



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Ciencias Biológicas

**Caracterización proteínica de una fracción Lectinas-Inhibidor de  
Proteasas de Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) con potencial  
anticancerígeno**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias Biológicas

**Presenta:**

Biol. Ricardo Cervantes Jiménez

**Codirigido por:**

Dr. Alejandro Blanco Labra

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

**Sinodales**

Dr. Alejandro Blanco Labra

Presidente

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Secretario

Dr. José Luis Castro Guillén

Sinodal

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez

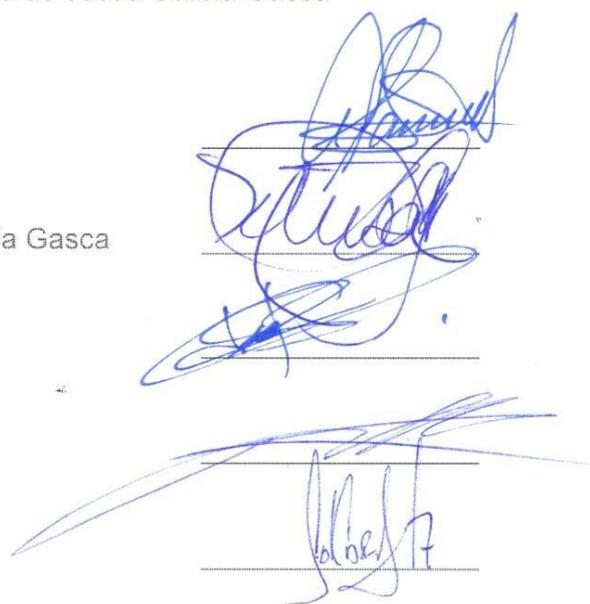
Sinodal

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Sinodal



Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Directora de la Facultad de Ciencias Naturales



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

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Diciembre, 2015  
México

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO A CARGO DE LA DRA. TERESA GARCÍA GASCA, Y A SU VEZ EN EL LABORATORIO DE MECANISMOS DE DEFENSA DE PLANTAS CINVESTAV UNIDAD IRAPUATO, A CARGO DEL DR. ALEJANDRO BLANCO LABRA.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Estos agradecimientos están dirigidos a las personas que aportaron una pregunta o comentario en algún seminario, foro o congreso donde se presentó este trabajo, aquí menciono a algunas personas que apoyaron para la elaboración de este escrito.**

**A mis padres José León Cervantes Franco y María Concepción Jiménez del Castillo. Por sus consejos amistad y valores inculcados, además de apoyarme en los 3 años que duró este proyecto.**

**A mis hermanos y sobrinos que me hacen pasar ratos agradables, a mi abuela Fortunata Del Castillo que me apoyó al 100%.**

**A mis dos amigos Alejandro Blanco Labra y Teresa García Gasca que sin conocerme más que por palabras, nunca me negaron un reactivo, curso, estancia o uso de equipo para la realización de todo lo contenido en este escrito, a ustedes dos gracias.**

**A la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo con dos proyectos FOPER y una beca de estancia nacional, y a su vez a toda la gente que aporta sus impuestos para que CONACyT me diera mi beca de maestría**

**A mis compañeros de laboratorio especial mente a mi compañera de aventuras Laura Estrada Martínez**

**Y sin menos a mi familia adoptiva en Irapuato incluyendo a mi mamá adoptiva Soledad Palomares**

**¡¡¡Gracias!!!**

## **Resumen**

Las enfermedades crónicas degenerativas son un problema de salud a nivel mundial y, en México, una de las principales causas de muerte es el cáncer. Dicha enfermedad se encuentra en crecimiento en relación al número de nuevos casos por año en el mundo y la demanda de nuevos productos. Por lo anterior, es necesario profundizar en el estudio de compuestos que puedan presentar efectos contra el crecimiento, desarrollo y movilidad de células de cáncer, tales como las lectinas o los inhibidores de proteasa (IP). En este trabajo se caracterizó parcialmente una fracción rica en lectinas e IP de frijol Tépari (LIP-60), además de que se probó el efecto biológico del resto de proteínas presentes en la fracción. El IP presentó actividad inhibitoria contra tripsina y quimotripsina, además de que la lectina que contiene presentó actividad aglutinante contra eritrocitos A+. Se utilizaron diversos métodos de purificación para determinar la proteína responsable del efecto citotóxico de la fracción LIP-60, y se estandarizó una metodología de análisis de imagen con el programa ImageJ, para determinar parámetros de sobrevivencia para la línea de fibroblastos de ratón 3T3/v-mos. Se determinó el efecto citotóxico de LIP-60 y la proteína no lectina obtenida mediante métodos cromatográficos (PnL-C). Los resultados muestran que la PnL-C no provoca significativamente un efecto citotóxico, lo que sugiere que dicho efecto es dependiente principalmente de las lectinas presentes.

**Palabras clave:** Cáncer, Frijol Tépari, Lectina, Purificación, Proteínas.

## **Abstract**

Chronic degenerative diseases are a health problem worldwide and in Mexico, cancer is one of the leading causes of death. The disease is growing in relation to the number of new cases per year in the world and demand for new products. Thus, it is necessary to deepen the study of compounds, such as lectins or protease inhibitors, that could present effects against the growth, development and motility of cancer cells, as lectins and protease inhibitors (PI). In this work, a fraction rich in lectins and PI from Tepary bean (LIP-60) was partially characterized, in addition the biological effect of other proteins in the fraction was tested. Trypsin and chymotrypsin inhibitory activity, and also binding activity against A+ erythrocytes were found on this fraction. Several purification methods were used in order to determine the protein responsible for the cytotoxic effect of LIP-60 fraction, and image analysis methodology was standardized using the imageJ program to determine parameters of survival for 3T3/v-mos fibroblasts. The cytotoxic effect of LIP-60 and the no-lectin protein obtained by chromatographic methods (PnL-C) was determined. The results showed that PnL-C causes no significant cytotoxic effect, indicating that this effect is dependent primarily on lectins.

**Keywords:** Cancer, Tepary Bean, Lectin, Protein, Purification.

## Índice

Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Índice de Cuadros.....	viii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Frijol Tépari.....	3
2.2 Inhibidores de proteasas de frijol Tépari.....	4
2.3 Lectinas de frijol Tépari.....	5
3. Justificación.....	7
4. Hipótesis.....	8
5. Objetivos.....	8
5.1 Objetivo General.....	8
5.2 Objetivos específicos.....	8
6. Materiales y Métodos.....	9
6.1 Obtención de la fracción combinada IP y lectinas.....	9
6.2 Análisis de proteínas.....	10
6.2.1 Perfil electroforético monodimensional.....	10
6.2.2 Zimograma de inhibición.....	11
6.2.3 Tinción con plata.....	11
6.3 Determinación de actividades biológicas de IP y lectinas.....	12

6.3.1 Actividad Inhibitoria de proteasas .....	12
6.3.2 Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad inhibitoria.....	12
6.3.3 Desglicosilación de lectinas contenidas en LIP-60 .....	12
6.3.4 Actividad Aglutinante. ....	12
6.4 Separación de proteínas contenidas en LIP-60 .....	13
6.4.1 Purificación de proteínas por elución en geles de electroforesis .....	13
6.4.2 Purificación de proteínas por cromatografía de exclusión de peso molecular G-75 e intercambio iónico.....	14
6.5 Análisis de citotoxicidad .....	15
6.6 Análisis de Imagen.....	16
7. Resultados y discusión.....	18
7.1 Obtención de la fracción LIP-60.....	18
7.2 Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad inhibitoria .....	21
7.3 Desglicosilación de LIP-60.....	22
7.4 Separación de proteínas contenidas en LIP-60 .....	22
7.5 Análisis de citotoxicidad .....	25
8. Conclusiones.....	34
9. Referencias .....	35

## Índice de Cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Recuperación de proteína con membrana de amicon-50 kDa.....	19
<b>Cuadro 2.</b> Unidades aglutinantes e inhibitorias de la fracción LIP-60 contra tripsina y quimotripsina.....	20
<b>Cuadro 3.</b> Aglutinación recuperada posterior al tratamiento enzimático.....	22
<b>Cuadro 4.</b> Porcentaje de recuperación a partir de la extracción por elución de las proteínas purificadas por SDS PAGE .....	23

## Índice de Figuras

Figura 1. Fotografía tomada al control ASB con células 3T3/v-mos.....	17
Figura 2. Electroforesis de las fracciones obtenidas mediante membrana de amicon de 50 kDa. ....	19
Figura 3. Perfil electroforético de la fracción LIP-60.....	20
Figura 4. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad Inhibitoria de la fracción LIP-60, contra tripsina bovina.....	21
Figura 5. Perfil electroforético de las fracciones de proteína obtenidas por el método de Elución de la fracción LIP-60.....	23
Figura 7. Cromatografía de intercambio iónico de la fracción 2. ....	25
Figura 8. Perfil electroforético de las fracciones obtenidas de la fracción LIP-60 a partir de los métodos cromatográficos. ....	25
Figura 9. Efecto citotóxico de FCL y LIP-60 sobre células HT-29. ....	26
Figura 10. Morfología celular de fibroblastos 3T3/v-mos tratados con las fracciones estudiadas.....	27
Figura 11. Cobertura celular de área para células 3T3/v-mos tratadas con las proteínas de interés.....	28
Figura 12. Cobertura celular de área para células tratadas con las fracciones de proteína estudiadas.....	29

Figura 13. Perímetro celular, tratamientos con las fracciones de proteína estudiadas sobre células. ....	29
Figura 14 Circularidad celular para células tratadas con las fracciones de proteína estudiadas. ....	30
Figura 15. Feret celular para células tratadas con las fracciones de proteína estudiadas. ....	31
Figura 16. Relación de aspecto (AR) para células tratadas con las fracciones de proteína estudiadas. ....	31
Figura 17. Capacidad (Redondez) para células tratadas con las fracciones de proteína estudiadas. ....	32
Figura 18. Porcentaje de supervivencia a 8 h de los diversos tratamientos de proteína sobre células 3T3/v-mos. ....	33

## 1. Introducción.

Los mamíferos están constituidos por millones de millones de células vivas, las cuales se encuentran constantemente bajo diversos procesos pero presentan un comportamiento similar. Tales células crecen y se dividen formando nuevas células, órganos, y complejos de interacciones entre ellas para después morir de manera ordenada. Existen diversos procesos que pueden ocasionar alteraciones o aberraciones en los procesos celulares (Malats y Castaño-Vinyals, 2007), como en el caso del cáncer, el cual es un proceso de crecimiento y diseminación autónomo de células. Este proceso puede originarse de cualquier tipo celular y dispersarse a la totalidad del cuerpo con la capacidad de formar un tumor. El cáncer suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo (WHO, 2015).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, esta problemática incrementa el número de medicamentos y tratamientos alternativos para resolver el problema de salud. En México, la tasa reportada de incidencia de cáncer en mujeres para el 2012, fue cáncer de mama como primer lugar seguida de cáncer de colon; para el caso de hombres se fue de cáncer prostático, seguido de pulmonar y en tercer lugar cáncer de colon (Globocan, 2012). Dicha problemática ha incrementado en las últimas décadas, provocando aumento en la demanda hospitalaria y de medicamentos (WHO, 2015).

La búsqueda de moléculas más selectivas y que provoquen menores efectos secundarios en los tratamientos contra enfermedades crónico degenerativas, se ha potencializado en los últimos años. En la actualidad se exploran nuevas alternativas de terapias contra cáncer, particularmente utilizando extractos de hierbas medicinales o componentes de plantas (Grassi y col., 2013; Behzad y col., 2014). Las plantas son fuente de diferentes tipos de compuestos con capacidad medicinal, entre ellas, las leguminosas representan una fuente interesante de compuestos bioactivos (Mojica y Mejía., 2015).

El frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) contiene diversas propiedades que le proveen resistencia a sequía y a parásitos. Este frijol presenta compuestos antinutricios como fitatos, lectinas e inhibidores de proteasas, los cuales se

encuentran en altas cantidades en los extractos crudos (Zaugg y col., 2013). Estos compuestos pueden desaparecer casi del todo después de la cocción, por lo que al ser consumidos no constituyen un riesgo para la salud (García-Gasca y col., 2002). Respecto al frijol común, el frijol Tépari tiene concentraciones menores de lectinas, sin embargo, se sabe que éstas poseen alta actividad biológica (González de Mejía y col., 2005).

