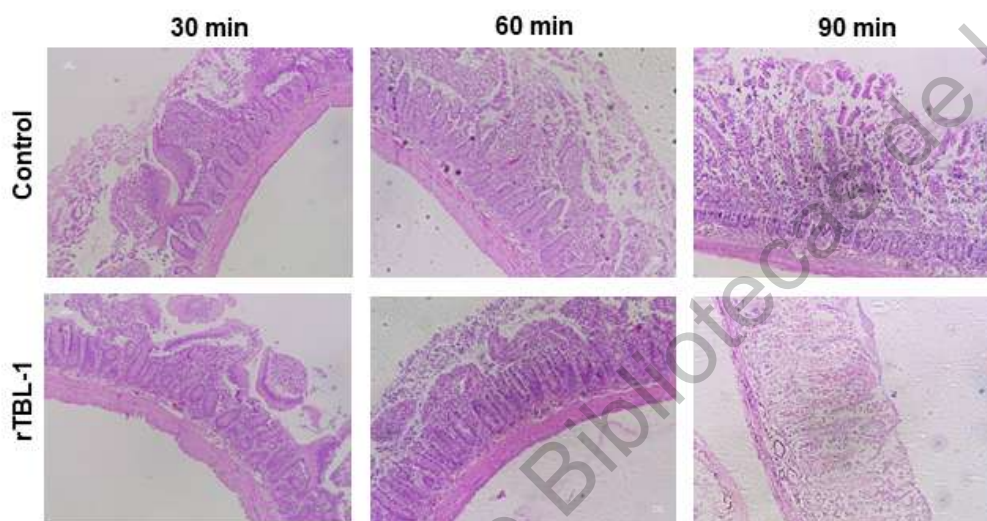


Figura 17. Imágenes representativas de hematoxilina y eosina (H&E) durante la incubación (30, 60 y 90 min). El yeyuno invertido se fijó en formaldehído al 10% y se tiñó con hematoxilina-eosina para análisis histológico (10×). rTBL-1 lectina recombinante de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*). El control corresponde a agua (muestra sin rTBL-1).

7.3.2 Bioaccesibilidad y permeabilidad intestinal de rTBL-1

La Figura 18 muestra el efecto del proceso de digestión en rTBL-1 para el contenido gástrico (CG) y el contenido intestinal (IC) donde la concentración de proteína fue medida después de cada etapa de la digestión *in vitro* para la determinación de bioaccesibilidad y permeabilidad. El CG mostró un 67% de proteína, lo que sugiere que el 33% se digirió en el estómago. La fracción no digerible (FND) (lado apical) mostró 49% a los 30 min y 15% a los 60 min ($p < 0.0001$), lo que sugiere que las enzimas intestinales y pancreáticas digirieron el 52% de la proteína después de 60 min. La fracción digerible (FD) (lado basolateral) mostró 45% y 43% de contenido

de proteína después de 30 y 60 min de digestión intestinal, respectivamente (Figura 18^a), sugiriendo la absorción o internalización de la proteína.

El coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) (Figura 18B) mostró que la tasa de permeabilidad de las proteínas disminuyó 2.15 veces para el flujo apical-basolateral ($p > 0.05$) y 6.4 veces para el flujo basolateral-apical entre 30 y 60 min ($p > 0.05$). Además, la relación de flujo (ER) disminuyó entre 30 y 60 minutos de incubación intestinal ($p > 0.05$).

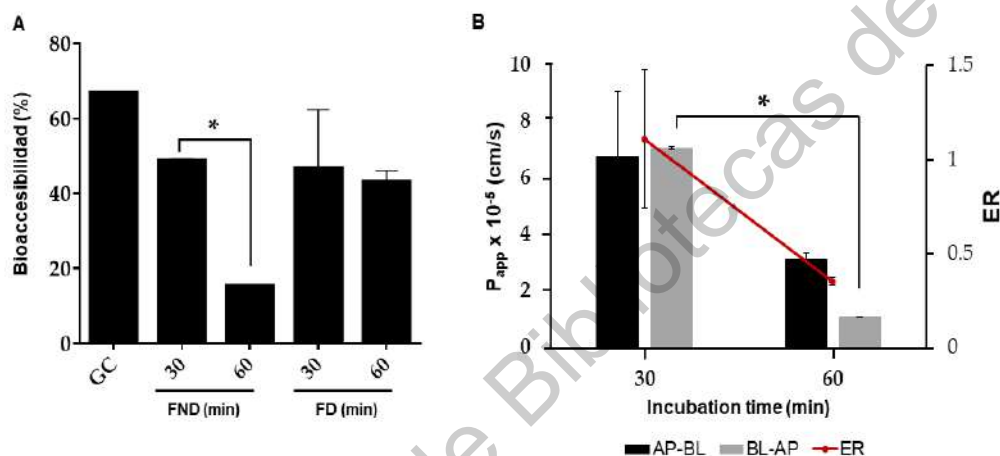


Figura 18. Efectos de la digestión simulada *in vitro/ex vivo* en rTBL-1. Se llevó a cabo una digestión *in vitro* gástrica e intestinal simultánea de rTBL-1 y se determinó la proteína a los 30 y 60 min (280 nm). A) Bioaccesibilidad. B) Coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) y Relación de flujo (ER) durante la incubación intestinal. Los resultados se expresan como la media \pm DE de tres experimentos independientes por triplicado. Letras diferentes expresan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) según la prueba de t-student para cada par de datos entre 30 y 60 min. AP, lado apical; BL, lado basolateral; GC, contenido gástrico; NDF, fracción no digerible; DF, fracción digerible; P_{app} , coeficiente de permeabilidad aparente.

7.4 Perfil electroforético y análisis de western blot de rTBL-1 a través de la digestión *in vitro/ex vivo*

La rTBL-1 se monitoreó usando electroforesis SDS-PAGE en todas las etapas del proceso gastrointestinal. La Figura 19 muestra los perfiles electroforéticos y western blot del FND y el FD durante la digestión gastrointestinal *in vitro/ex vivo*. La rTBL-1 tiene un peso molecular aparente de 30 kDa observado en el CG, lo que indica

resistencia a enzimas presentes en el contenido gástrico. También se detectaron bandas que corresponden a enzimas como la pepsina (37 kDa, estrella azul) en CG y varias bandas correspondientes a los productos digeridos de la pancreatina en la digestión intestinal (FND y FD). Sin embargo, las bandas de ~24, 18 y 13 kDa se identificaron solo en las muestras digerida en FND y FD (recuadros azules). Dado que también se encontraron bandas débiles cerca de ~30 kDa en toda la etapa intestinal de la muestra digerida (Figura 19A), se realizó un análisis western blot para ambos geles, para confirmar la presencia de rTBL-1 (Figura 19B). Como era de esperar, no se observaron bandas en el control, pero si en el CG y el NDF de las muestras digeridas. También se observaron bandas de baja intensidad en la DF (flechas azules), lo que sugiere una posible internalización de la rTBL-1.

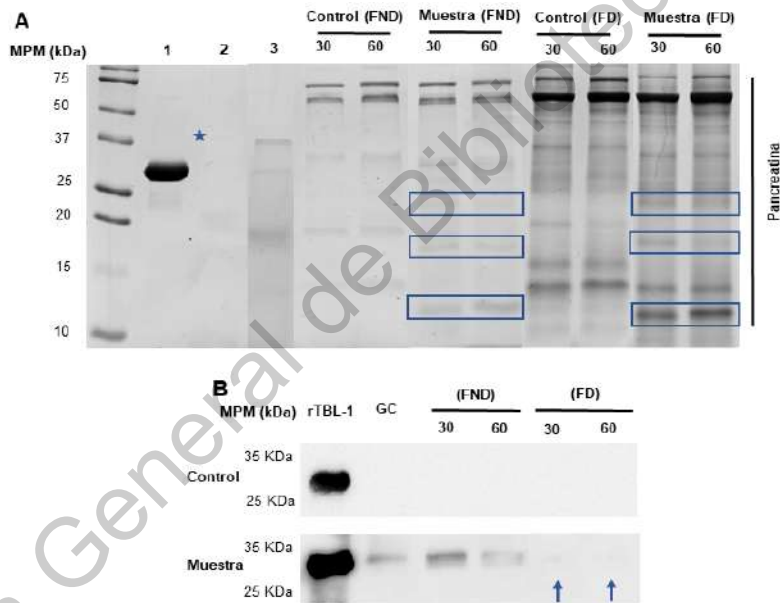


Figura 19. Perfil electroforético y western blot para el efecto gastrointestinal sobre rTBL-1. A) SDS-PAGE al 13% teñido con azul de Coomassie. (1) rTBL-1, (2) control de contenido gástrico (CG), (3) muestra contenido gástrico (CG), fracción no digestible (FND), fracción digestible (FD). FND y FD obtenidos después de la incubación por 30 y 60 min. B) Western blot para rTBL-1 de muestras digeridas. Las columnas corresponden a marcador de peso molecular (MPM), rTBL-1 (2 µg), CG (~60 µg de control y muestra), FND (~60 µg de control y muestra) y FD (~60 µg de control y muestra). El control es agua. La estrella azul muestra la presencia de pepsina, los recuadros azules indican bandas de proteínas derivadas del proceso de digestión y las flechas azules rTBL-1.

