



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ENSAYO DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA DE UNA LECTINA
RECOMBINANTE DE FRIJOL TÉPARI (*Phaseolus
acutifolius*) EN RATONES CD-1”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

SERGIO FRANCISCO VILICAÑA ALVAREZ

DIRIGIDA POR

Dra. TERESA GARCÍA GASCA

CODIRIGIDA POR

M.I.M DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIÉRREZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Ensayo de toxicidad subcrónica de una lectina
recombinante de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*)
en ratones CD-1.

por

Sergio Francisco Villicaña Alvarez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: FQLIC-267641



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ENSAYO DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA DE UNA LECTINA
RECOMBINANTE DE FRIJOL TÉPARI (*Phaseolus
acutifolius*) EN RATONES CD-1”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

SERGIO FRANCISCO VILICAÑA ALVAREZ

CODIRIGIDA POR

Dra. TERESA GARCÍA GASCA

M.I.M. DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIÉRREZ

Sinodales

Dra. María de Jesús Teresa García Gasca
Presidenta

M. en I.M. David Gustavo García Gutiérrez
Sinodal

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas
Sinodal

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Sinodal

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Sinodal

DEDICATORIAS

Para Claudia y Jaime.

*Gracias por ser guías mientras nos hacemos
camino en este mundo ordinario y hacerlo extraordinario.*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se hubiera llevado a cabo sin el apoyo de muchas personas. Cada una de ellas aportó de manera distinta e inmensa a este proyecto, podrán encontrar parte de su esencia plasmada en este par de hojas.

A la Dra. Teresa García Gasca, por depositar la confianza para realizar este proyecto y pertenecer a un excelente grupo de trabajo. Ciertamente se necesitan más personas que estén interesadas en la ciencia y apoyen al talento de los jóvenes como usted lo hizo conmigo.

Al Dr. Roberto Esquivel García, que permaneció presente brindando su apoyo, conocimientos, anécdotas y nuevas perspectivas. Gracias por ser el guía en este sinuoso camino.

A la MVZ. Verónica Andrade Portillo y a la Dra. Dulce Palmerín Carreño, por compartir una pequeña parte de todo el conocimiento que tienen, por toda su paciencia, enseñanza y excelentes pláticas.

A mis compañeros y colegas, Berenice Balderrama y Misael Ríos, el trabajo dentro del bioterio.

A mis maestros, por todos sus conocimientos y habilidades que con pasión y vocación fueron transmitieron poco a poco durante estos años permitiéndome cristalizar mis sueños.

A Gerardo, Gabriel, Valeria, Joaquín, Javier, Juan, Salomón, Jorge, Diego, Paco, Neri, Edson, Fernanda, Ivonne, entre otros no menos importantes que no alcanzo a mencionar. Me llevo todas y cada una de las aventuras, pláticas, risas y trabajo que vivimos. Las cosas no serían igual sin ustedes.

A Daniella, mi primera amiga de la universidad, por estar ahí cuando lo necesitaba, por permitirme compartir contigo una amistad única y ser un ejemplo de bondad.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
INDICE DE CUADROS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Cáncer	3
1.2 Cáncer colorrectal	5
1.2.1 Epidemiología del cáncer de colon	5
1.2.2 Terapias convencionales contra el cáncer de colon	6
1.3 Lectinas	7
1.3.1 Lectinas como agentes anticancerígenos	10
1.4 Frijol Tépari (<i>Phaseolus acutifolius</i>)	13
1.4.1 Limitaciones de utilizar la TBLF	14
1.4.2 Lectina recombinante	15
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 General	19
3.2 Específicos	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1 Diseño experimental	20
3.2 Animales de experimentación	20
3.2 Análisis de marcadores bioquímicos y hematológicos	22
3.3 Análisis macroscópico de órganos	23
3.4 Análisis histopatológico de órganos	23
3.5 Análisis estadístico	24
3.6 Disposición de residuos	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25