En nuestro grupo se ha mostrado que inhibidores de proteasas (IP) presentes en dicho frijol, tienen la capacidad de incrementar la adhesión celular e inhibir la capacidad de invasión *in vitro*, además de disminuir la actividad de algunas proteasas (García-Gasca y col., 2012; García-Gasca y col., 2002) además de que pueden presentar complejos activos contra quimotripsina (Roldán-Padrón 2014). Por su parte, lectinas presentes en el frijol Tépari son capaces de reconocer a células de cáncer humano, inhibiendo la proliferación y sobrevivencia celular en función de la concentración, mediante la inducción de apoptosis (García-Gasca y col., 2012).

Recientemente se inició el estudio de una fracción combinada de IP y lectinas de frijol Tépari, con la finalidad de encontrar un posible efecto sinérgico. Los estudios toxicológicos mostraron que la fracción combinada presenta menos efectos adversos que la fracción concentrada en lectina (FCL) (López-Sánchez y col., 2010; Ferriz-Martínez y col., 2015). El presente trabajo se enfocó en caracterizar la fracción combinada de IP y lectinas de frijol Tépari, con la finalidad de contribuir al conocimiento de las propiedades biológicas de esta fracción y su potencial como herramienta terapéutica contra cáncer de colon.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Frijol Tépari.

En el Norte de México y sur de los Estados Unidos, se cultiva una especie de frijol conocida como Tépari. Aunque su consumo está limitado a dicha región, este cultivo es particularmente atractivo, debido a sus características agronómicas, como la resistencia a plagas y sequía (González de Mejía y col., 2005). El nombre científico del frijol Tépari es *Phaseolus acutifolius*, pertenece a la familia *Fabaceae*, y crece de forma silvestre en algunas regiones áridas y semiáridas del suroeste de Estados Unidos, desde la parte central del estado de Arizona, EU hasta el sur de Nicaragua. Su origen se remonta a 5000 a.C., en el Valle de Tehuacán, Puebla, lugar en donde se encontraron las semillas más antiguas. Fue una de las cinco especies de *Phaseolus* domesticadas en América en tiempos precolombinos (Debouck, 1994). No se conoce con precisión dónde se empezó a domesticar esta especie, pero algunas de las causas del descuido del cultivo de frijol Tépari es la pérdida de consumo tradicional en las comunidades indígenas y la escasez de demanda en los grandes mercados. Su cultivo potencial en áreas desérticas es extenso debido a su resistencia a la sequía, al calor y a su adaptabilidad a altas concentraciones salinas del suelo (González de Mejía y col., 2005).

El frijol Tépari se utiliza principalmente como alimento para humanos y animales debido a su gran contenido proteínico sin embargo, su bajo consumo representa una subutilización de su alto contenido de proteínas y carbohidratos (Osman y col., 2003). Esta semilla presenta compuestos antinutricios como fitatos, lectinas e inhibidores de proteasas (IP) que, aunque relativamente altas en el extracto crudo, desaparecen casi del todo después de la cocción, por lo que al ser consumidos no constituyen un riesgo para la salud. Respecto al frijol común, el frijol Tépari tiene concentraciones menores de lectinas, sin embargo, éstas poseen una actividad biológica mayor (González de Mejía y col., 2005).

## 2.2 Inhibidores de proteasas de frijol Tépari

Los IP son proteínas con actividad inhibitoria contra enzimas proteolíticas, participan en diversos procesos dentro de las plantas, como mecanismo de defensa contra patógenos, resistencia a sequia entre otros, además de que su estudio está orientado a utilizarlos como control biológico en la industria (Katoch y col., 2015).

En el reino vegetal se ha descrito un amplio número de IP en las semillas de leguminosas (Mello y col., 2003; Sousa y col., 2014). Dichos IP se clasificaban tradicionalmente de acuerdo con los tipos de enzima que reconocen, entre los cuales se encuentran las metalopeptidasas, serín peptidasas y otras. Actualmente los IP se clasifican en diversas familias, de acuerdo la secuencia de aminoácidos que presentan y la estructura tridimensional del dominio que presentan (Rawlings y col., 2008). Uno de los grupos más estudiados son los IP de la familia Bowman-Birk o (BBI, por sus siglas en inglés), los cuales han generado interés en los últimos años por sus posibles aplicaciones biotecnológicas y en medicina (Campos-Contreras y col., 1997).). Estos IP contienen de 60 a 90 aminoácidos (Prasad y col., 2010) y presentan dominio contra tripsina el cual contiene los aminoácidos serina, histidina, y ácido aspártico como sitio catalítico. El IP reportado en el frijol Tépari ha mostrado propiedades bioactivas. En 1997, Campos y col. describieron un IP tipo Bowman-Birk proveniente del frijol Tépari que presentaba un peso molecular de 8,764.6 Da, y una alta resistencia a temperatura mayor de los 50 C° además de a pH bajo. Dicho IP contiene un sitio activo contra tripsina y a su vez contra quimotripsina, con la que puede realizar la formación de un complejo activo enzima-inhibidor altamente estable (Roldán-Padrón, 2014). Este tipo de inhibidores presentan una estructura canónica que les brinda la función inhibitoria, uniéndose al sitio activo de la proteasa (Walker, 1994; Mendoza y Cassaretto, 2012).

### 2.3 Lectinas de frijol Tépari

Las lectinas se encuentran presentes en prácticamente todos los organismos vivos, pero de mayor forma en los granos de diversas semillas. Particularmente, las lectinas de leguminosas son glicoproteínas que se presentan como factores anti-nutricionales y pueden causar trastornos intestinales, dada su capacidad de actuar como alérgenos tóxicos y hemaglutininas (He y col., 2015). Algunas lectinas presentes en el género *Phaseolus* se han comenzado a explotar ya que se conocen algunos efectos benéficos para la salud ya sea contra cáncer, virus de la inmunodeficiencia (anti-VIH) o infecciones microbianas, pudiendo servir como tratamiento por su alta especificidad a carbohidratos (Da Silva y Correia, 2014). Las proteínas pueden estar unidas a diversos grupos que les confieren estructura o función, como carbohidratos (Zachara y Hart, 2004). En las leguminosas las lectinas ocupan del (2% al 10% del total de proteínas) en la semilla y se distinguen por presentar interacción proteína-carbohidrato (Carlini y Grossi-de-Sá, 2002; Damodaran y col., 2008). Los carbohidratos que interactúan en las lectinas pueden tener propiedades hidrofílicas polares, estos carbohidratos pueden estar arreglados de forma muy diversa y constituyen del 1 al 80% del total del peso molecular de la proteína (He y col., 2015; Torres, 2010). Estas características le dan una compleja particularidad a este tipo de proteínas, como la capacidad de aglutinar algunos tipos celulares, mostrando un alto grado de especificidad por eritrocitos humanos y de igual forma algunos eritrocitos animales (Boyd y Sharpleigh, 1954), además de afinidad a células cancerígenas (Jaffé, 1980; García-Gasca y col., 2012).

Por su parte, la purificación y caracterización de lectinas del Tépari ha permitido determinar diversas propiedades activas (Torres, 2010; Wang y Amin, 2014), ya que son proteínas que reconocen de igual forma líneas celulares de cáncer con una gran especificidad (Mendoza y col 2007, García-Gasca y col., 2012). Las lectinas de leguminosas han mostrado una aplicación potencial como agentes antitumorales, ya que se conoce su interacción con diferentes carbohidratos presentes en la superficie de células cancerígenas (Ueno y col., 2000).

En 2011, Valadez-Vega y col. reportaron que una lectina proveniente del frijol Tépari purificada mediante columna de fetuina-agarosa, presentó efecto antiproliferativo sobre células de cáncer SW480. En nuestro grupo hemos estandarizado la obtención de una fracción concentrada de lectinas (FCL) de frijol Tépari, mediante cromatografía de exclusión de peso molecular (Torres, 2010). Esta FCL presenta efecto citotóxico diferencial sobre líneas celulares de cáncer (García-Gasca y col., 2012), mediante la inducción de apoptosis (Ferriz Martínez, datos no publicados).

En modelos animales se han administrado lectinas de *Phaseolus vulgaris* y se ha encontrado aumento de la inmunoglobulina (Ig) en sistema inmune de ratas, esta respuesta inmune continua, sugirió que los mecanismos normales de defensa fueron parcialmente reprimidos en las ratas tratadas (Rougé y col., 2010; Kumar et al, 2013). Por su parte, la FCL de frijol Tépari ha mostrado baja toxicidad, administrada vía oral en ratas Sprague Dawley a una concentración de 50 mg/kg de peso corporal, aplicada 3 veces por semana durante 6 semanas (López-Sánchez y col., 2010). Se ha observado activación del sistema inmune, ya que el porcentaje de granulocitos aumenta de forma significativa (Ferriz-Martinez y col., 2015). Además, presenta efecto inhibitorio sobre la tumorigénesis colónica temprana (Ferriz-Martínez, datos no publicados).

### **3. Justificación**

Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren un efecto apoptótico de lectinas de frijol Tépari, así como un posible efecto en la disminución de la movilidad celular causada por el IP. Por lo tanto, resulta importante caracterizar una fracción que contenga ambos tipos de proteínas bioactivas. Los costos que representa purificar este tipo de proteínas y probarlas en modelos animales son altos, además, su rendimiento es muy bajo. Por lo tanto, se propone trabajar con una fracción que contemple las dos proteínas bioactivas.

#### **4. Hipótesis**

El efecto bioactivo que presenta la lectina presente en la fracción LIP-60 obtenida de frijol Tépari contra líneas celulares de cáncer, es la principal responsable de la muerte celular y no el resto de proteínas de la fracción

#### **5. Objetivos**

##### 5.1 Objetivo General

Obtener la fracción proteica no lectina, para conocer si otras proteínas pudieran participar en la actividad citotóxica de la FCL

##### 5.2 Objetivos específicos

- Obtener una fracción combinada de IP y lectinas de frijol Tépari.
- Separar los diferentes componentes proteínicos de la fracción.
- Determinar las unidades inhibitorias, aglutinantes, así como el perfil proteínico de la fracción.
- Determinar el efecto en la proliferación celular de la fracción de las proteínas no lectinas de la fracción sobre células de cáncer.
- Evaular mediante análisis de imagen la morfología, tamaño, coloración, simetría celular, y utilizar estos parámetros para determinar la muerte y sobrevivencia celular

## 6. Materiales y Métodos.

### 6.1 Obtención de la fracción combinada IP y lectinas

El proceso de extracción de los IP y lectinas se basó en la metodología propuesta por Campos y col. (1997). Las semillas de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) fueron obtenidas en la comunidad de Arizpe en Hermosillo Sonora, (30°19' 51.96" N, 110° 10' 04.36" O). La semilla se trituró en un molino eléctrico modelo A-10 (Analytical Tekmar, Germany) hasta obtener harina. La harina fue desgrasada con una mezcla de cloroformo-metanol 3:1 (v/v), en proporción 4:1 p/v (harina-agua) en agitación por 30 min. Los solventes se retiraron por filtración al vacío y se repitió el proceso 3 veces. La harina desgrasada se secó a temperatura ambiente. Las proteínas de interés se extrajeron de la siguiente manera. Se colocaron 100 g de harina desgrasada en 500 mL de agua desionizada, en agitación constante a 4° C durante 12 h. posteriormente, esta mezcla se centrifugó a 39,200 G. Se recuperó el sobrenadante (extracto crudo) y se sometió a diferentes estrategias de obtención de la fracción combinada IP y lectinas.

Primera estrategia: Separación de proteínas mediante membranas de Amicon. Con la intención de eliminar la proteína mayor a 50 kDa se utilizó un filtro de Amicon de 50 kDa, ya que se sabe que la subunidad de la lectina de frijol Tépari tiene un peso molecular aproximado de 30 kDa y el IP de 8 kDa. A partir del extracto crudo se realizó una precipitación secuencial con sulfato de amonio, iniciando con 40% de saturación, se recuperó el sobrenadante y se llevó al 70% de saturación para precipitar la proteína (P-70), que se dializó contra agua utilizando membrana de 3 kDa. El P-70 se trató con SDS (20 mg/mL) con la intención de desnaturalizar la forma tetramérica de la lectina y permitir la filtración de las subunidades. Brevemente, a 5 mL de P-70 se le adicionaron 100 mg de SDS, se agitó durante 30 min, se procedió a filtrar el extracto a través de un amicón de 50 kDa. Una vez filtrada, se recuperaron las dos fracciones (arriba y abajo del filtro de 50 kDa). Se procedió a eliminar el SDS por ultrafiltración, utilizando una membrana de amicón de 3 kDa. Al eliminar el SDS de la muestra, algunas proteínas se volvieron insolubles y precipitaron, por lo que se registró

pérdida de proteína, sin saber si dicha proteína era de interés. Se llevó a cabo una electroforesis al 10% con SDS en el sistema de Laemmli (1970).