7.5 Análisis de rTBL-1 y muestras digeridas por medio de UHPLC-ESI-QTOF/MS

La Figura 20 muestra los espectros de masas de la rTBL-1. La corriente iónica total (TIC) presenta varios picos en diferentes tiempos de retención (2.68, 14.63, 19.78, 21.02 y 25.17 min) (Figura 21A). El pico a los 2.68 min correspondió a una proteína la cual fue analizada mediante espectrometría de masas (Figura 21B), con un pico principal a 917.9 m/z. El espectro de deconvolución de este pico se muestra en la Figura 21C en un solo pico con una masa molecular de 29340.6016 Da.

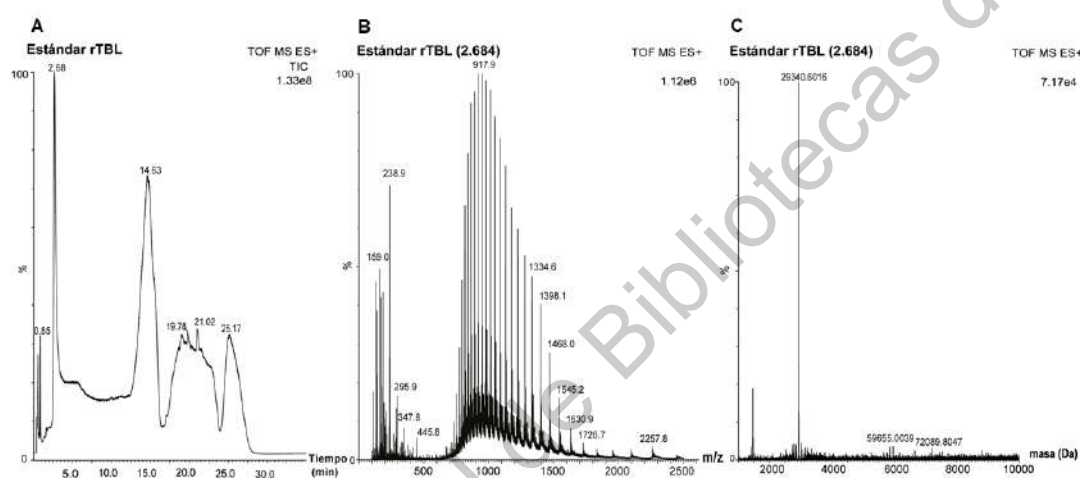


Figura 20. Espectro de masas de lectina recombinante (rTBL-1). Intensidad relativa (%) es mostrado en cada gráfico. A) TIC (Corriente iónica total) de rTBL-1. B) Espectro de masas con rango 100-2500 m/z. C) Espectro de deconvolución con rango 10000: 100000.

El análisis de espectrometría de masas de CG, FND y rTBL-1 se muestra en la Figura 21. Los análisis de TIC para las muestras de CG, FND a 30 y 60 min mostraron un pico cercano al mismo tiempo de retención correspondiente al pico de rTBL-1 (2.68 min). Sin embargo, los espectros de masas de todas las muestras digeridas en el rango de 0-1175 m/z mostraron más de una proteína en el tiempo de retención de 2.761 min. Los recuadros azules en las imágenes de CG y FND de 30 min mostraron un perfil de proteína de menor intensidad. Los espectros de deconvolución para esta zona para CG (caja roja) mostraron varios picos que coincidían con las isoformas de pepsina (36762 y 34966 Da).

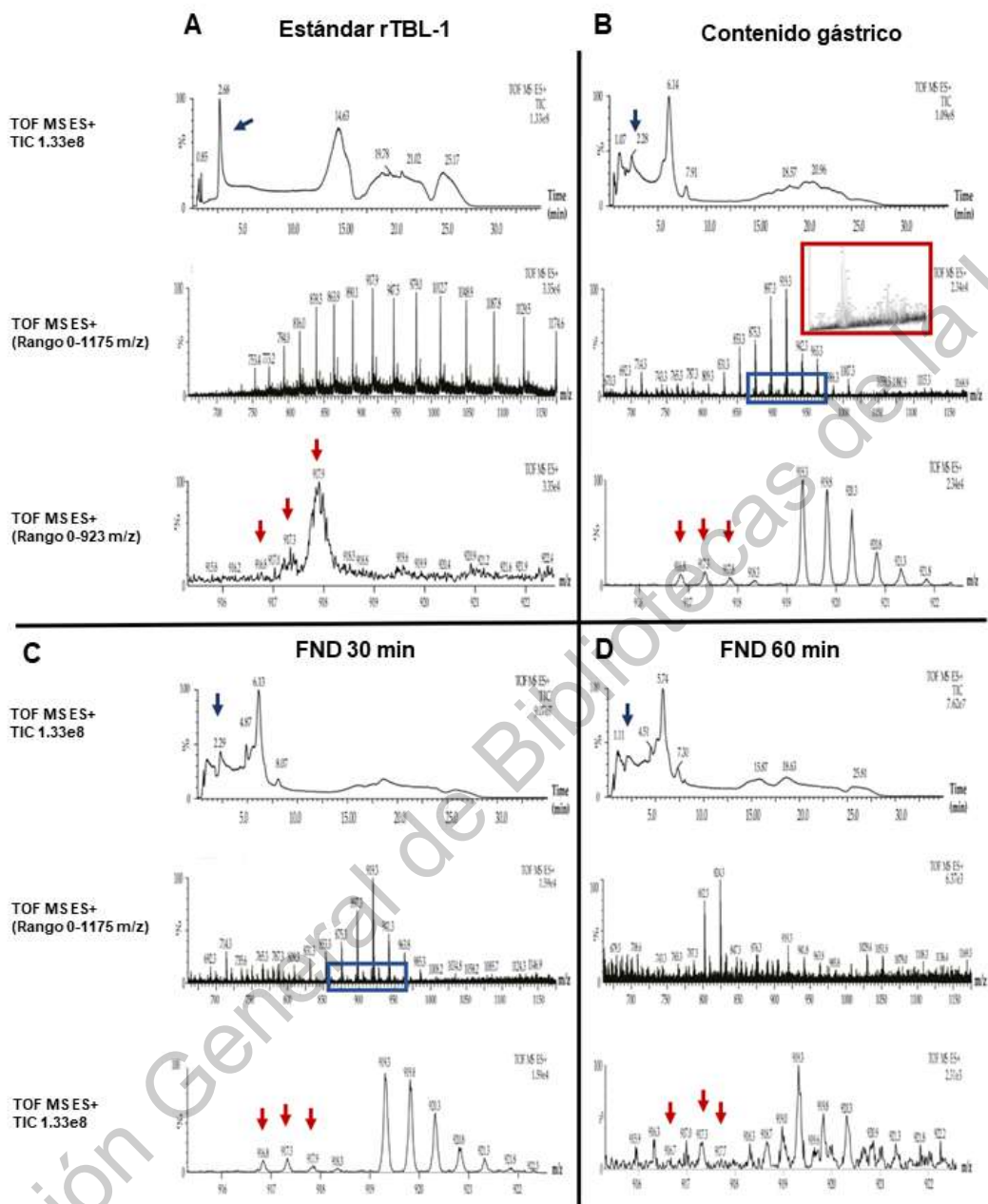


Figura 21. Espectrometría de masas para rTBL-1 y muestras de la digestión gastrointestinal. A) rTBL-1. B) contenido gástrico (CG). C) Fracción no digerible (FND) 30 min. D) Fracción no digerible (FND) 60 min. Las flechas azules muestran el tiempo de retención de rTBL-1. Los recuadros azules muestran el perfil de proteínas de rTBL-1 en el rango de 0-1175 m/z. El cuadro rojo muestra el espectro de deconvolución para la muestra de contenido gástrico. Las flechas rojas muestran los picos correspondientes a rTBL-1 en el rango 0-923 m/z. Los resultados se muestran como intensidad relativa (%).