5.1	Estudio de toxicidad subcrónica de rTBL-1 por vía intragástrica	25
5.2	Efecto sobre parámetros metabólicos e inflamatorios	29
5.3	Análisis macroscópico de órganos	34
5.4	Análisis histopatológico	42
6.	CONCLUSIONES	56
7.	BIBLIOGRAFÍA	57
8.	ANEXOS	72

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Tratamientos comunes para el cáncer de colon	7
2	Clasificación de lectinas con base en su secuencia y estructura tridimensional	9
3	Lectinas reportadas con actividad apoptótica o autofagia	11
4	Bioquímica sanguínea de los ratones en el estudio de toxicidad subcrónica	30
5	Biometría hemática de los ratones en el estudio de toxicidad subcrónica	33
6	Peso de órganos y su relación con respecto al peso corporal de las ratas en el estudio de toxicidad aguda	35
7	Evaluación histopatológica de órganos de ratones tratados con rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	55

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática de los N-glicanos	4
2	Estructura tridimensional de rTBL-1	16
3	Diagrama de flujo diseño experimental	22
4	Peso corporal de los ratones en el estudio de toxicidad subcrónica	27
5	Ingesta de alimento por los ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	27
6	Consumo de agua de los ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	28
7	Porcentaje de células blancas en la sangre de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	34
8	Peso relativo del intestino delgado, intestino grueso e hígado de los ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	36
9	Índice de longitud de intestino delgado e intestino grueso de los ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	38
10	Peso relativo del corazón, pulmones y riñones de los ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	40
11	Peso relativo del estómago, páncreas y cerebro de los ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	43
12	Peso relativo de bazo, timo y ovarios de los ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	45

13	Micrografías representativas de cortes histológicos de hígado, bazo y páncreas de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	46
14	Micrografías representativas de cortes histológicos de intestino delgado de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	48
15	Micrografías representativas de cortes histológicos de intestino grueso de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	49
16	Micrografías representativas de cortes histológicos del íleon de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	50
17	Micrografías representativas de cortes histológicos del colon ascendente de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	52
18	Micrografías representativas de cortes histológicos del colon transversal de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	53
19	Micrografías representativas de cortes histológicos del colon descendente de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica	54

RESUMEN

Se realizó un estudio de toxicidad subcrónica en ratones CD-1 al administrarles diariamente durante un periodo de 28 días la rTBL-1 en dosis NOAEL (30 mg/kg)- Durante el tratamiento se monitoreó diariamente su peso corporal y consumo de agua y alimento. Al término del experimento se realizó la matanza de los animales y se recolectó el tejido sanguíneo para pruebas bioquímicas y biometría hemática, así como los órganos del animal para histopatología. No se observaron cambios en la conducta de los animales, ni diferencias estadísticas en el consumo de agua y alimento al comparar el grupo tratamiento contra el control. Los estudios en sangre no muestran cambios en la biometría hemática, sin embargo, en el conteo manual de leucocitos se aprecia un aumento (6.2%) en la cantidad de granulocitos circulantes, atribuido a la activación del sistema inmune por parte de la lectina. En las bioquímicas se aprecia un aumento para las hembras de la enzima ALT, adjudicado al ciclo hormonal del roedor, y para los machos la amilasa pancreática, conferida como un mecanismo compensatorio de atrofia intestinal. Los estudios histopatológicos no exponen alteraciones en los órganos a excepción del hígado (anisocariosis, cromatina reactiva, esteatosis grasa y células de Kupffer prominentes) e intestinos (atrofia de vellosidades e hiperplasia de tejido linfoide). Se consideran a las perturbaciones en intestino como signos de actividad de la rTBL-1, ya que estos han persistido desde los estudios anteriores realizados en la TBLF. En general, los resultados toxicológicos convergen en la seguridad clínica de la lectina y se demuestra que permanece la actividad biológica.

Palabras Clave: Efectos adversos lectinas, rTBL-1, toxicología.