Segunda estrategia: Optimización de la obtención de la fracción por precipitación secuencial. Una de las opciones que se consideró para obtener la fracción de interés, fue procesar la muestra mediante cromatografía de exclusión de peso molecular, donde se separa la FCL y el IP. Esta opción se descartó debido a que implicaba una mayor manipulación de la muestra, así como un incremento en costos de obtención, ya que era necesario, primero separar al IP y las lectinas y luego nuevamente mezclarlos. De acuerdo a resultados previos, se sabe que la mayor actividad aglutinante se recupera al precipitar secuencialmente al 40% y al 60%, por lo que se optó por caracterizar dicha fracción (LIP-60). Brevemente, se sometió a una precipitación secuencial con sulfato de amonio, primero al 40% en agitación constante durante 1 h a 4° C, seguido de una precipitación al 60% con sulfato de amonio a 4° C por 1 h a 39,200 g. La proteína obtenida se dializó con una membrana (Spectra/Por membrana tubular de microporos de 3.5 kD). Las muestras se liofilizaron y almacenaron para su posterior utilización a -20 °C.

## 6.2 Análisis de proteínas

### 6.2.1 Perfil electroforético monodimensional

Los perfiles electroforéticos de las fracciones obtenidas se obtuvieron mediante SDS-PAGE, en geles de poli(acrilamida) al 10% (mediante el método de Laemmli (1970)). La cantidad de proteína total en la fracción LIP-60 se determinó previamente con el método de Bradford (1976). Se tomó una muestra del extracto crudo, extracto precipitado al 40%, extracto precipitado al 60%, fase soluble e insoluble, para posteriormente desgrasar con cloroformo en una relación v/v y se mantuvieron en agitación por 10 min, posteriormente se retiró el sobrenadante para cuantificar el total de proteínas y determinar el perfil proteínico por electroforesis.

## 6.2.2 Determinación de presencia de IP mediante zimogramas con tripsina bovina en membrana de celulosa

La detección de las proteínas con actividad de IP fue mediante la digestión con tripsina bovina se llevó a cabo según los protocolos de Ohlsson y col. (1986) y Vinokurov y col. (2005). Se realizó una electroforesis de acuerdo al sistema de Laemmli (1970). Posteriormente sobre el gel se colocó una membrana de celulosa previamente embebida en sustrato SAAPFpNA (N-Succinil-Alanina-Alanina-Prolina-Fenilalanina-p-nitroanilida) en dimetilsulfoxido (DMSO) 43.5 mg/10 mL, para medir la actividad proteolítica tipo qimotripsina. Se incubó a 37°C por 2 h (o hasta observar coloración amarilla en alguno de los carriles) y se lavó con Na<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> 0.1%, sulfato de amonio y con N-1-naftiletildiamina durante periodos de 5 min cada una. Terminada la electroforesis el gel se tiñó con azul de Comassie y se destiñó con una solución de ácido acético 10%.

## 6.2.3 Tinción con plata

La tinción con plata se realizó según el protocolo reportado por Blum y col. (1987), basado en el procedimiento de tinción de plata no amoniacal. Después de la electroforesis, los geles fueron puestos en agitación lenta durante 10 min, en una solución de metanol al 40% y formaldehído (12.5 µL de formaldehído al 37% en 25 mL). Posteriormente, los geles se lavaron dos veces con agua, 5 min por cada lavado y e1 lavado de 1 min con una solución de tiosulfato de sodio (0.2 g/L), con agitación lenta. Se eliminó el tiosulfato de sodio y se realizaron dos lavados con agua de 20 s cada uno, enseguida se sumergieron en una solución de nitrato de plata 0.1% durante 10 min. La proteína fue revelada posteriormente al agitar el gel en una solución de carbonato de sodio, tiosulfato de sodio y formaldehído, hasta que la coloración café de las bandas se desarrolló completamente. La reacción se detuvo al añadir 5 mL de ácido cítrico 2.3 M y 5 mL de ácido acético al 25%, el gel se montó en una hoja de acrílico y se escaneó.

## 6.3 Determinación de actividades biológicas de IP y lectinas

### 6.3.1 Actividad Inhibitoria de proteasas

A partir de la fracción LIP-60 se determinó la actividad inhibitoria del IP contra tripsina bovina con el sustrato *N*-benzoil-arginina-etil-ester (BAEE), de acuerdo con el método de (Schwartz y Takenaka, 1955), y usando el sustrato *N*-benzoil-arginina-*p*-nitroanillida (BApNA), en un espectrofotómetro de microplacas de 96 pozos (Erlanger y col., 1961). Se realizó una dilución 1:10 a partir de la fracción LIP-60, se tomó una muestra de 5  $\mu$ L, al cual se le agregaron 95  $\mu$ L de buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8, 10  $\mu$ L de tripsina bovina y 10  $\mu$ L de sustrato BApNA y se leyó a 405 nm en un espectrofotómetro para microplaca xMark™. Se tomó un pozo como control utilizando la misma cantidad de sustrato y enzima sin la fracción LIP-60.

La actividad inhibitoria contra quimotripsina se determinó de la siguiente manera. Se tomó una muestra de 5  $\mu$ L al cual se le agregaron 95  $\mu$ L de buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8, 10  $\mu$ L de quimotripsina bovina y 10  $\mu$ L de sustrato Suc-AAPF-pNA mediante el método de (Erlanger y col., 1961).

### 6.3.2 Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad inhibitoria

Se determinó la actividad inhibitoria con tres buffers Tris-HCl, 10mM, 50mM y 1 M, pH 8.0. Utilizando la enzima tripsina con el sustrato Bz-R-pNA en un espectrofotómetro para microplaca xMark™, como se describió anteriormente con el método de (Schwartz y Takenaka, 1955).

### 6.3.3 Desglicosilación de lectinas contenidas en LIP-60

La preparación de la enzima se realizó a partir de 50 U/mg de la enzima PNGase F (Sigma Aldrich, No catálogo (P7367-50UN), se disolvieron en 1mL de buffer (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50mM, previamente filtrado y ajustado a un pH de 7.5.

La fracción LIP-60 se preparó a partir de 50  $\mu$ g de proteína disuelta en buffer (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50mM pH7.5 y se mezcló con 16  $\mu$ L de ditioneol 10mM (DTT; SIGMA, St. Louis, MO, USA), y de 20  $\mu$ L de Iodo acetamida 50 Mm (IAA; SIGMA,

St. Louis, MO, USA), por 12 h a 37 °C. Posteriormente se dializó para eliminar el DTT y el IAA de la solución y se le agregaron 6 U de enzima para ser incubando toda la noche a 37° C. La mezcla se dializó nuevamente para eliminar los polisacáridos digeridos y se determinó actividad aglutinante con el método de (Adamova y col., 2014) y el perfil electroforético de la fracción LIP-60.

#### 6.3.4 Actividad Aglutinante.

La determinación de la actividad aglutinante se realizó mediante el método descrito por (Jaffé, 1980), en el cual se realizan diluciones dobles seriadas en placas de 96 pozos, se colocaron 100 µL de PBS como control negativo, después en los pozos inferiores se agregó por triplicado, 100 µL de la fracción FCL a una concentración de 1mg/mL (previamente se determinó la concentración de proteína por Bradford 1976), se realizó lo mismo para LIP-60 y para la Lectina marcada. Posteriormente se agregaron 50 µL de PBS en el resto de placa y se realizaron diluciones seriadas comenzando en el primer pozo y pasando a los siguientes. A cada pozo se le agregaron 50 µL de eritrocitos humanos tipo A<sup>+</sup> al 2%, los cuales habían sido previamente fijados con glutaraldehído (Turner y Liener, 1975) y se incubó a 37° C durante 2 h. La placa se leyó en un microscopio invertido y la actividad aglutinante se determinó utilizando una escala arbitraria y apreciativa. La actividad específica se cuantificó mediante la ecuación.

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

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

### 6.4 Separación de proteínas contenidas en LIP-60

#### 6.4.1 Purificación de proteínas por elución en geles de electroforesis

La separación de las proteínas de LIP-60 se llevó a cabo por punción a partir de geles de poliacrilamida al 10% en los que se colocaron un total de 40 µg de

proteína por pozo en un peine de cinco pozos. La electroforesis se corrió a 80 V por 2 h a 4° C, se cortó un fragmento lateral de 1 cm del gel el cual se tiñó con Azul de Coomassie para determinar la presencia de las proteínas de interés. Con el resto del gel se realizaron cortes transversales para separar las lectinas detectada a 30 kDa, posteriormente el IP se retiró realizando otro corte en la parte inferior del gel a 8 kDa, el resto de las proteínas detectadas se colectaron. Las muestras obtenidas se congelaron a -20° C.

A partir de las bandas extraídas se realizó la separación de proteínas por el método de (Harrington, 1990). Brevemente, se colocó la acrilamida con buffer de elución Tris 1M pH8 por 5 min, seguido de tres lavados de 10 mL con agua durante 5 min cada uno. El gel se maceró y se le agregaron 10 mL de buffer tampón de elución Tris 25mM, Glicina 50 mM y SDS 0.05% aforado con agua milliQ, durante 10 min con agitación constante. Se realizaron 4 lavados a la muestra y se colectó el buffer de lavado para ser concentrado y dializado contra una membrana de 3 kDa en amicón. Posteriormente el buffer se pasó por papel filtro y después por una membrana de 0.22 micras para eliminar los restos de acrilamida. La fracción no lectina se le llamó proteína no Lectina purificada por elución (PnL-E), se mantuvo almacenada a -20°C para posteriormente realizar pruebas de actividad aglutinante efecto citotóxico y perfil proteínico.

#### 6.4.2 Purificación de proteínas por cromatografía de exclusión de peso molecular G-75 e intercambio iónico.

La fracción LIP-60 se separó en una columna de filtración en gel con Sephadex G-75 (Pharmacia Biotech; Uppsala, Suiza), dicha columna se equilibró con buffer de bicarbonato de amonio 0.01 M (pH 7.8), a una temperatura de 4° C. Se colectaron fracciones de 90 gotas a una velocidad de 1 gota cada 10 seg. A cada fracción se le midió absorbancia a 280 nm en un espectofotómetro Beckman DU-65. Todas las fracciones se sometieron a un análisis de actividad aglutinante, donde se colectaron dos pools, el primero con presencia de actividad aglutinante, el segundo pool contenía el resto de proteína sin actividad aglutinante. Posteriormente, el primer pool se concentró y se purificó por medio de una cromatografía de intercambio iónico, utilizando un cartucho Econo Pack High Q,

en un equipo ECONO BioRad, a una velocidad de flujo de 1 mL por min. Se colectaron 120 fracciones, a las cuales se les midió la presencia de actividad aglutinante. De igual forma, se colectaron los tubos que contenían proteína con actividad aglutinante (lectina) y el resto de tubos, los cuales no presentaban esta condición (proteína no lectina purificada por Cromatografía de Exclusión Molecular y Cromatografía Intercambio Iónico, PnL-C). Los dos pools se dializaron, liofilizaron y almacenaron a -20° C, para posteriormente determinar el perfil proteínico y su efecto citotóxico.