Se tomó una aproximación en esta zona dentro del rango 0-923 m/z, donde se detectaron los picos de rTBL-1 (916.8, 917.3, 917.9 m/z) en el control y se detectaron los mismos picos para CG (916.8, 917.3 y 917.8 m/z), FND a 30 min (916.8, 917.3 y 917.9 m/z), y FND a 60 min (916.7, 917.3 y 917.7 m/z). No fue posible mostrar los espectros de deconvolución de las zonas extendidas porque no se detectaron suficientes picos para este proceso. Debido al límite de detección del instrumento (100 µg /mL de proteína pura) y la baja cantidad de proteína intacta en la fracción digerible (FD), no fue posible obtener resultados.

7.6 Análisis inmunohistoquímico

La Figura 22 muestra imágenes de inmunohistoquímica para rTBL-1 en el saco intestinal invertido (yeyuno) usando el anticuerpo policlonal anti-rTBL-1 a los 30 y 60 min de la digestión intestinal. A diferencia del control, se observó una señal marrón en las células epiteliales de las muestras tratadas con rTBL-1. Se muestran imágenes amplificadas (63x) para mejorar la visualización de la señal rTBL-1 (pequeños recuadros).

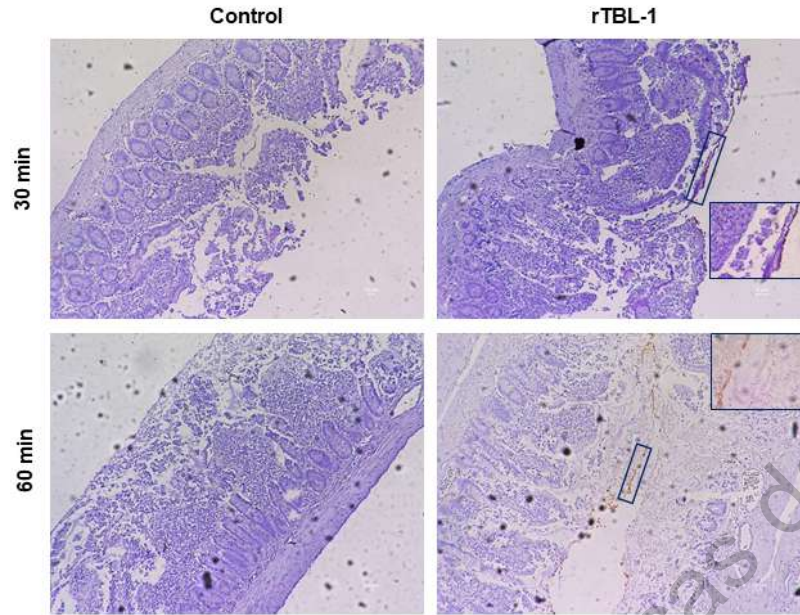


Figura 22. Imágenes de inmunohistoquímicas de yeyuno invertido de rata después de la incubación con rTBL-1. Se observan cortes intestinales del blanco (muestra sin rTBL-1) y tratados con la rTBL-1 en los tres tiempos de incubación (30 y 60 min). Se tomaron imágenes (cortes de 3 μ m) a 10x y 63x.

7.7 Evaluación *in silico* de la interacción rTBL-1 con carbohidratos o derivados del intestino delgado

El Cuadro 4 y la Figura 23 muestran las posibles interacciones *in silico* entre rTBL-1 y carbohidratos representativos del intestino delgado o derivados de carbohidratos como β -D-manosa (Figura 23A), N-acetil- β -D glucosamina (Figura 24B), ácido siálico (Figura 23C), N-acetil-galactosamina (Figura 23D), β -D- galactosa (Figura 23E), α -D-glucosa (Figura 23F) y α -L-Fucosa (Figura 23G). Los datos se obtuvieron después de la simulación de acoplamiento molecular utilizando AutoDock Vina.

Cuadro 3. Energía libre de unión entre rTBL-1 y sacáridos o derivados.

El ácido siálico y la N-acetil-glucosamina exhibieron la mayor afinidad de unión, como lo indican las energías de unión más bajas (-6.70 y -6.10 kcal/mol). Por el contrario, tanto la manosa como la glucosa mostraron las interacciones más bajas (-5.40 kcal/mol). Todos los ligandos mostraron enlaces de hidrógeno convencionales, pero la N-acetil-galactosamina mostró enlaces carbono-hidrógeno adicionales e interacciones desfavorables, y la α -D-glucosa mostró una interacción pi-sigma, enlaces carbono-hidrógeno y enlaces de Van der Waals.

Ligandos	Energías de unión (kcal/mol)	Ligandos	Energías de unión (kcal/mol)
β-D-Manosa	-5.4	β-D-Galactosa	-5.60
	-5.4		-5.40
	-5.3		-5.50
N-acetil β-D glucosamina	-6.1	α-L-Fucosa	-5.4
	-5.9		-5.4
	-5.9		-5.4
Ácido siálico	-6.7	β-D-Glucosa	-5.4
	-6.3		-5.4
	-6.3		-5.3
N-acetil galactosamina	-6.1		
	-5.8		
	-5.6		

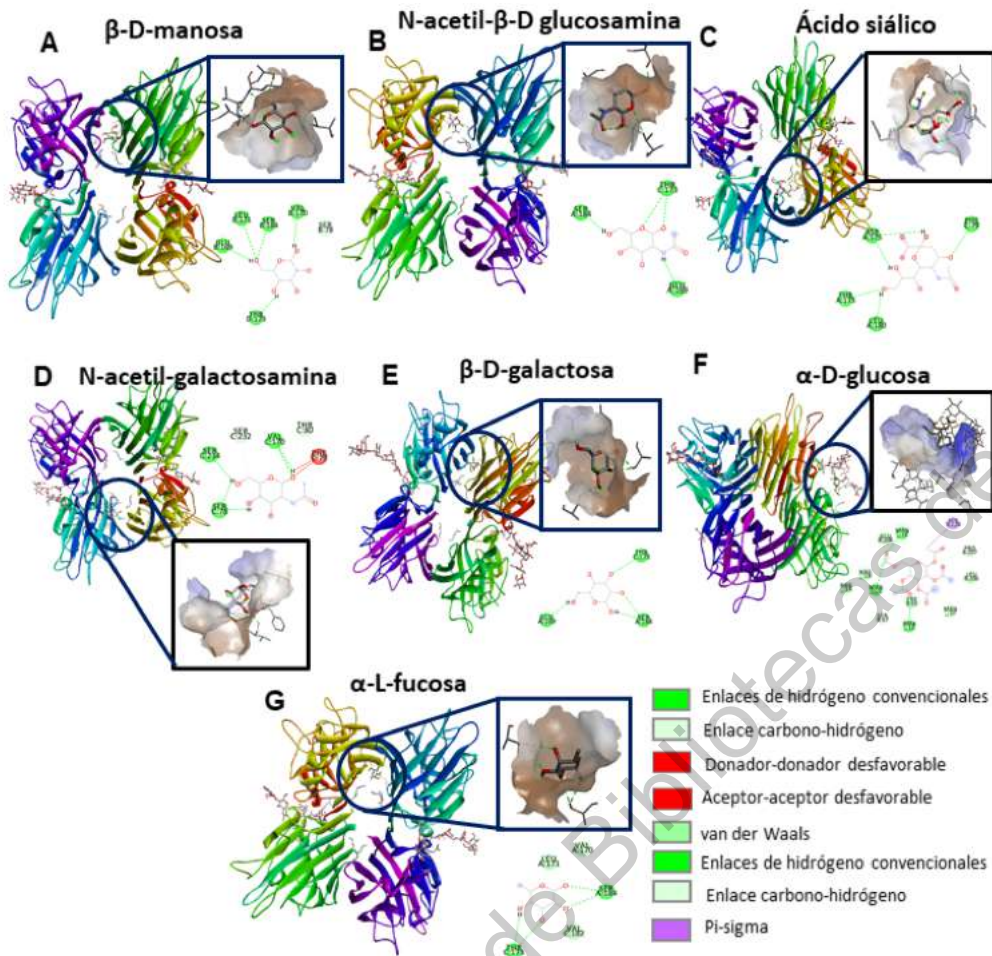


Figura 23. Interacciones potenciales in silico entre rTBL-1 y carbohidratos o derivados intestinales. Interacciones con A) β -D-manosa; B) N-acetil- β -D- glucosamina; C) ácido siálico; D) N-acetil-galactosamina; E) β -D-galactosa; F) α -D-glucosa; G) α -L-fucosa. El gráfico 2D indica posibles interacciones químicas con aminoácidos seleccionados de rTBL-1.