### 6.5 Análisis de citotoxicidad

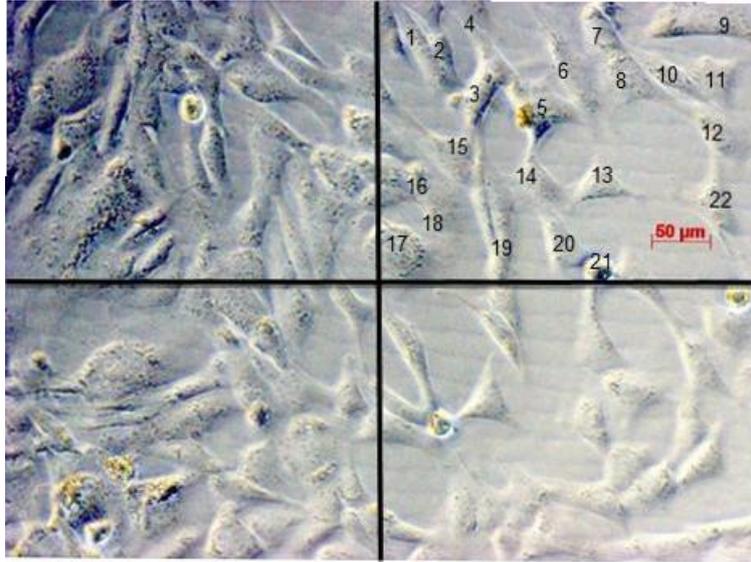
Para determinar la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) de la fracción LIP-60 se utilizaron células HT-29 de cáncer de colon (García-Gasca y col., 2012). Brevemente, las células se cultivaron en placas de 24 pozos (1x10<sup>4</sup> células/pozo) en Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB). A las 24 h se les cambió el medio a DMEM con 2% de SFB para sincronizarlas. A las siguientes 24 h se contaron dos pozos como control inicial (Co), se agregaron los tratamientos en DMEM con 0.5% de albúmina sérica de bovina (ASB) y la CL<sub>50</sub> de la FCL (0.402 mg/mL) utilizado como control positivo, se colocó una concentración igual de la fracción LIP-60 (0.804 mg/mL). La concentración probada de LIP-60 se determinó su actividad aglutinante específica con la de la FCL. Las células se incubaron por 8 h, se cosecharon y se contaron al microscopio. El porcentaje de sobrevivencia se calculó en función del número de células al inicio del experimento (Co).

Posteriormente, se determinó la actividad citotóxica de las proteínas separadas de la fracción LIP-60 sobre células 3T3/v-mos. Las células se cultivaron en placas de 24 pozos (1x10<sup>4</sup> células/pozo) en DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB). A las 24 h se les cambió el medio a DMEM con 2% de SFB para sincronizarlas. A las siguientes 24 h se contaron dos pozos como control inicial (Co) se agregaron los tratamientos en DMEM con 0.5% de albúmina sérica de bovina (ASB). Para los diferentes tratamientos se colocaron las fracciones de proteína por cuadruplicado. Para los tratamientos 1 y 2 (PnL-E y PnL-C, respectivamente) se utilizaron concentraciones de 0.402 mg/mL, para el tratamiento 3 se utilizó la CL<sub>50</sub> de la FCL (0.402 mg/mL) utilizado como control positivo, finalmente para el tratamiento 4, LIP-60, se colocó su CL<sub>50</sub> (0.804

mg/mL). Las células se incubaron por 8 h. Debido a dificultades para cosechar a las células con tripsina, se tomaron cuatro fotografías por pozo para posteriormente analizarlas en el programa ImageJ.

## 6.6 Análisis de Imagen

La toma de imagen se realizó en el microscopio invertido Zeiss- axiovert A1 a una resolución de 10X. Para cada imagen tomada se dividió el campo visual en cuatro partes y se normalizaron las imágenes, eliminando las dos con mayor y menor número de células como se observa en la Figura 1. Posteriormente se realizó un análisis en el programa IMAGEJ 1.50b (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Se tomaron diferentes parámetros como área (cobertura total de la célula), Feret (distancia entre los 2 puntos más alejados de la célula), circularidad, AR (relación de aspecto entre el eje mayor y el eje menor de un objeto), redondez (caracteriza qué tan sinuoso es el perímetro de un objeto), coloración de célula (brillante vs gris). Con todos estos parámetros, el programa calcula el total de diferencias respecto al control, dicho parámetro puede asociarse con supervivencia o muerte celular. Posteriormente cada valor que arrojó el programa, se analizó en el paquete estadístico MINITAB 17, donde se realizó una ANOVA de un factor con valor de significancia de 0.05 entre los diversos tratamientos y pos hoc con Tukey y Dunnett, para determinar la diferencia entre tratamientos



**Figura 1. Fotografía tomada al control ASB con células 3T3/v-mos. Se observa la forma en la cual se tomaron los campos de cada tratamiento independiente para su análisis (40x).**

## 7. Resultados y discusión

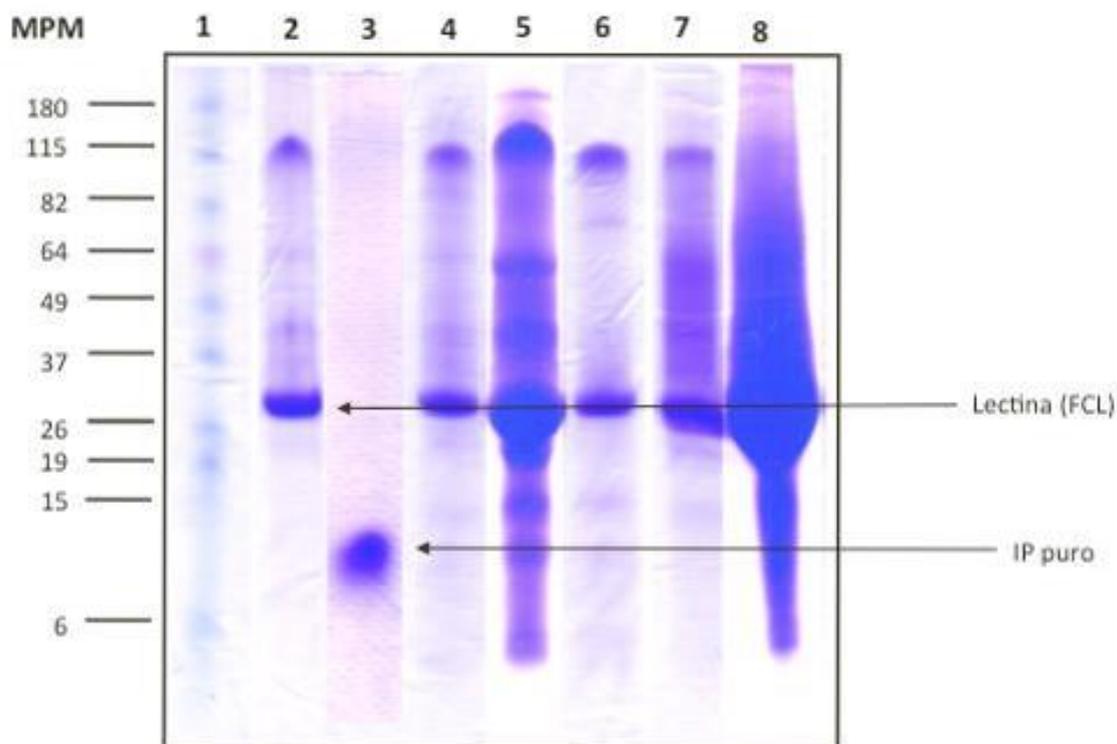
### 7.1 Obtención de la fracción LIP-60

La presencia de diversas proteínas en las leguminosas brinda una gran oportunidad de estudio, ya que presentan diferentes propiedades y se ha considerado uno de las mejores fuentes de proteína vegetal (Hernández y col., 1996, Suárez-Martínez y col., 2015). En este trabajo se describieron algunas de las características que presentan la fracción LIP-60, proveniente del frijol Tépari. Esta fracción contiene un grupo de lectinas e IP de bajo peso molecular. La separación de proteínas del extracto crudo de frijol Tépari, por ultrafiltración, no permitió una adecuada recuperación así como se muestra en la Figura 2. Si bien las proteínas solubles recuperadas por abajo del corte de 50 kDa, contenían la banda de la subunidad de lectinas y el IP, se registraron algunas bandas de alto peso molecular, aunque en menor proporción que el P-70. Sin embargo, la cantidad de proteína retenida por arriba de 50 kDa, así como la cantidad de proteína insoluble perdida después de eliminar el SDS, mostraron muy baja eficiencia del método, ya que en la fracción de interés (proteína soluble por abajo del corte de 50 kDa) sólo se recuperó el 8.4% de proteína respecto a P-70 se puede observar en el Cuadro 1. La proteína insoluble mostró muy bajo contenido de proteína ya que no fue posible determinarla con precisión dada la propia insolubilidad.

Como segunda estrategia se llevó a cabo la obtención de la fracción que contuviera tanto lectinas de interés, como IP, mediante la precipitación secuencial a partir del extracto crudo de proteína de frijol Tépari (LIP-60). Se obtuvo un rendimiento de 0.98 g de liofilizado por cada 100 g de harina, la cual contenía 0.49 g de proteína cuantificada por Bradford.

La actividad inhibitoria que presentó la fracción LIP-60 contra tripsina, utilizando los sustrato BAEE y BApNA fueron diferentes, dado que son sustratos de diferente tamaño y el rango de lectura cambia, además de que las metodologías presentan cambios, se muestran mayores unidades en el caso del sustrato BApNA. Para la quimotripsina las unidades presentadas fueron similares a las que se observaron para tripsina con el sustrato BAEE, aunque son diferentes

tipos de enzima. La actividad aglutinante de la fracción LIP-60 se vio disminuida en más del 50% en relación a la FCL reportada por Ángeles-Zaragoza en 2009.



**Figura 2. Electroforesis de las fracciones obtenidas mediante membrana de amicon de 50 kDa.** Se realizó una SDS-PAGE con gel al 10% de poliacrilamida, se cargaron 15 µg de proteína por carril. 1) marcadores de peso molecular, 2) FCL, 3) IP puro, 4) P-70, 5) proteínas por arriba del corte de 50 kDa, 6) proteínas por abajo del corte de 50 kDa, 7) proteínas insolubles por arriba del corte de 50 kDa, 8) proteínas insolubles por abajo del corte de 50 kDa.

**Cuadro 1. Recuperación de proteína con membrana de amicon-50 kDa.**

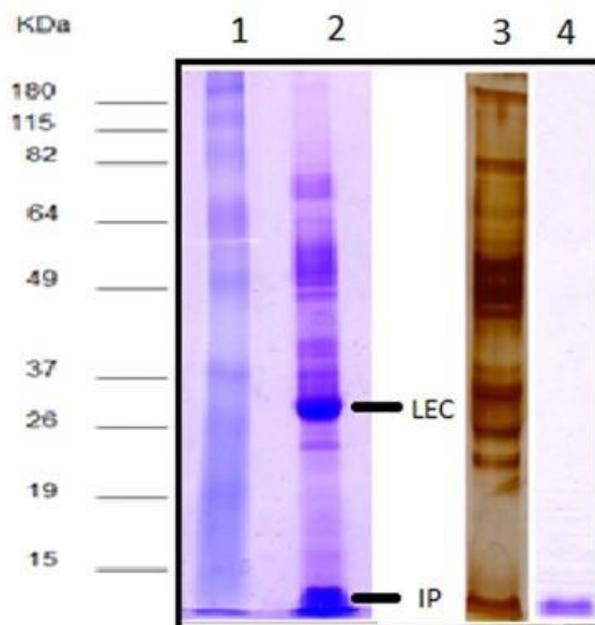
	P70	Soluble arriba de 50 kDa	Soluble de debajo de 50 kDa	Insoluble de arriba de 50 kDa	Insoluble de debajo de 50 kDa
Contenido de proteína (mg)	22.59	5.42	1.89	0.41	0.13
Recuperación (%)	100	24.00	8.40	ND	ND

ND. No determinado

**Cuadro 2. Unidades aglutinantes e inhibitorias de la fracción LIP-60 contra tripsina y quimotripsina**

<b>Unidades Inhibitorias</b>		
Enzima/Sustrato	UI/mg proteína	UI/mg liofilizado
Tripsina/BAEE	168	630
Tripsina/BApNA	4,100	15,365
Quimotripsina/SAAAPFpNa	680	2,550
<b>Unidades aglutinantes</b>		
UA/mg proteína	UA/mg liofilizado	
2,782.62	1,279.2	

El perfil proteínico permitió observar un total de 15 proteínas mediante la tinción de Coomassie, mientras que con la tinción con plata se observa un perfil distinto con 14 proteínas presentes (Figura 3). En relación con la FCL reportada en los trabajos de Torres en 2010, Ortega de Santiago en 2012, y Ferriz en 2015, se observa el mismo perfil de proteínas obtenido del frijol Tépari.



**Figura 3. Perfil electroforético de la fracción LIP-60.** 1) Marcador de paso molecular, 2) LIP-60 tinción Coumassie, se muestra la presencia de la Lectinas (LECs) a 30 kD y el Inhibidor de Proteasa (IP) en 8 kD, 3) LIP-60 tinción con plata. 4) zimograma de inhibición contra tripsina bovina.

## 7.2 Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad inhibitoria

Se probó el efecto de la fuerza iónica para inactivar a los IP. Para el caso del efecto de la fuerza iónica sobre la actividad inhibitoria, se observó un aumento de la actividad inhibitoria con la molaridad del buffer. Es posible que las altas concentraciones de sales potencialicen la inhibición, teniendo su efecto máximo a 1 M (Figura 4). Esta concentración salina se ha reportado en el intestino humano (Márquez y col., 2004), lo que sugiere que la actividad IP permanece intacta.

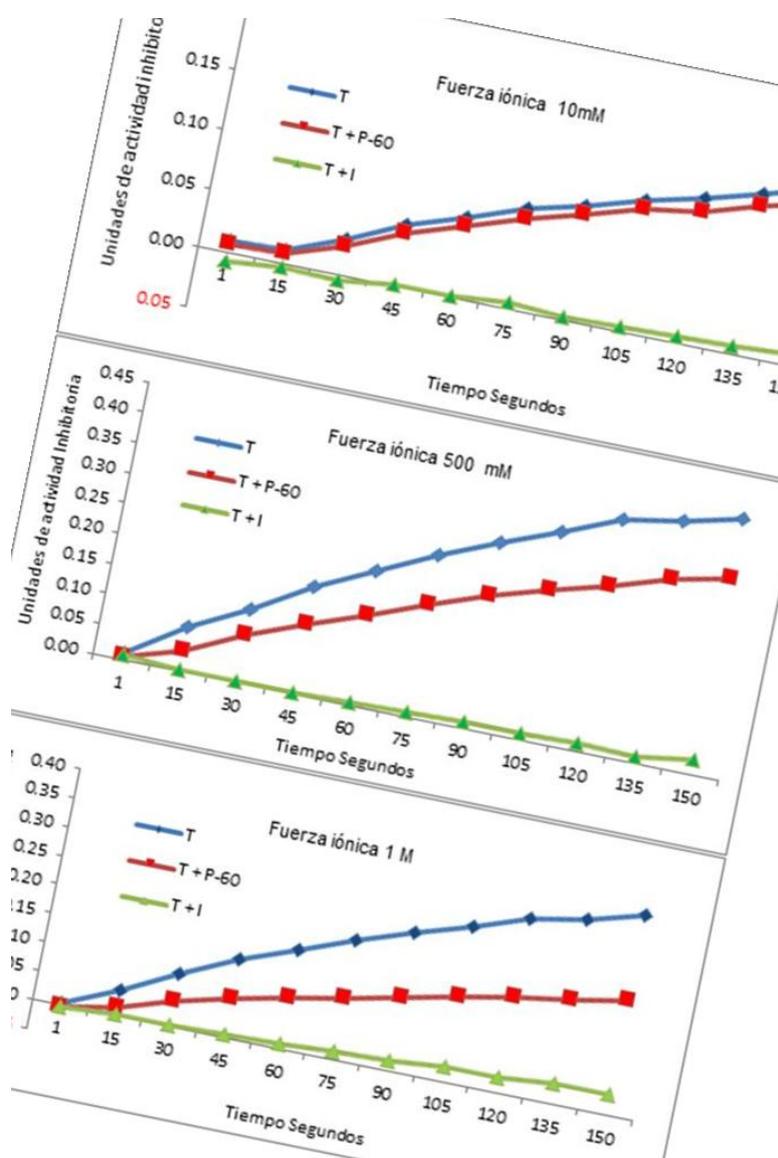


Figura 4. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad Inhibitoria de la fracción LIP-60, contra tripsina bovina.

### 7.3 Desglicosilación de LIP-60

Con la finalidad de inactivar a las lectinas y permitir la determinación de la actividad biológica de las proteínas no lectina, se probó la desglicosilación enzimática. Sin embargo, la desglicosilación con PNGasa F no fue suficiente para retirar los oligosacáridos de las lectinas bajo las condiciones probadas (Cuadro 3). Probablemente sea necesario utilizar otras enzimas en conjunto y a mayores tiempos de incubación. Sin embargo, este procedimiento no era consistente con la finalidad de proyecto.

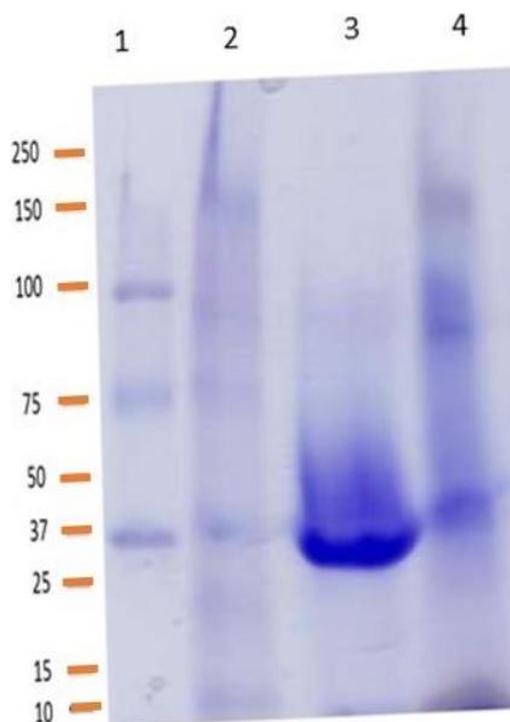
**Cuadro 3. Aglutinación recuperada posterior al tratamiento enzimático.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración de enzima</b>	<b>Lectina</b>	<b>Agglutinación a 12 h</b>	<b>Agglutinación a 24 h</b>
<b>PNGasa F</b>	6U	50 µg	8	7
<b>Control +</b>	---	50 µg	8	8
<b>Control -</b>	---	0 µg	---	---

Una unidad equivale a la reacción que 1 mili-unidad (IUB) Unidades biológicas internacionales. En donde (U) es la unidad que cataliza la liberación de oligosacáridos ligados a N de un nanomol a 37°C, a pH 7.5.

### 7.4 Separación de proteínas contenidas en LIP-60

La técnica de purificación por elución presentó algunos problemas en la recuperación de la proteína de interés. En la Figura 5 se muestra la proteína no lectina, además de la lectina presentes en la fracción LIP-60. Se observó un barrido en el carril de la proteína no lectina, posiblemente por degradación de proteína. En el Cuadro 4 se muestra la recuperación de proteína por este método.



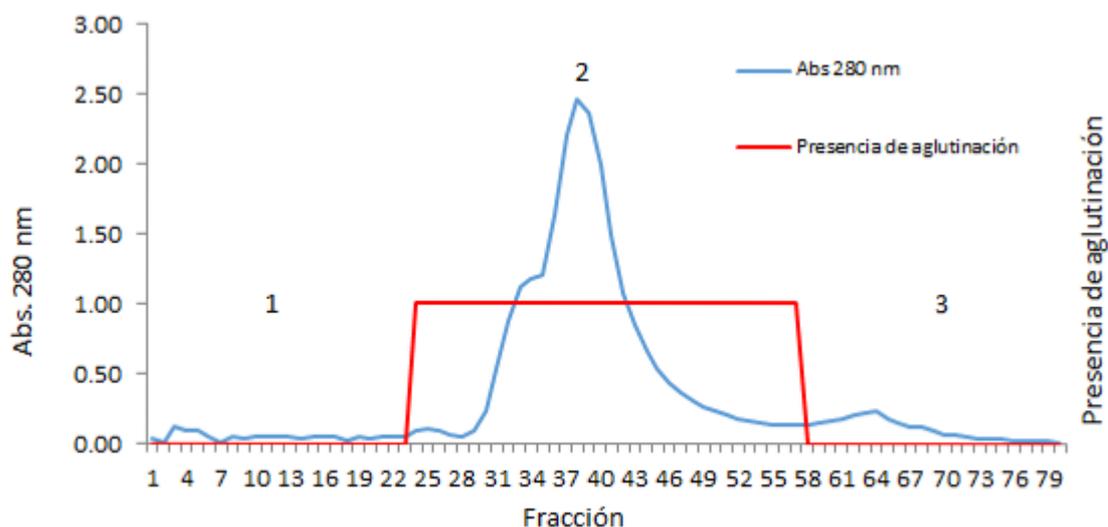
**Figura 5. Perfil electroforético de las fracciones de proteína obtenidas por el método de Elución de la fracción LIP-60.** 1) Marcador de peso molecular 2) Proteína no L 10 $\mu$ g 3) Lectina 4) Proteína no L. Se cargaron 20  $\mu$ g de proteína por carril.

**Cuadro 4. Porcentaje de recuperación a partir de la extracción por elución de las proteínas purificadas por SDS PAGE**

PROTEÍNA	RECUPERACIÓN ( $\mu$ g)
LIP-60 inicial	5,600
Lectina	297.2
Inhibidor de proteasas	507.92
Proteína no lectina ni IP	1322.72
Total	2127.84 (38%)

Utilizando la separación de proteínas mediante cromatografía de exclusión de peso molecular y cromatografía de intercambio iónico, fue posible obtener una buena separación de la proteína. En la Figura 6 se muestra el cromatograma obtenido por exclusión de peso molecular, donde se aprecia el pico característico de la FCL reportado por Torres en 2010. Si bien, mediante este método es posible separar las lectinas de los IP, no es posible separar otras proteínas diferentes a las lectinas. Por ello se tomó la fracción 2 y se sometió a

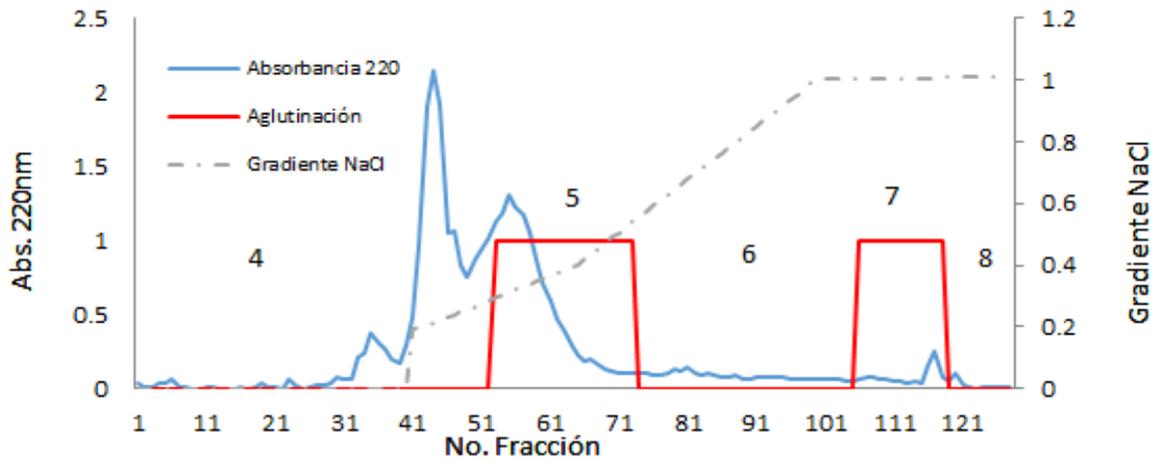
cromatografía de intercambio iónico, como se observa en la Figura 7, esto para separar de mejor forma las lectinas del resto de proteínas de la fracción.



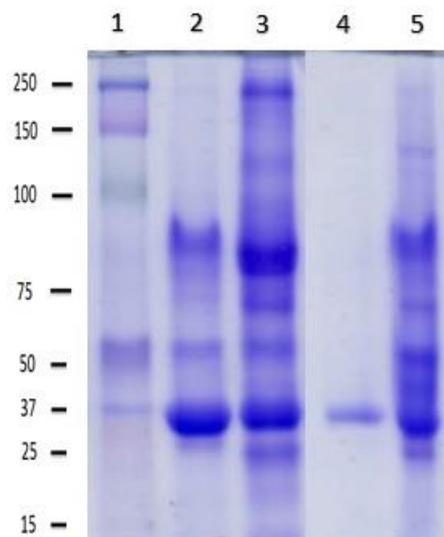
**Figura 6. Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-75 de LIP-60.** En azul se muestra el perfil a 280 nm de la proteína LIP-60, en rojo se muestra la presencia de aglutinación.

En la Figura 7 se muestra el cromatograma de intercambio iónico de la fracción 2 obtenida de la cromatografía de exclusión de peso molecular. Las fracciones 4, 6 y 8 que se observan, se unieron a las 1 y 3 obtenidas de la cromatografía de exclusión de peso molecular, a dichas fracciones se les llamó proteína no Lectina obtenida por cromatografía (PnL-C). Las fracciones 5 y 7 se unieron y se les llamó Proteína tipo Lectina. Para los dos tipos de proteína se corrió un gel de poliacrilamida al 10%, para determinar su perfil proteico como se observa en la Figura 8.