VIII. DISCUSION

Las lectinas de frijol Tépari son proteínas valiosas que han exhibido efectos citotóxicos diferenciales *in vitro* sobre las células cancerígenas, inducción de apoptosis por medio de caspasas e inhibición de la tumorigénesis temprana *in vivo* relacionada con p53, la vía Akt y la actividad de caspasa-3 (Moreno-Celis y col., 2017). Sin embargo, se observaron efectos intestinales adversos como atrofia, integridad afectada y disminución de la digestibilidad de las proteínas (Alatorre-Cruz y col., 2018; Pita-López y col., 2020) principalmente debido a la capacidad de las lectinas para actuar como alérgenos tóxicos y hemaglutininas (He y col., 2018). Dichos efectos indican la necesidad de realizar más investigaciones sobre la dinámica de su degradación e interacción digestiva para comprender su potencial de absorción y su capacidad para ejercer los efectos biológicos esperados en los órganos diana.

Las lectinas pueden monitorizarse utilizando técnicas adecuadas para detectar proteínas completas o péptidos en tejidos y líquidos (Crommelin y col., 2013; Crotti y col., 2017; Vugmeyster, 2012). Por ejemplo, parámetros farmacocinéticos de ABNOVA VISCUM Fraxini®, un fármaco contra cáncer que contiene lectina de muérdago (*Viscum album* L.) (20 µg/mL), se calcularon utilizando un ensayo de ELISA acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Huber y col., 2010). Se han desarrollado anticuerpos policlonales para detectar lectinas de *Sclerotium rolfsii* administradas vía intraperitoneal mediante ELISA indirecto (Anupama y col., 2017). Previamente, la presencia de lectinas de frijol Tépari (FCL) se determinó por la transferencia Western usando un anticuerpo anti-fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (Cat. No. AS-2300, Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA) con baja especificidad (Ferriz-Martínez y col., 2015) y posteriormente, se desarrolló un anticuerpo policlonal contra FCL. Recientemente, como era necesario producir una lectina recombinante de frijol Tépari (rTBL-1) utilizando levadura *Pichia pastoris* (Martínez-Alarcón y col., 2020) y fue necesario desarrollar un anticuerpo policlonal específico contra la lectina recombinante (rTBL-1) para su detección en tejidos específicos, suero y fluidos en todo el tracto

gastrointestinal. rTBL-1 administrada en una única dosis por vía intragástrica no fue detectada en suero, raspado intestinal y heces por medio del anticuerpo desarrollado. De manera similar, las lectinas de *Griffithsia* sp. (GRFT) se monitorearon en suero y heces mediante técnicas inmunológicas, después de una administración oral, intravenosa y subcutánea (Barton y col., 2016) y no fue posible detectar niveles de lectina en suero, sin embargo, encontraron aproximadamente el 1% de la concentración inicial de lectina en heces de rata, por lo tanto, GRFT podría ser resistente a la degradación proteolítica o ser parcialmente absorbida.

Es bien conocido que las lectinas son proteínas muy resistentes a la digestión porque pueden unirse a los receptores de las células epiteliales intestinales según el tamaño de la lectina, la carga, la presencia de grupos funcionales seleccionados, el patrón de glicosilación celular y las estructuras proteicas secundarias y terciarias (Crommelin y col., 2013; Lajolo y Genovese, 2002). Además, las lectinas resisten la degradación bacteriana (Pusztai y Bardocz, 1996), sobreviven a las condiciones del tracto digestivo y permanecen intactas en su forma biológica e inmunológica (Lajolo y Genovese, 2002). En un ensayo *in vivo*, el 78% de una lectina administrada intragástricamente procedente de frijoles Kintoki (*Phaseolus vulgaris* variedad Kintoki) se encontró en el tracto gastrointestinal después de 24 h (Hara y col., 1984). Se recuperó hasta el 90% de la Concanavalina A en las heces de rata después de 4 h después de la administración oral, y la lectina siguió siendo detectable durante 4 días (Nakata y Kimura, 1985). Las lectinas de frijol Tépari (FCL) resistieron las condiciones del tracto digestivo después de una administración intragástrica a ratas Sprague Dawley, detectadas indirectamente a las 72 h en heces por actividad de aglutinación (Ferriz-Martínez y col., 2015).

La digestión gastrointestinal *in vitro* se ha utilizado para evaluar el proceso digestivo de algunos alimentos y matrices derivadas de alimentos, incluidas muestras de proteínas (Cabrera-Ramírez y col., 2020). El uso de la técnica del saco intestinal invertido es una opción para estudiar la interacción de los componentes de los alimentos y preservar la viabilidad intestinal. La integridad del tejido es fundamental para estudiar la interacción de las lectinas en el saco intestinal invertido,

considerando la afinidad de las lectinas por los receptores glicosilados intestinales (Martínez-Alarcón y col., 2020). Los ensayos de transporte de agua y glucosa confirmaron la viabilidad del saco intestinal invertido hasta 90 min. Sin embargo, los ensayos histológicos y el transporte de agua mostraron que la integridad intestinal se vio afectada después de 90 minutos de incubación. Por tanto, la funcionalidad del tejido estaba garantizada hasta los 60 min.

La bioaccesibilidad de la proteína se ensayó determinando la proporción de concentración de proteínas en cada paso de la digestión gastrointestinal. Se observó que la bioaccesibilidad de rTBL-1 disminuyó en la luz intestinal (FND) y aumentó en el lado basolateral (FD), sugiriendo una digestión parcial de rTBL-1 que puede incluir la absorción de algunos péptidos o la internalización de la proteína completa. Mientras tanto, los coeficientes de permeabilidad aparente indicaron que la rTBL-1 fue absorbida o internalizada parcialmente. Los valores de la permeabilidad aparente permiten la predicción de baja ($P_{app} < 1 \times 10^{-7}$ cm/s) y alta ($P_{app} > 1 \times 10^{-6}$ cm/s), basándose en la cinética de permeabilidad de las células CaCo-2 originales (Artursson y col., 2001). Aunque no se observaron diferencias significativas, el coeficiente de permeabilidad aparente para el flujo apical-basolateral disminuyó 2.5 veces. Con base en estos valores, rTBL-1 provoca una alta permeabilidad de la membrana, coincidiendo con el efecto de mayor permeabilidad derivado de lectinas como las lectinas de frijol rojo crudo (*Phaseolus vulgaris* L.) (Ramadass y col., 2010). Respecto a la relación de flujo (RE), se sabe que un valor entre 1.5-2.0 significa que la tasa de flujo es dependiente de la concentración y saturable, por el contrario un RE < 1.5 se realiza por vías no saturables (Hubatsch y col., 2007). Encontramos que RE disminuyó de 30 a 60 min, lo que sugiere un mecanismo no saturable. Se ha demostrado que la mayoría de péptidos y proteínas pueden ser absorbidos por el mecanismo de endocitosis (Pereira y col., 2016). No obstante, se ha sugerido la participación de la glicoproteína P (P-gp), un transportador de salida en el transporte bidireccional *in vitro* de fármacos, proteínas y péptidos desde el lado apical al basolateral y viceversa (Awortwe y col., 2014; Bansal y col., 2009). Particularmente para los aminoácidos y dipéptidos, existen otros transportadores bidireccionales como

GLYT1, CAT1, SNAT2, PEPT-1 y PEPT-2, que dependen del gradiente de protones transmembrana, la concentración luminal de aminoácidos y el tráfico celular (Antunes y col., 2012; Kiela y Ghishan, 2016).