En la Figura 8 se observa el perfil electroforético para las distintas muestras obtenidas. Se observa la banda bien definida de la proteína tipo lectina presente en la fracción LIP-60 carril 4. En el carril 5 se puede observar el resto de proteínas y se nota una banda que presenta un peso molecular similar a la que se muestra en el carril 4. Dicho resultado sugiere que existen proteínas tipo no lectinas, que presenten un peso molecular similar al de la lectina. Este método de separación mostró tener mejores resultados tanto en reproducibilidad como en rendimiento.



**Figura 7. Cromatografía de intercambio iónico de la fracción 2.** En azul se muestra la absorbancia a 220 nm, en rojo la presencia de aglutinación, en verde el gradiente de salinidad de 0 M a 1 M NaCl.

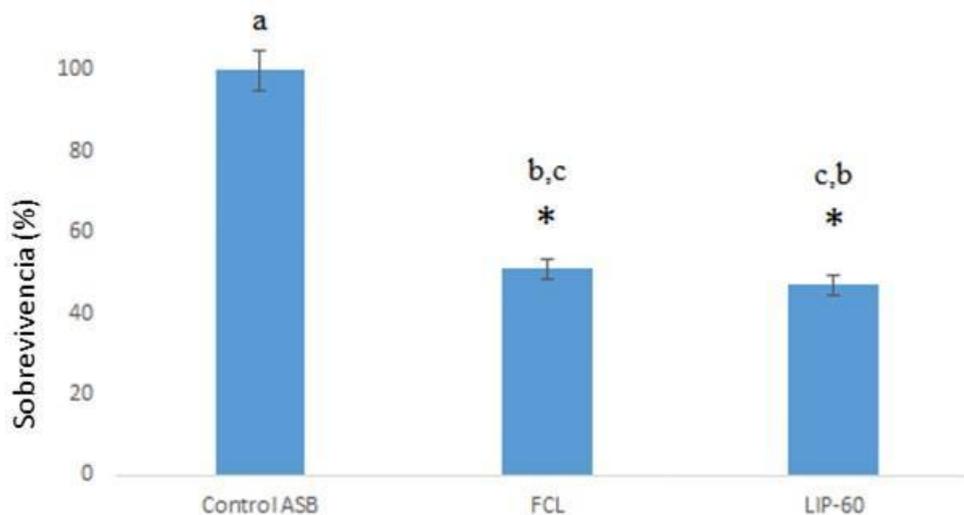


**Figura 8. Perfil electroforético de las fracciones obtenidas de la fracción LIP-60 a partir de los métodos cromatográficos.** 1) Marcador de peso molecular 2) FCL 3) LIP-60 4) Lectina fracciones 5 y 7, 5) Proteína no Lectina obtenida por cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico, (PnL-C) fracciones 1, 3, 4 y 6.

### 7.5 Análisis de citotoxicidad

Se determinó el efecto citotóxico de LIP-60 sobre células de cáncer de colon HT-29 (Figura 9). Debido a que se cuenta con los datos de citotoxicidad para la FCL sobre la misma línea celular, se determinó la actividad aglutinante de LIP-60, para homologar las dosis en función de su capacidad aglutinante. Obteniendo para LIP-60 (2,782.61 UA/mg proteína) en relación a la FCL, 6,497.5 UA/mg

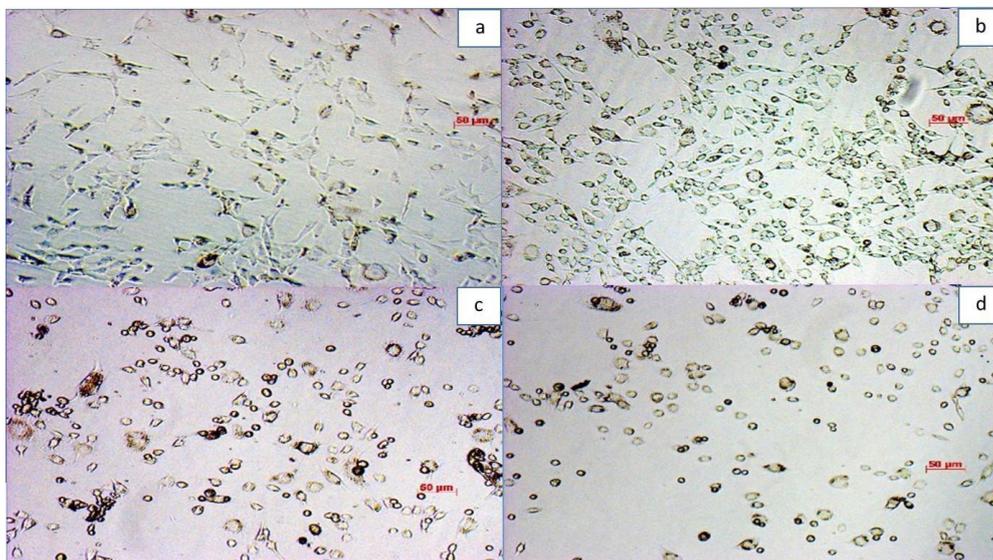
proteína. Por lo anterior, se duplicó la concentración para igualar las unidades aglutinantes de la CL<sub>50</sub> de la FCL. Se observó un efecto citotóxico similar para ambas fracciones. En estudios anteriores se determinó que el IP no presenta citotoxicidad, (García-Gasca y col., 2012), por lo que este resultado sugiere que el efecto citotóxico está relacionado directamente a la presencia de lectinas en la fracción.



**Figura 9. Efecto citotóxico de FCL y LIP-60 sobre células HT-29.** Se observa el control ASB (0.402 mg/mL) y los tratamientos FCL (0.402 mg/mL) y LIP-60 (0.804 mg/mL). Se cosecharon las células con tripsina 8 horas después y se contaron con un hemocitómetro. Los asteriscos en la gráfica muestran diferencia estadística significativa respecto al control (Dunnett,  $p \leq 0.05$ ), las letras minúsculas indican diferencia entre todos los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

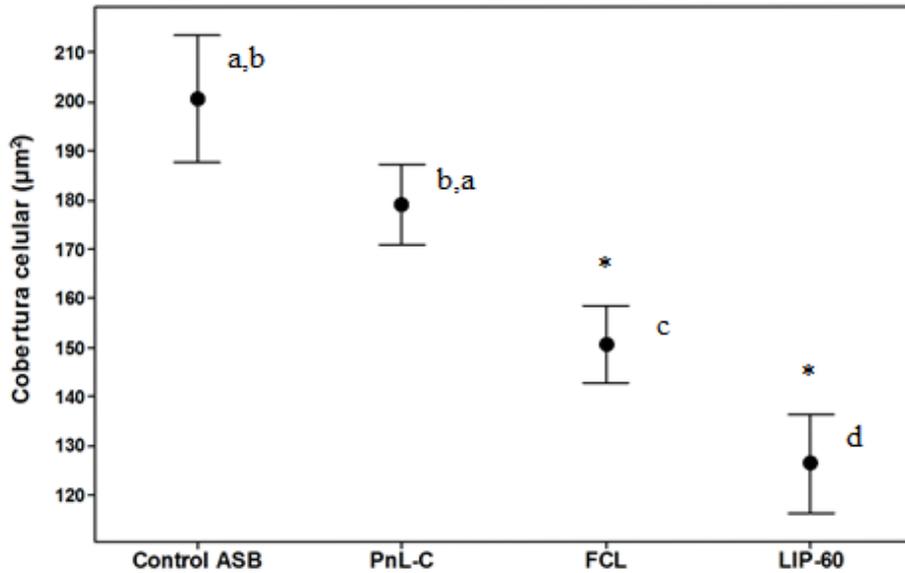
Debido a que el efecto de la FCL y de IP de frijol Tépari se ha caracterizado previamente sobre fibroblastos 3T3/v-mos (García-Gasca y col., 2012), se determinó el efecto citotóxico de la PnL-C, FCL y LIP-60 con la finalidad de conocer particularmente el efecto de las PnL-C. En la Figura 10 se muestran microfotografías de cada uno de los tratamientos. Con estas imágenes es posible determinar que la presencia de lectinas en los tratamientos provoca cambios significativos en la morfología celular (c y d). Estos cambios pueden estar relacionados con el desprendimiento celular típico del proceso de muerte, además de que el tamaño y la coloración cambian en relación al control, tanto el control como la PnL-C (a y b) muestran morfología tipo fibroblasto con mayor

número de focos de adhesión, buen tamaño y dispersión más homogénea en la caja, además de que su simetría fue muy similar entre ellas. Esta característica fue observada por García-Gasca en 2002 y García y col., en 2012.



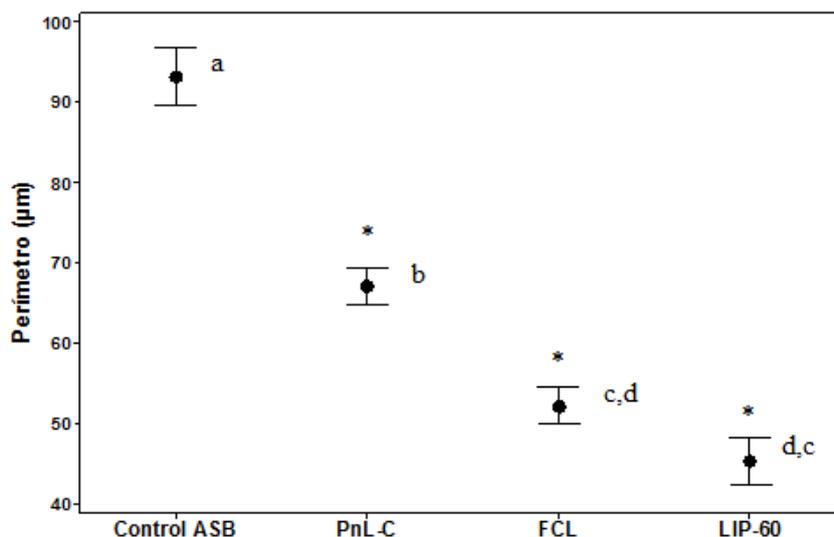
**Figura 10. Morfología celular de fibroblastos 3T3/v-mos tratados con las fracciones estudiadas.** Se muestra a) Control ASB, b) proteína no lectina purificada por cromatografía de exclusión molecular y cromatografía intercambio iónico (PnL-C), c) fracción concentrada de lectina (FCL), d) fracción lectina-inhibidor de proteasas (LIP-60). Aumento 10x.

La Figura 11 muestra el parámetro de área (cobertura celular). Este parámetro permitió diferenciar si las células se encontraban adheridas a través del cálculo de área cubierta. La adhesión al sustrato es un indicativo de sobrevivencia celular, se observa que la PnL-C, no presentó diferencia estadística significativa respecto al control, mientras que las células tratadas con FCL o LIP-60 provocaron una disminución significativa. Se observa que, incluso, existe diferencia estadística entre FCL y LIP-60, esta última presentó el valor más bajo, lo que sugiere un efecto mayor cuando se encuentran juntos IP y lectinas.



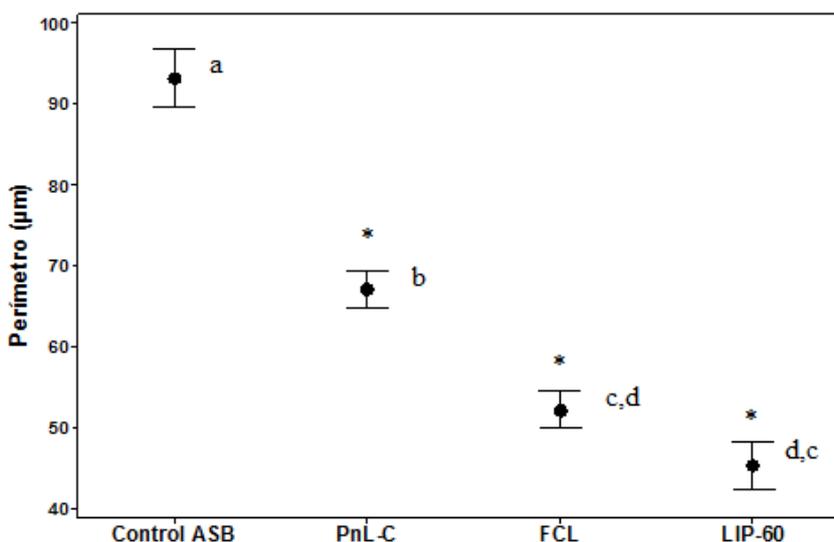
**Figura 11. Cobertura celular de área para células 3T3/v-mos tratadas con las proteínas de interés.** Los asteriscos muestran diferencia estadística significativa respecto al control (Dunnett,  $p \leq 0.05$ ), las letras minúsculas indican diferencia entre todos los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

Para el perímetro celular (Figura 12), se observaron resultados similares para el caso de los tratamientos con FCL y LIP-60, sin embargo, se observó un efecto significativo con el tratamiento con PnL-C, lo que sugiere disminución del tamaño celular, posiblemente como resultado de citotoxicidad. Este mismo resultado se observó para la circularidad (Figura 13), en donde los tratamientos mostraron una mayor circularidad, parámetro relacionado con muerte celular. La circularidad es una característica que presenta una de las mayores diferencias entre los tratamientos, ya que (mientras un objeto sea más circular, su dispersión en la gráfica de acerca más a 1).