El perfil proteico de las muestras digeridas se estudió mediante SDS-PAGE, western blot e inmunohistoquímica en el contenido gástrico e intestinal. Se observaron bandas proteicas diferenciales tanto en el FND como en el FD, sugiriendo un proceso digestivo y una potencial absorción. La internalización de la proteína completa podría ser posible ya que se detectó en la FD mediante western blot. Adicionalmente, como se muestra en los análisis de espectrometría de masas la presencia de rTBL-1 en baja concentración en el contenido gástrico y en el FND sugiere la resistencia de las proteínas al proceso de digestión. Sin embargo, no fue posible determinar los péptidos residuales debido al alto contenido de proteínas de las enzimas digestivas. Este resultado concuerda con el valor de resistencia a la digestión gástrica (procedimiento de digestión simulada INFOGEST) de las proteínas de fitohemaglutinina y faseolina de frijoles negros (*P. vulgaris* L.), determinada por electroforesis SDS-PAGE y detección por HPLC-MS, con una degradación parcial a nivel intestinal (Sousa y col., 2020). Dimitrijevic y col. (2010) también reportaron lectinas intactas de plátano después de la digestión gástrica, pero degradación gradual en la etapa intestinal. Durante la digestión intestinal, las lectinas se pueden unir a los carbohidratos libres o glicoconjugados de las membranas celulares mediante un dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC), formado por residuos conservados que afectan su conformación y función (Dodd y Drickamer, 2001). La selectividad DRC se modifica por la posibilidad de interactuar a través de enlaces de hidrógeno con grupos hidroxilo de carbohidratos y fuerzas de van der Waals (Martínez-Alarcón y col., 2018). Fue posible detectar la rTBL-1 por inmunoensayo en el lado apical del tejido intestinal, sugiriendo una interacción entre la lectina y la superficie celular. Entre los principales glicoconjugados, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, galactosa, fucosa y ácido siálico constituyen el 77.5% del moco intestinal, formando una capa continua y protectora con mucinas. Las diferencias en el patrón de glicosilación representan una amplia variedad de sitios de unión potenciales para la absorción intestinal de

lectinas (Gabor y col., 2004). Para confirmar las posibles interacciones entre rTBL-1 y los receptores del intestino delgado, se determinaron interacciones *in-silico*. rTBL-1 se sometió a una digestión *in silico* adicional, pero ninguno de los péptidos generados fue lo suficientemente grande para realizar una interacción (masa del péptido <500 Da, datos no mostrados). Estudios previos usando un arreglo de glicanos y calorimetría de titulación isotérmica mostró que rTBL-1 reconoce 14 β 1-6 ramificados N-glicanos independiente de su tamaño, donde β -D-galactosa, β -D-N acetil glucosamina, β -D manosa, α -L fucosa y ácido siálico fueron parte de los glicanos reconocidos (Martínez-Alarcón y col., 2020). El ácido siálico y la N-acetilglucosamina exhibieron la mayor afinidad de unión, como lo indican las energías de unión más bajas, lo que sugiere que la rTBL-1 podría interactuar directamente con los componentes de la membrana y su posible internalización, como lo muestran los análisis de western blot, inmunohistoquímica y espectrometría de masas. Se ha demostrado en experimentos *in vitro*, que los péptidos ricos en prolina resisten las enzimas digestivas del borde en el cepillo intestinales (peptidasas), contribuyendo a que atraviesen la barrera intestinal (Picariello y col., 2013; Tagliazucchi y col., 2015). Los receptores glicosilados también apoyan la absorción intestinal de lectinas. Por ejemplo, los receptores de N-acetil-glucosamina o asialofetina contribuyen al reconocimiento intestinal de la Concanavalina A y la aglutinina del germen de trigo, seguido de la internalización por endocitosis celular, sin embargo, las lectinas exhiben un patrón de unión no selectivo al epitelio. Se ha demostrado que algunas lectinas se unen a la manosa de las células epiteliales de yeyuno (Gabor y col., 2004). Una vez saturados los receptores de lectina disponibles, la lectina restante se elimina de forma constante en un proceso no lineal (Krippendorff y col., 2009). Algunos ensayos *in vitro* mostraron la capacidad de las lectinas para unirse irreversiblemente a la superficie de las células epiteliales debido a los componentes básicos basados en carbohidratos (Ramadass y col., 2010).

Los resultados anteriores permiten mostrar, por primera vez, que la rTBL-1, y posiblemente las lectinas nativas de frijol Tépari, presenta una dinámica de degradación parcial en el tracto gastrointestinal que le permite permanecer parcialmente intacta y, por otro lado, absorberse o internalizarse en el enterocito.

IX. CONCLUSIONES

En este estudio se desarrolló por primera vez un anticuerpo policlonal contra la lectina recombinante del frijol Tépari (rTBL) que permitió su seguimiento selectivo a través de la digestión gastrointestinal *in vitro* utilizando tejidos viables *ex vivo*. Los valores de bioaccesibilidad de rTBL-1 en contenido gástrico mostraron una alta resistencia a la digestión gástrica. Sin embargo, la bioaccesibilidad intestinal de rTBL-1 disminuyó en el lado apical después de 60 min de incubación y aumentó en el lado basolateral a partir de 30 min sugiriendo un proceso de absorción o internalización proteica. Los altos coeficientes de permeabilidad aparente de rTBL-1 durante la incubación intestinal sugirieron que rTBL-1 o péptidos derivados pueden atravesar la membrana intestinal del enterocito. Estos resultados, junto con los ensayos de SDS-PAGE y western blot sugieren absorción parcial o internalización de rTBL-1. El análisis de MS proporcionó información sobre la presencia de rTBL-1 intacta en el contenido gástrico y en el lado apical intestinal (fracción no digerible), sin embargo, la presencia de las enzimas digestivas afectó significativamente su identificación. Además, la rTBL-1 podría interactuar potencialmente con los receptores intestinales, como lo indica el análisis inmunohistoquímico y el enfoque *in silico*, principalmente con ácido siálico y N-acetil glucosamina, dos de los carbohidratos intestinales más abundantes. Los resultados del experimento *in vivo* demuestran que la cantidad de proteína es muy poca, por lo que no fue posible detectarla en suero o heces, sin embargo, los resultados observados de la simulación del proceso gastrointestinal sugieren que la rTBL-1 es principalmente absorbida y posiblemente una pequeña cantidad es internalizada. Otros estudios se centrarán en la purificación de rTBL-1 a partir de muestras digeridas y en fluidos para su identificación a través de espectrometría de masas y también la identificación de los péptidos residuales y su purificación para evaluar sus posibles efectos bioactivos. Además, será importante conocer más sobre las interacciones de la rTBL-1 con moléculas membranales, así como sobre la ruta de internalización de rTBL-1 para determinar sus parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos como molécula anticancerígena.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguillón-Osma, J., Luzardo-Ocampo, I., Cuellar-Nuñez, M. L., Maldonado-Celis, M. E., Loango-Chamorro, N., & Campos-Vega, R. (2019). Impact of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and antioxidant capacity of bioactive compounds from Passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves and juice extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 43(7), e12879. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12879>
- Aguillón-Osma, J., Luzardo-Ocampo, I., Cuellar-Nuñez, M. L., Maldonado-Celis, M. E., Loango-Chamorro, N., & Campos-Vega, R. (2019). Impact of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and antioxidant capacity of bioactive compounds from Passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves and juice extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 43(7), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12879>
- Alam, M. A., Al-Jenoobi, F. I., & Al-mohizea, A. M. (2012). Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: limitations and applications. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(3), 326–336. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01391.x>
- Alatorre-Cruz, J. M., Pita-López, W., López-Reyes, R. G., Ferriz-Martínez, R. A., Cervantes-Jiménez, R., de Jesús Guerrero Carrillo, M., Vargas, P. J. A., López-Herrera, G., Rodríguez-Méndez, A. J., Zamora-Arroyo, A., Gutiérrez-Sánchez, H., de Souza, T. R., Blanco-Labra, A., & García-Gasca, T. (2018). Effects of intragastrically-administered Tepary bean lectins on digestive and immune organs: Preclinical evaluation. *Toxicology Reports*, 5(October 2017), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.008>
- Antunes, F., Andrade, F., Ferreira, D., Mørck Nielsen, H., & Sarmiento, B. (2012). Models to predict intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins. *Current Drug Metabolism*, 14(1), 4–20. <https://doi.org/10.2174/13892002130103>
- Anupama, S., Preeti, L., Mamta, S., Kamal, P., Sanjay, B., Arvind D, I., Vikram, G., D.K, R., Lu-Gang, Y., M.R, J., Bale M, S., & Shashikala R, I. (2017). Pharmacokinetics, biodistribution and antitumour effects of *Sclerotium rolfsii* lectin in mice. *Oncology Reports*, 37(5), 2803–2810. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5545>
- Araújo, C. V., Lazzarotto, C. R., Aquino, C. C., Figueiredo, I. L., Costa, T. B., de Oliveira Alves, L. A., Ribeiro, R. A., Bertolini, L. R., Lima, A. A. M., Brito, G. A. C., & Oriá, R. B. (2015). Alanyl-glutamine attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in apolipoprotein E-deficient mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(6), 493–501. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20144360>
- Arnold, Y. E., Thorens, J., Bernard, S., & Kalia, Y. N. (2019). Drug transport across porcine intestine using an ussing chamber system: Regional differences and the effect of P-glycoprotein and CYP3A4 activity on drug absorption. *Pharmaceutics*, 11(3), 1–23. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030139>
- Artursson, P., Palm, K., & Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*,

- 46(1), 27–43. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00128-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00128-9)
- Awortwe, C., Fasinu, P. S., & Rosenkranz, B. (2014). Application of Caco-2 Cell line in Herb-Drug interaction studies: Current approaches and challenges. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 17(1), 1. <https://doi.org/10.18433/J30K63>
- Bansal, T., Mishra, G., Jaggi, M., Khar, R. K., & Talegaonkar, S. (2009). Effect of P-glycoprotein inhibitor, verapamil, on oral bioavailability and pharmacokinetics of irinotecan in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36(4–5), 580–590. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.12.005>
- Barba, F. J., Mariutti, L. R. B., Bragagnolo, N., Mercadante, A. Z., Barbosa-Cánovas, G. V., & Orlén, V. (2017). Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.006>
- Barnes, D. A., & Thorner, J. (1986). Genetic manipulation of *Saccharomyces cerevisiae* by use of the LYS2 gene. *Molecular and Cellular Biology*, 6(8), 2828–2838. <https://doi.org/10.1128/MCB.6.8.2828>
- Barton, C., Kouokam, J., Hurst, H., & Palmer, K. (2016). Pharmacokinetics of the Antiviral Lectin Griffithsin Administered by Different Routes Indicates Multiple Potential Uses. *Viruses*, 8(12), 331. <https://doi.org/10.3390/v8120331>
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T. G., Bertoni, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W252–W258. <https://doi.org/10.1093/nar/gku340>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cabrera-Ramírez, A. H., Luzardo-Ocampo, I., Ramírez-Jiménez, A. K., Morales-Sánchez, E., Campos-Vega, R., & Gaytán-Martínez, M. (2020). Effect of the nixtamalization process on the protein bioaccessibility of white and red sorghum flours during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 134, 109234. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109234>
- Caicedo-Lopez, L. H., Luzardo-Ocampo, I., Cuellar-Nuñez, M. L. L., Campos-Vega, R., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2019). Effect of the in vitro gastrointestinal digestion on free-phenolic compounds and mono/oligosaccharides from *Moringa oleifera* leaves: Bioaccessibility, intestinal permeability and antioxidant capacity. *Food Research International*, 120(66), 631–642. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.017>
- Camacho Barrón, M., & González de Mejía, E. (1998). Comparative study of enzymes related to proline metabolism in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*) under drought and irrigated conditions, and various urea concentrations. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 52(2), 119–132. <https://doi.org/10.1023/a:1008011529258>
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., & Oomah, B. D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.):

- Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, 77, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.024>
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45–66. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>
- Chen, L., Tuo, B., & Dong, H. (2016). Regulation of Intestinal Glucose Absorption by Ion Channels and Transporters. *Nutrients*, 8(1), 43. <https://doi.org/10.3390/nu8010043>
- Córdoba Ruiz, H., Algecira Enciso, N., Poutou Piñales, R., & Barrera Avellaneda, L. (2003). Revisión de tema: pichia pastoris, una alternativa para la producción de glicoproteínas humanas de uso terapéutico. Estrategias de fermentación. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 73–84.
- Crommelin, D. J. A., Sindelar, R. D., & Meibohm, B. (2013). Pharmaceutical Biotechnology. In D. J. A. Crommelin, R. D. Sindelar, & B. Meibohm (Eds.), *Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications, Fourth Edition*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6486-0>
- Crotti, S., Posocco, B., Marangon, E., Nitti, D., Toffoli, G., & Agostini, M. (2017). Mass spectrometry in the pharmacokinetic studies of anticancer natural products. *Mass Spectrometry Reviews*, 36(2), 213–251. <https://doi.org/10.1002/mas.21478>
- D'Antuono, I., Garbetta, A., Linsalata, V., Minervini, F., & Cardinali, A. (2015). Polyphenols from artichoke heads (*Cynara cardunculus* (L.) subsp. *scolymus* Hayek): in vitro bio-accessibility, intestinal uptake and bioavailability. *Food & Function*, 6(4), 1268–1277. <https://doi.org/10.1039/C5FO00137D>
- 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. <https://doi.org/10.1080/10408390591034445>
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
- Dena Beltran, J. L. (2020). *Evaluación del mecanismo de acción de una lectina recombinante del frijol Tépari (Phaseolus acutifolius) sobre células de cáncer de colon*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Dodd, R. B., & Drickamer, K. (2001). Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology*, 11(5), 71R–79R. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.5.71R>
- Drake, P. M. W., Barbi, T., Sexton, A., McGowan, E., Stadlmann, J., Navarre, C., Paul, M. J., & Ma, J. K.-C. (2009). Development of rhizosecretion as a production system for recombinant proteins from hydroponic cultivated tobacco. *The FASEB Journal*, 23(10), 3581–3589. <https://doi.org/10.1096/fj.09-131771>
- Dupont, D., Alric, M., Blanquet-Diot, S., Bornhorst, G., Cueva, C., Deglaire, A., Denis, S., Ferrua, M., Havenaar, R., Lelieveld, J., Mackie, A. R., Marzorati, M., Menard, O., Minekus, M., Miralles, B., Recio, I., & Van den Abbeele, P. (2019). Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(10), 1546–1562. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1421900>
- Faure, M., Moënoz, D., Montigon, F., Fay, L. B., Breuillé, D., Finot, P. A., Ballèvre,

- O., & Boza, J. (2002). Development of a rapid and convenient method to purify mucins and determine their in vivo synthesis rate in rats. *Analytical Biochemistry*, 307(2), 244–251. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00048-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00048-9)
- Ferriz-Martinez, R. A., Torres-Arteaga, I. C., Blanco-Labra, A., & Garcia-Gasca, T. (2010). The role of plant lectins in cancer treatment. *New Approaches in the Treatment of Cancer*, 71–90.
- Ferriz-Martínez, R., García-García, K., Torres-Arteaga, I., Rodríguez-Mendez, A. J., Guerrero-Carrillo, M. de J., Moreno-Celis, U., Ángeles-Zaragoza, M. V., Blanco-Labra, A., Gallegos-Corona, M. A., Robles-Álvarez, J. P., Mendiola-Olaya, E., Andrade-Montemayor, H. M., Garcia, O. P., & Garcia-Gasca, T. (2015). Tolerability assessment of a lectin fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats. *Toxicology Reports*, 2, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.10.015>
- Fik, E., Wołuń-Cholewa, M., Kistowska, M., Warchoń, J. B., & Goździcka-Józefiak, A. (2001). Effect of lectin from *Chelidonium majus* L. on normal and cancer cells in culture. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 39(2), 215–216. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11374832>
- Freed, D. L. J. (1999). Do dietary lectins cause disease? *BMJ*, 318(7190), 1023–1024. <https://doi.org/10.1136/bmj.318.7190.1023>
- Gabor, F., Bogner, E., Weissenboeck, A., & Wirth, M. (2004). The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(4), 459–480. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.015>
- García-Gasca, T., García-Cruz, M., Hernandez-Rivera, E., López-Matínez, J., Castañeda-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. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.722246>
- Gunathilake, K. D. P. P., Ranaweera, K. K. D. S., & Rupasinghe, H. P. V. (2018). Change of phenolics, carotenoids, and antioxidant capacity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of selected edible green leaves. *Food Chemistry*, 245, 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.096>
- Hara, T., Mukunoki, Y., Tsukamoto, I., Miyoshi, M., & Hasegawa, K. (1984). Susceptibility of Kintoki bean lectin to digestive enzymes in vitro and its behavior in the digestive organs of mouse in vivo. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 30(4), 381–394. <https://doi.org/10.3177/jnsv.30.381>
- He, S., Simpson, B. K., Sun, H., Ngadi, M. O., Ma, Y., & Huang, T. (2018). *Phaseolus vulgaris* lectins: A systematic review of characteristics and health implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(1), 70–83. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1096234>
- Hernández Díaz, P., Martín González, O., Rodríguez De Pablos Vélez, Y., & Ganem Báez, C. F. A. (1999). Aplicaciones de las lectinas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 15(2), 91–95.
- Hernández, P., Pérez, E., Martínez, L., & Martínez, G. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones. *Revista de Educación Química*,

24(1), 21–27.