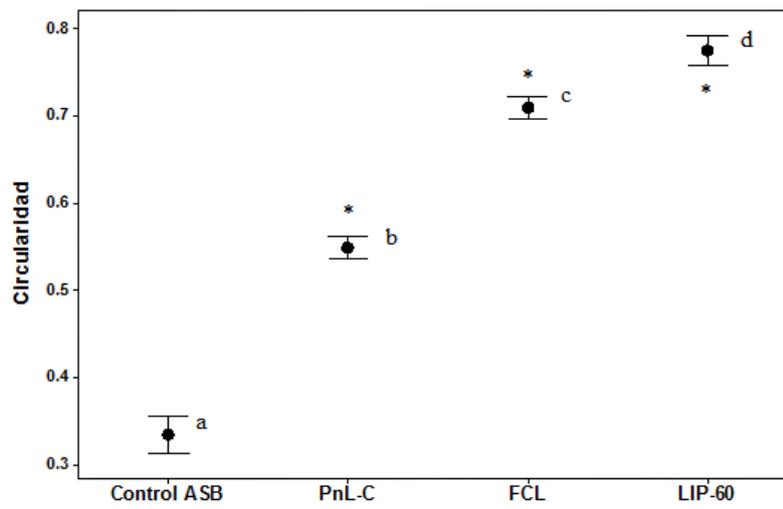
**Figura 12. Cobertura celular de área para células tratadas con las fracciones de proteína estudiadas.** Los asteriscos muestran diferencia estadística significativa respecto al control (Dunnett,  $p \leq 0.05$ ), las letras minúsculas indican diferencia entre todos los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Se utilizó el programa ImageJ.

En la Figura 13 se puede observar que el perímetro celular no mostró diferencias significativas, mientras que los tratamientos control y PnL-C fueron completamente diferentes a los controles positivos. Este parámetro permite determinar el efecto que presenta el tratamiento sobre el perímetro de cada célula, y determinar algún tipo de afectación.



**Figura 13. Perímetro celular, tratamientos con las fracciones de proteína estudiadas sobre células.** Los asteriscos muestran diferencia estadística significativa respecto al control (Dunnett,  $p \leq 0.05$ ), las letras minúsculas indican diferencia entre

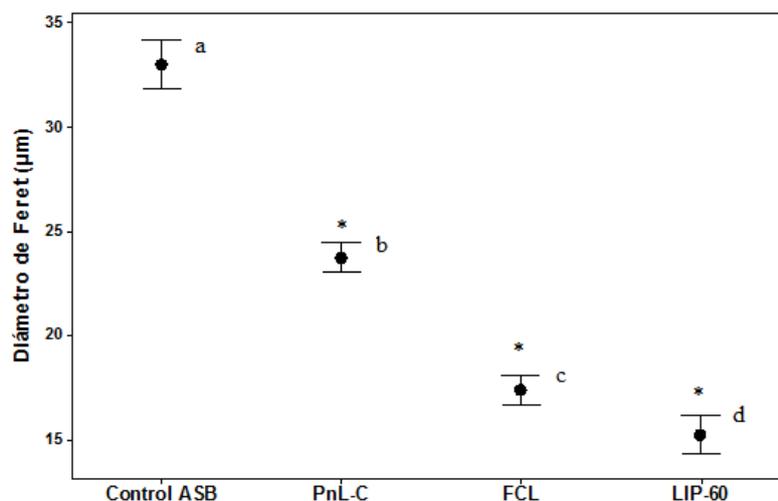
todos los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Se utilizó el programa ImageJ. La circularidad es un factor que permite discriminar el estado en que se encuentran las células ya que, al ser fibroblastos, su naturaleza es permanecer expandidas y formar estructuras amorfas. Con un criterio de circularidad cercano a 1 la célula ha perdido su estructura, lo que puede relacionarse con muerte celular. El control presentó una circularidad de 0.33, mientras que el tratamiento que presentó mayor circularidad fue el tratado con LIP-60.



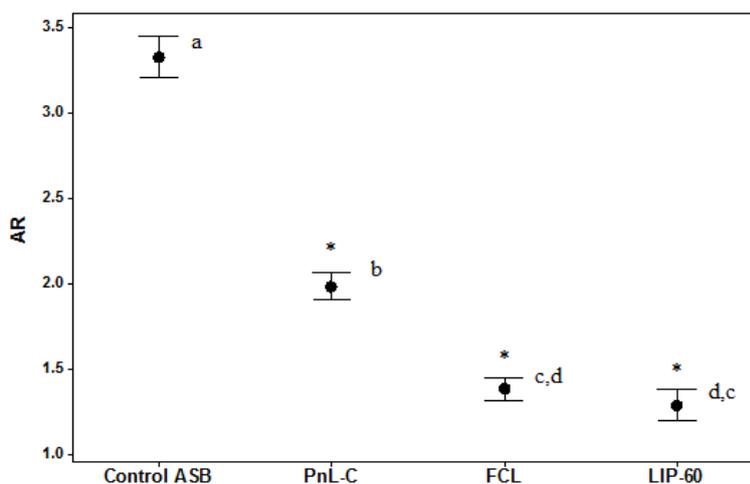
**Figura 14 Circularidad celular para células tratadas con las fracciones de proteína estudiadas.** Los asteriscos muestran diferencia estadística significativa respecto al control (Dunnett,  $p \leq 0.05$ ), las letras minúsculas indican diferencia entre todos los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Se utilizó el programa ImageJ.

La diferencia de Feret o longitud celular (Figura 15), presentó resultados consistentes con el perímetro y la circularidad, ya que los tratamientos afectaron diferencialmente la distancia de los dos puntos más alejados de la célula. Dichos resultados son similares a los reportados por Kapur y col. en 2007, en donde encontraron que el Feret se modificó entre diferentes cultivos celulares primarios, afectando la morfología celular.

La relación aspecto es la diferencia que existe entre el eje inferior y el eje superior de la célula, puede ayudar a diferenciar entre un tipo celular y otro, ya que se pueden detectar cambios muy puntuales en la célula. En la Figura 15 se muestra que los diversos tratamientos fueron estadísticamente diferentes en relación al control, pero se observa que los tratamientos FCL y LIP-60 no presentaron cambios estadísticamente significativos entre ellos.



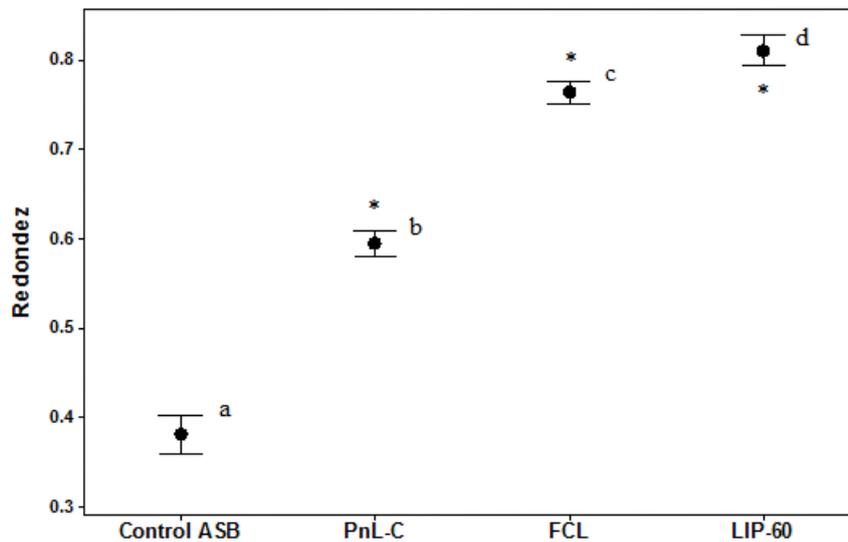
**Figura 15. Feret celular para células tratadas con las fracciones de proteína estudiadas.** Los asteriscos muestran diferencia estadística significativa respecto al control (Dunnett,  $p \leq 0.05$ ), las letras minúsculas indican diferencia entre todos los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Se utilizó el programa ImageJ.



**Figura 16. Relación de aspecto (AR) para células tratadas con las fracciones de proteína estudiadas.** Los asteriscos muestran diferencia estadística significativa respecto al control (Dunnett,  $p \leq 0.05$ ), las letras minúsculas indican diferencia entre todos los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Se utilizó el programa ImageJ.

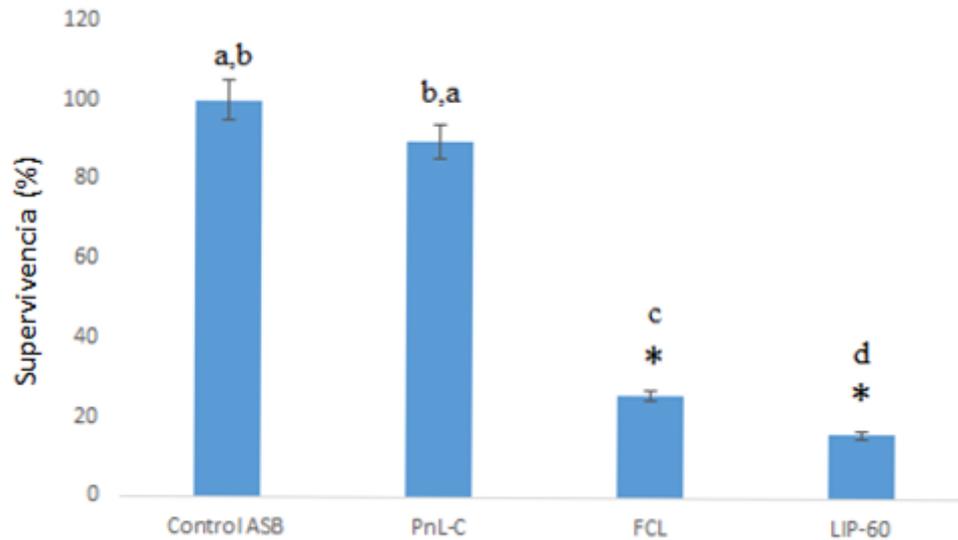
La redondez (Figura 17) que presentan las células 3T3/v-mos es poco usual, ya que son células que son células adherentes, la redondez está relacionada con la separación de la célula y muerte celular. Agnieszka y col. en 2015 determinaron que el incremento en la concentración de metformina en fibroblastos 3T3,

afectaba redondez de la célula, llevándola de alguna forma a ser menos amorfa, pero no perdía de sus capacidades de división o invasión celular.



**Figura 17. Capacidad (Redondez) para células tratadas con las fracciones de proteína estudiadas.** Los asteriscos muestran diferencia estadística significativa respecto al control (Dunnett,  $p \leq 0.05$ ), las letras minúsculas indican diferencia entre todos los tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Se utilizó el programa ImageJ.

Finalmente, utilizando todos estos parámetros fue posible calcular el porcentaje de supervivencia celular (Figura 18). De esta forma, fue posible observar que la PnL-C no provoca efecto citotóxico, mientras que la FCL y LIP-60 provocan citotoxicidad de forma diferencial.



**Figura 18. Porcentaje de supervivencia a 8 h de los diversos tratamientos de proteína sobre células 3T3/v-mos.** Las células se trataron durante 8 horas y posteriormente se determinó el porcentaje de supervivencia mediante análisis de imagen con las fotografías tomadas de los tratamientos, esto a partir de los diversos parámetros antes descritos en el programa ImajeJ,

Con estos resultados fue posible determinar que la presencia de lectinas en los tratamientos provocó cambios significativos en la morfología y aspecto celular, relacionados posiblemente con el proceso de muerte celular. El resultado para FCL fue similar al descrito anteriormente (García-Gasca y col., en 2012). El IP de frijol Tépari ejerce un efecto positivo sobre la adhesión celular y algunas de sus características están descritas por Campos y cols, 1997 y Roldán-Padrón 2015. Dicho inhibidor se encuentra presente en la fracción LIP-60 y en la fracción PnL-C, lo que puede explicar la dificultad para cosechar las células con tripsina y cambios en la morfología celular.