- Herrera, D. R., Baltazar, E. H., Lara, J. C. E., Martínez, I. de la L., Torres, A. A. B., & Alejo, J. M. M. (2012). Variable complexity techniques for assessing drug absorption. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 43(1), 18–32.
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. E., & Artursson, P. (2007a). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, 2(9), 2111–2119. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.303>
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. E., & Artursson, P. (2007b). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, 2(9), 2111–2119. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.303>
- Huber, R., Eisenbraun, J., Miletzki, B., Adler, M., Scheer, R., Klein, R., & Gleiter, C. H. (2010). Pharmacokinetics of natural mistletoe lectins after subcutaneous injection. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 66(9), 889–897. <https://doi.org/10.1007/s00228-010-0830-5>
- Khemiss, F., Saidane, D., & Moshtaghie, A. A. (2005). Effect of aqueous extract of *Prasium majus* L. leaves on water and electrolytes transport in rat intestine. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(10), 1424–1429. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2005.1424.1429>
- Kiela, P. R., & Ghishan, F. K. (2016). Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(2), 145–159. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.007>
- Kiss, R., Camby, I., Duckworth, C., De Decker, R., Salmon, I., Pasteels, J. L., Danguy, A., & Yeaton, P. (1997). In vitro influence of Phaseolus vulgaris, Griffonia simplicifolia, concanavalin A, wheat germ, and peanut agglutinins on HCT-15, LoVo, and SW837 human colorectal cancer cell growth. *Gut*, 40(2), 253–261. <https://doi.org/10.1136/gut.40.2.253>
- Koepsell, H. (2020). Glucose transporters in the small intestine in health and disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 472(9), 1207–1248. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02439-5>
- Krippendorff, B.-F., Kuester, K., Kloft, C., & Huisinga, W. (2009). Nonlinear pharmacokinetics of therapeutic proteins resulting from receptor mediated endocytosis. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 36(3), 239–260. <https://doi.org/10.1007/s10928-009-9120-1>
- Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A., & Vazquez-Moreno, L. (2017). Legume Lectins: Proteins with diverse applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1242. <https://doi.org/10.3390/ijms18061242>
- Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2002). Nutritional Significance of Lectins and Enzyme Inhibitors from Legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6592–6598. <https://doi.org/10.1021/jf020191k>
- Lannoo, N., Verweken, W., Proost, P., Rougé, P., & Van Damme, E. J. M. (2007). Expression of the nucleocytoplasmic tobacco lectin in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 53(2), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.01.007>
- Lee, A., Nakano, M., Hincapie, M., Kolarich, D., Baker, M. S., Hancock, W. S., & Packer, N. H. (2010). The Lectin Riddle: Glycoproteins fractionated from complex mixtures have similar glycomic profiles. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 14(4), 487–499. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0075>

- Lewis, D. (1984). Chemical taxonomy, molecular biology and function of plant lectins progress in clinical and biological research, volume 138. *FEBS Letters*, 174(1), 187–187. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)81107-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)81107-2)
- Li, D., Chiu, H., Zhang, H., & Chan, D. W. (2013). Analysis of serum protein glycosylation by a differential lectin immunosorbant assay (dLISA). *Clinical Proteomics*, 10(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-10-12>
- Liu, B., Bian, H., & Bao, J. (2010). Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters*, 287(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.05.013>
- López-Sánchez, C., López-Martínez, F. J., Castañeda-Cuevas, A. L., Yllescas-Gasca, L., Ferríz-Martínez, R. A., Torres-Arteaga, I. C., & García-Gasca, T. (2010). Evaluación de la toxicidad in vitro e in vivo de lectinas de frijol Tépari. *Ciencia@UAQ*, 3(1), 3–13.
- Lozoya-Agullo, I., Araújo, F., González-Álvarez, I., Merino-Sanjuán, M., González-Álvarez, M., Bermejo, M., & Sarmiento, B. (2017). Usefulness of Caco-2/HT29-MTX and Caco-2/HT29-MTX/Raji B coculture models to predict intestinal and colonic permeability compared to Caco-2 Monoculture. *Molecular Pharmaceutics*, 14(4), 1264–1270. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01165>
- Luna-Vital, D., Weiss, M., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Anthocyanins from Purple Corn Ameliorated Tumor Necrosis Factor- α -Induced Inflammation and Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes via Activation of Insulin Signaling and Enhanced GLUT4 Translocation. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(12), 1–13. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700362>
- Luna Vital, D. A., Loarca-Piña, G., Dia, V. P., & de Mejía, E. G. (2014). Peptides extracted from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) non-digestible fraction caused differential gene expression of HCT116 and RKO human colorectal cancer cells. *Food Research International*, 62, 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.037>
- Luzardo-Ocampo, I., Ramírez-Jiménez, A. K., Cabrera-Ramírez, Á. H., Rodríguez-Castillo, N., Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., & Gaytán-Martínez, M. (2020). Impact of cooking and nixtamalization on the bioaccessibility and antioxidant capacity of phenolic compounds from two sorghum varieties. *Food Chemistry*, 309(October 2019), 125684. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125684>
- Lyu, S. Y., Choi, S. H., & Park, W. B. (2002). Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Archives of Pharmacal Research*, 25(1), 93–101. <https://doi.org/10.1007/BF02975269>
- Madera, M., Mechref, Y., Klouckova, I., & Novotny, M. V. (2007). High-sensitivity profiling of glycoproteins from human blood serum through multiple-lectin affinity chromatography and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 845(1), 121–137. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.067>
- Mahmood, I., & Green, M. D. (2005). Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in the development of therapeutic proteins. *Clinical Pharmacokinetics*, 44(4), 331–347. <https://doi.org/10.2165/00003088-200544040-00001>

- Maier, G., & Fiebig, H.-H. (2002). Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts in vitro. *Anti-Cancer Drugs*, 13(4), 373–379. <https://doi.org/10.1097/00001813-200204000-00006>
- Martínez-Alarcón, D. (2017). *Producción de una lectina recombinante de frijol Tépari (Phaseolus acutifolius) con efecto citotóxico sobre células de cáncer de colon.*
- Martínez-Alarcón, D., Blanco-Labra, A., & García-Gasca, T. (2018). Expression of lectins in heterologous systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 616. <https://doi.org/10.3390/ijms19020616>
- Martínez-Alarcón, D., Mora-Avilés, A., Espinoza-Núñez, A., Serrano Jamaica, L. M., 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(September), 100013. <https://doi.org/10.1016/j.btecx.2019.100013>
- 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. <https://doi.org/10.3390/biom10040654>
- Merritt, E. A., Sarfaty, S., Akker, F. Van Den, L'Hoir, C., Martial, J. A., & Hol, W. G. J. (1994). Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor G M1 pentasaccharide. *Protein Science*, 3(2), 166–175. <https://doi.org/10.1002/pro.5560030202>
- Mirkov, T. E., Wahlstrom, J. M., Hagiwara, K., Finardi-Filho, F., Kjemtrup, S., & Chrispeels, M. J. (1994). Evolutionary relationships among proteins in the phytohemagglutinin-arcelin-alpha-amylase inhibitor family of the common bean and its relatives. *Plant Molecular Biology*, 26(4), 1103–1113. <https://doi.org/10.1007/BF00040692>
- 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. <https://doi.org/10.3390/molecules25051021>
- Moreno-Celis, U., López-Martínez, J., Blanco-Labra, A., Cervantes-Jiménez, R., Estrada-Martínez, L. E., García-Pascalín, A. E., Guerrero-Carrillo, M. D. 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. <https://doi.org/10.3390/molecules22101670>
- Nagae, M., Soga, K., Morita-Matsumoto, K., Hanashima, S., Ikeda, A., Yamamoto, K., & Yamaguchi, Y. (2014). Phytohemagglutinin from *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) displays a novel glycan recognition mode using a common legume lectin fold. *Glycobiology*, 24(4), 368–378. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu004>
- Nakata, S., & Kimura, T. (1985). Effect of ingested toxic bean lectins on the gastrointestinal tract in the rat. *The Journal of Nutrition*, 115(12), 1621–1629. <https://doi.org/10.1093/jn/115.12.1621>