## **8. Conclusiones**

La obtención de una fracción combinada lectinas-IP de frijol Tépari fue posible utilizando precipitación secuencial primero al 40% y posteriormente al 60% con sulfato de amonio. Este método permite una menor manipulación de la muestra, menores pasos de purificación y, con ello, menores costos.

El análisis de las proteínas no lectina sobre la citotoxicidad, permitió determinar que la citotoxicidad está relacionada directamente con la presencia de lectinas, sin embargo, no se descarta el efecto de IP sobre la adhesión celular u otra proteína presente en esta fracción.

Los análisis de imagen permitieron determinar la estructura, tamaño, morfología, muerte celular y otras características celulares, fueron de gran utilidad en el análisis de los tratamientos con las diferentes fracciones.

La presencia de proteínas inespecíficas puede llevar a un grado de estrés a las células, dicho resultado indicó que el tratamiento PnL-C puede causar cambios en la estructura celular, no se descarta un proceso de adaptación al medio celular.

La suma de los diversos parámetros analizados en los tratamientos con células 3T3/v-mos permitieron hacer una aproximación a la determinación de muerte celular. Será necesario profundizar más en el uso de esta metodología.

## 9. Referencias

- Adamova L, Malinová L, Wimmerová M. 2014. New Sensitive Detection method for lectin hemagglutination using microscopy. *Microscopy Research and Technique*. 77:841-849.
- Agnieszka, U., Czyrek, A., Basinska, K., Trynda, Marycz, K. (2015). Effect of Metformin on Viability, Morphology, and Ultrastructure of Mouse Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Balb/3T3 Embryonic Fibroblast Cell Line, 2015.
- Ángeles-Zaragoza M. V. 2009, Caracterización del efecto citotóxico de un concentrado de lectina de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células de cáncer de colon (ht-29). Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Behzad S, Pirani A, Mosaddegh M. 2014. Cytotoxic activity of some medicinal plants from hamedan district of Iran. *Iran Journal Pharmaceutical Research*. 13:199–205.
- Blum H, Beier H, Gross HJ. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* 8:93–99
- Boyd WC, Sharpleigh E. 1954. Specific precipitating activity of plant agglutinins (Lectins). *Science*. 119:419.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Analytical Biochemistry* 72:248-54.
- Campos-Contreras J, Martínez-Gallardo N, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A. 1997. Purification and partial characterization of a proteinase inhibitor from Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) seeds. *Journal Food Biochemistry* 21:203-218.

- Carlini CR, Grossi-De-Sá MF. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40 (11):1515-39
- Clemente A, Marín-Manzano MC, Jiménez E, Arques MC, Domoney C. 2012. The anti-proliferation effect of TI1B, a major Bowman-Birk inhibitor from pea (*Pisum sativum* L.), on HT29 colon cancer cells is mediated through protease inhibition. *British journal of Nutrition*. 108 (Suppl 1): 135–144.
- Clemente A, Sonnante G, Domoney C. 2011. Bowman-Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health: current status and perspectives. *Current Protein & Peptide Science*. Sc 12:358-373.
- Da Silva L, Correia M. 2014. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. *Frontiers in Microbiology* 1-3.
- Damodaran D, Jeyakani J, Chauhan A, Kumar N, Chandra NR, Surolia A. 2008. Cancer Lectin DB: a database of lectins relevant to cancer, *Glycoconjugate J*. 25:191–198.
- Debouck DG. 1994. *Phaseolus acutifolius*. Plant production and protection series.26: 47-62. <https://www.hort.purdue.edu/newcrop/1492/beans.html> Última consulta Agosto 2015.
- Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives Biochemistry Biophysics* 95:271-278.
- Ferriz-Martinez R, Garcia-Garcia K, Torres-Arteaga I, Rodriguez-Mendez AJ, Guerrero-Carrillo MJ, Moreno-Celis U, Angeles-Zaragoza MV, Blanco-Labra A, Gallegos-Corona MA, Robles-Alvarez JP, Mendiola-Olaya E, Andrade-Montemayor HM, Garcia OP, 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.

- Garcia-Gasca T, Garcia-Cruz M, Hernandez-Rivera E, Lopez-Martinez FJ, Castañeda-Cuevas AL, Yllescas-Gasca L, Rodriguez-Mendez AJ, Mendiola-Olaya E, Castro-Guillen JL, Blanco-Labra A. 2012. Effects of Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Protease Inhibitor and Semipure Lectin Fraction son Cancer Cells. *Nutrition and Cancer: And International Journal*. 64(8):1269–1278
- García-Gasca, T., Salazar-Olivo, L. a, Mendiola-Olaya, E., & Blanco-Labra, a. (2002). The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on in vitro cell proliferation and cell adhesion of transformed cells. *Toxicology in Vitro* . 16(3):229–33.
- Globocan. 2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalnce worldwide in 2012. WHO. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> Última consulta Octubre 2015
- González de Mejía E, Valadez-Vega M, Reynosos-Camacho R, Loarca-Pina G. 2005. Tannins, trypsin inhibitors and lectin Cytotoxicity in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) beans. *Plant Foods for Human Nutrition* 60:137-145
- Grassi D, Desideri G, di Giosia P, de Feo M, Fellini E, Cheli P, Ferri L, Ferri C. 2013. Tea, flavonoids, and cardiovascular health: Endothelial protection. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 98:1660S–1666S.
- Harrington MG. 1990. Purification procedures: electrophoretic methods. 182:488–495.
- He S, Simpson BK, Sun H, Ngadi O, Ma Y, Huang T. 2015. *Phaseolus vulgaris* Lectins: A Systematic Review of Characteristics and Health Implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Hernández CJ, Carrillo G, Campos A, 1996. Caracterización de cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) por sus cualidades físicas y nutricionales. I. Aspectos Metodológicos *Agronomía Mesoamericana* 7(2): 37-41. 1996

- Jaffé, WG. 1980. Hemagglutinins (Lectins). In: Toxic constituents of plant foodstuffs. Lienes I.E. (ed) Academic Press, New York, N.Y. pp. 73-102
- Kapur U, Antic T, Venkataraman G, Durazo-Arvizu R, Quek MM, Flanigan RC, Wojcik EM. 2007. Validation of World Health Organization/International Society of Urologic Pathology 2004 classification schema for bladder urothelial carcinomas using quantitative nuclear morphometry: identification of predictive features using bootstrap method. *Urology*, 70(5):1028–33.
- Katoch R, Sharma K, Singh SK, Thakur N. 2015. Evaluation and characterization of trypsin inhibitor from rice bean with inhibitory activity against gut proteases of *Spodoptera litura*, 70:287–295.
- Kumar S, Verma AK, Sharma A, Kumar D, Tripathi A, Chaudhari B, Das M, Jain S, Dwivedi PD. 2013. Phytohemagglutinins augment red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) induced allergic manifestations. *Journal Proteomics* 93:50-64.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- López Sánchez C, López-Martínez FJ, Castañeda-Cuevas AL, Yllescas-Gasca L, Ferríz-Martínez RA, Torres-Arteaga IC, Gallegos-Corona MA, Rodríguez-Méndez AJ, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A, García-Gasca T. 2010. Evaluación de la Toxicidad In Vitro e In Vivo de Lectinas de Frijol Tépari. *Revista Ciencia@UAQ*. 3:3-13.
- Malats N, Castaño-Vinyals G. 2007 Cancer epidemiology: study designs and data analysis. *Clinical and Translational Oncology* 9(5):290-7.
- Márquez M, Nilsson S, Lennartsson L, Liu Z, Tammela T, Raitanen M, Holmberg AR. 2004. Charge-dependent targeting: Results in six tumor cell lines. *Anticancer Research* 24:1347–1351.

- Mendoza W, Gandolfo L, Ponce L, Novello J, Marangoni S. 2007. Estudios Estructura y Función de Una Lectina Aislada de Semillas de *Caesalpinia Spinosa* Kuntze (Tara). *Idesia* (Chile) 25(2):49–58.
- Mendoza W, Casaretto JA. 2012. The serine protease inhibitors and plant-insect interaction. *Idesia*. 30:121-126.
- Mello MO, Tanaka AS, Silva-Filho MC. 2003. Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. *Molecular Phylogenetic Evolution* 27: 103–112.
- Mojica L, de Mejía EG. 2015. Characterization and Comparison of Protein and Peptide Profiles and their Biological Activities of Improved Common Bean Cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mexico and Brazil. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70 (2): 105–112.
- Ohlsson BG, Weström BR, Karlsson BW, 1986. Enzymoblotting: a method for localizing proteinases and their zymogens using para-nitroanilide substrates after agarose gel electrophoresis and transfer to nitrocellulose. *Analytical Biochemistry* 152 (2):239-244
- Ortega de Santiago LA. 2012 Purificación y análisis parcial de una lectina aislada de semilla de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*). Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias CINVESTAV Unidad Irapuato 1-67.
- Osman M, Reid P, Weber Ch. 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
- Prasad E., Dutta-Gupta A., Padmasree B. 2010. Purification and characterization of a Bowman-Birk proteinase inhibitor from the seeds of blackgram (*Vignamungo*). *Phytochemistry* 71:363- 372.
- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. 2008. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*. 36:320-325.

- Roldán Padrón O. 2014 Caracterización molecular de un complejo enzima-inhibidor activo formado entre quimotripsina bovina y TBPI. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias CINVESTAV Unidad Irapuato 1-49.
- Rougé P, Culerrier R, Granier C, Rancé F, Barre A. 2010. Characterization of IgE-binding epitopes of peanut (*Arachis hypogaea*) PNA lectin allergen cross-reacting with other structurally related legume lectins. *Molecular Immunology*. 47(14):2359-2366.
- Schwartz G, Takenaka Y. 1955. Spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsins activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 16:571-575.
- Suárez-Martínez SE, Ferriz-Martínez RA, Campos-Vega R, Elton-Puente JE, De la Torre-Carbot K, García-Gasca T. 2015. Bean seeds: leading nutraceutical source for human health. *Journal Food*.
- Torres Arteaga IC. 2010. Purificación y caracterización parcial de una lectina de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius*) con actividad citotóxica sobre células cancerígenas. Tesis para obtener el grado de Maestría en Nutrición Humana, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.1-83.
- Turner RH, Liener IE. 1975. The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. *Analytical Biochemistry*.68:651-653.
- Ueno, K. Ohtawa, Y. Sakurai, Y. Kodera, M. Hiroto. 2000. Polyethyleneglycol-modified Concanavalin A as an effective agent to stimulate anti-tumour cytotoxicity. *Cancer Detection and Prevention*. 24 100–106.
- Valadez-Vega C, Gerardo Alvarez-Manilla, Leticia Riverón-Negrete, Alejandro García-Carrancá. 2011, Detection of Cytotoxic Activity of Lectin on Human Colon Adenocarcinoma (Sw480) and Epithelial Cervical Carcinoma (C33-A). *Molecules* 16:2107-2118.

- Vinokurov KS, Oppert B, Elpidina EN. 2005. An overlay technique for postelectrophoretic analysis of proteinase spectra in complex mixtures using p-nitroanilide substrates. *Analytical Biochemistry* 337(1):164–166.
- Walker MJ. 1994. Basic protein and peptide protocols. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 32 pp 120-126.
- Wang LX, Amin MN. 2014. Chemical and chemoenzymatic synthesis of glycoproteins for deciphering functions. *Chemistry and Biology*. 21:51-66.
- WHO. World Health Organization. 2015. Cancer. <http://www.who.int/topics/cancer/es/> Última consulta Septiembre de 2015.
- Zachara, NE, Hart GW. 2004. Protein glycosylation, *The Journal of Biological Chemistry* 3:504-509.
- Zaugg I, Magni C, Panzeri D, Maminati MG, Bollini R, Benrey B, Bacher S, Sparvoli F 2013 QUES, a new *Phaseolus vulgaris* genotype resistant to common bean weevils, contains the arcelin-8 allele coding for new lectin-related variants. *Theoretical and Applied Genetics*. *Theor Appl Genet* 126:647– 661