- Nishimura, H., Nishimura, M., Oda, R., Yamanaka, K., Matsubara, T., Ozaki, Y., Sekiya, K., Hamada, T., & Kato, Y. (2004). Lectins induce resistance to proteases and/or mechanical stimulus in all examined cells—including bone marrow mesenchymal stem cells—on various scaffolds. *Experimental Cell Research*, 295(1), 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.12.018>
- Nunes, R., Silva, C., & Chaves, L. (2016). Tissue-based in vitro and ex vivo models for intestinal permeability studies. In *Concepts and Models for Drug Permeability Studies* (pp. 203–236). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100094-6.00013-4>
- Osman, M. A., Reid, P. M., & 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. <https://doi.org/10.3923/pjn.2003.111.115>
- Palmerín-Carreño, D., Martínez-Alarcón, D., Dena-Beltrán, J. L., Vega-Rojas, L. J., Blanco-Labra, A., Escobedo-Reyes, A., & García-Gasca, T. (2021). Optimization of a recombinant lectin production in *Pichia pastoris* using crude glycerol in a fed-batch system. *Processes*, 9(5), 876. <https://doi.org/10.3390/pr9050876>
- Pellegrina, C. D., Perbellini, O., Scupoli, M. T., Tomelleri, C., Zanetti, C., Zoccatelli, G., Fusi, M., Peruffo, A., Rizzi, C., & Chignola, R. (2009). Effects of wheat germ agglutinin on human gastrointestinal epithelium: Insights from an experimental model of immune/epithelial cell interaction. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237(2), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.012>
- Pellegrina, C. D., RIZZI, C., MOSCONI, S., ZOCCATELLI, G., PERUFFO, A., & CHIGNOLA, R. (2005). Plant lectins as carriers for oral drugs: Is wheat germ agglutinin a suitable candidate? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.01.001>
- Pereira, C., Costa, J., Sarmiento, B., & Araújo, F. (2016). Cell-based in vitro models for intestinal permeability studies. *Concepts and Models for Drug Permeability Studies: Cell and Tissue Based In Vitro Culture Models*, 57–81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100094-6.00005-5>
- Picariello, G., Iacomino, G., Mamone, G., Ferranti, P., Fierro, O., Gianfrani, C., Di Luccia, A., & Addeo, F. (2013). Transport across Caco-2 monolayers of peptides arising from in vitro digestion of bovine milk proteins. *Food Chemistry*, 139(1–4), 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.063>
- Picariello, G., Miralles, B., Mamone, G., Sánchez-Rivera, L., Recio, I., Addeo, F., & Ferranti, P. (2015). Role of intestinal brush border peptidases in the simulated digestion of milk proteins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(5), 948–956. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400856>
- Pita-López, W., Gomez-Garay, M., Blanco-Labra, A., Aguilera-Barreyro, A., Reis-de Souza, T. C., Olvera-Ramírez, A., Ferriz-Martinez, R., & García-Gasca, T. (2020). Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) lectin fraction provokes reversible adverse effects on rats' digestive tract. *Toxicology Research*. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa062>
- Pusztai, A., & Bardocz, S. (1996). Biological Effects of Plant Lectins on the Gastrointestinal Tract: Metabolic Consequences and Applications. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 8(41), 149–165.

<https://doi.org/10.4052/tigg.8.149>

- Ramadass, B., Dokladny, K., Moseley, P. L., Patel, Y. R., & Lin, H. C. (2010). Sucrose Co-administration Reduces the Toxic Effect of Lectin on Gut Permeability and Intestinal Bacterial Colonization. *Digestive Diseases and Sciences*, 55(10), 2778–2784. <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1359-2>
- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., & da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 588–602. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x>
- Reynoso-Camacho, R., González de Mejía, E., & Loarca-Piña, G. (2003). Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food and Chemical Toxicology*, 41(1), 21–27. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00215-6)
- Rhodes, J. M. (1999). Beans means lectins. *Gut*, 44(5), 593–594. <https://doi.org/10.1136/gut.44.5.593>
- Roeselers, G., Ponomarenko, M., Lukovac, S., & Wortelboer, H. M. (2013). Ex vivo systems to study host–microbiota interactions in the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27(1), 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.018>
- Romanos, M. A., Scorer, C. A., & Clare, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 8(6), 423–488. <https://doi.org/10.1002/yea.320080602>
- Rüdiger, H. (1996). Structure and Function of Plant Lectins. In *Glycosciences* (pp. 415–438). Wiley-VCH Verlag GmbH. <https://doi.org/10.1002/9783527614738.ch23>
- Sambrook, J. F., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd ed., Vols 1,2 and 3* (Cold Spring).
- Sánchez-Rivera, L., Martínez-Maqueda, D., Cruz-Huerta, E., Miralles, B., & Recio, I. (2014). Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. *Food Research International*, 63, 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.069>
- Santoro, L. G., Grant, G., & Pusztai, A. (1997). Effects of short-term feeding of rats with a highly purified phaseolin preparation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51(1), 61–70. <https://doi.org/10.1023/A:1007993708886>
- Sharon, N. (1998). Lectins: From obscurity into the limelight. *Protein Science*, 7(9), 2042–2048. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070922>
- Sharon, N. (2007). Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 2753–2764. <https://doi.org/10.1074/JBC.X600004200>
- Sharon, N., & Lis, H. (2002). How proteins bind carbohydrates: Lessons from legume lectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6586–6591. <https://doi.org/10.1021/jf020190s>
- Sharon, N., & Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11), 53R-62R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh122>
- Singh, B. N., Saha, C., Galun, D., Upreti, D. K., Bayry, J., & Kaveri, S. V. (2016). European *Viscum album*: a potent phytotherapeutic agent with multifarious phytochemicals, pharmacological properties and clinical evidence. *RSC*

- Advances*, 6(28), 23837–23857. <https://doi.org/10.1039/C5RA27381A>
- Sjöberg, Å., Lutz, M., Tannergren, C., Wingolf, C., Borde, A., & Ungell, A. L. (2013). Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(1–2), 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.10.007>
- Sousa, R., Portmann, R., Dubois, S., Recio, I., & Egger, L. (2020). Protein digestion of different protein sources using the INFOGEST static digestion model. *Food Research International*, 130, 108996. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108996>
- Tagliacruzchi, D., Martini, S., Bellesia, A., & Conte, A. (2015). Identification of ACE-inhibitory peptides from *Phaseolus vulgaris* after in vitro gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(7), 774–782. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1088940>
- Tambe, A., Mokashi, P., & Pandita, N. (2019). Ex-vivo intestinal absorption study of boswellic acid, cyclodextrin complexes and poloxamer solid dispersions using everted gut sac technique. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 167, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.018>
- Thompson, J., Vaughan, W., Forst, C., Jacobs, D., Weekly, J., & Rikkers, L. (1987). The effect of the route of nutrient delivery on gut structure and diamine oxidase levels. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 11(1), 28–32. <https://doi.org/10.1177/014860718701100128>
- Torres Arteaga, I., Castro Guillen, J. L., Mendiola-Olaya, E., García-Gasca, T., Ángeles-Zaragoza, M. V., García-Santoyo, V., Torres-Castillo, J. A., 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. *Journal of Glycobiology*, 5(1), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2168-958X.1000117>
- Trott, O., & Olson, A. A. J. A. (2010). Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>. AutoDock
- Turner, R. H., & Liener, I. E. (1975). The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. *Analytical Biochemistry*, 68(2), 651–653. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(75\)90663-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(75)90663-6)
- Vugmeyster, Y. (2012). Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: Advances and challenges. *World Journal of Biological Chemistry*, 3(4), 73. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v3.i4.73>
- Yang, Z., & Hancock, W. S. (2004). Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. *Journal of Chromatography. A*, 1053(1–2), 79–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15543974>
- Yoshida, Y., Ban, Y., & Kinoshita, S. (2009). Tight junction transmembrane protein claudin subtype expression and distribution in human corneal and conjunctival epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(5), 2103. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3046>
- Zhao, Y., Qin, G., Sun, Z., Che, D., Bao, N., & Zhang, X. (2011). Effects of soybean agglutinin on intestinal barrier permeability and tight Junction protein expression

in weaned piglets. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 8502–8512. <https://doi.org/10.3390/ijms12128502>

Zhu, C., Chen, Z., & Jiang, Z. (2016). Expression, distribution and role of aquaporin water channels in human and animal stomach and intestines. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/ijms17091399>

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