INTRODUCCIÓN

La investigación biomédica en productos naturales ha permitido identificar estructuras químicas con la posibilidad de generar moléculas con potencial terapéutico para una amplia variedad de enfermedades humanas (Newman y Cragg, 2020). Estos esqueletos o cadenas molde con potencial, se conocen como “lead compounds” los cuales sufren un largo proceso de desarrollo y refinado para finalmente ser identificados formalmente como un candidato a fármaco (Bleicher y col., 2003). El desarrollo de fármacos es un proceso exhaustivo que consta de distintas etapas: investigación básica, identificación de diana biológica y validación, generación del lead (drug discovery), toxicología *in vitro* e *in vivo*, parámetros ADMET (por sus siglas, Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad del fármaco), propiedades fisicoquímicas (etapa preclínica), estudios de fase I, II y III (etapa clínica) y trámites regulatorios por los organismos gubernamentales correspondientes tanto en Estados Unidos (FDA; Food and Drug Administration) (Matthews y col., 2016) y en este caso México (COFEPRIS; Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios).

Durante la etapa preclínica, la investigación se lleva a cabo tanto en líneas celulares (*in vitro*) como en modelos animales (*in vivo*) que sean compatibles con las características fisiológicas de la enfermedad a estudiar. Para este proceso del desarrollo de fármacos se realizan estudios de seguridad con respecto a las dosis administradas, se analiza la farmacodinamia y la farmacocinética (parámetros ADMET; absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad del fármaco). Posterior a esta fase preclínica llega el periodo clínico, la cual se enfoca en los estudios toxicológicos, comportamiento del fármaco, farmacovigilancia y sus respectivos análisis de seguridad en seres humanos (Umscheid y col., 2011)

Una constante durante todas estas etapas del desarrollo es que se deben realizar análisis de toxicidad ya que no se puede extrapolar de forma directa un resultado de un estudio en modelo de línea celular a un modelo animal y, paralelamente a los

seres humanos. En general, es necesario conocer todas las propiedades farmacocinéticas de los nuevos medicamentos y evaluar su potencial como un tóxico mediante un panel completo de estudios divididos. Este panel se subclasifica en tres niveles: estudios de dosis única, toxicidad aguda; de dosis repetida, toxicidad subaguda, subcrónica, crónica y toxicología especial; citotoxicidad en líneas celulares, análisis genotoxicológicos, toxicología de la fertilidad y la reproducción y carcinogénesis (Gámez y Más, 2007).

El estudio de toxicidad aguda aporta información sobre la toxicidad intrínseca del producto y los posibles riesgos que conlleven a una exposición continua, puede ser por administración de dosis única y tiene una duración menor a 20 días naturales. Los estudios de toxicidad subaguda se realizan por la repetida administración del fármaco o tóxico en un corto periodo de tiempo (de 14 a 30 días); los resultados de este estudio, junto con los de toxicidad aguda, permiten identificar el nivel de dosis sin efectos adversos observables (*no observed adverse effect level*, NOAEL por sus siglas en inglés) a emplear de un fármaco para los estudios posteriores. Los ensayos de toxicidad subcrónica, al ser de administración prolongada con la dosis NOAEL, permite que se manifiesten efectos adversos del fármaco por toxicidad acumulativa que no se observan durante los estudios agudo y subagudo; brinda información sobre órganos o tejidos dianas y su periodo de duración, según la OCDE es de 28 días (OCDE, 2008; Gámez y Más, 2007). Los ensayos crónicos de toxicidad se realizan por un periodo de 6 a 12 meses, deben de conducirse en, al menos, dos especies animales distintas. Está encaminada a detectar daños patológicos, neurológicos, bioquímicos y conductuales causados por la exposición prolongada del tóxico (Gámez y Más, 2007).

Estudios previos han mostrado el efecto anticancerígeno de lectinas de frijol Tépari, que presentan baja toxicidad en ratas, por lo que actualmente se produce una lectina recombinante bioactiva. El presente trabajo muestra los resultados de la evaluación toxicológica subcrónica en ratones CD-1 para la lectina recombinante.

1. ANTECEDENTES

1.1 Cáncer

No se puede considerar al cáncer como una masa única de células anormales, se tiene que considerar como un sistema interactivo y dinámico. Las células cancerígenas mantienen relaciones muy complejas con su microambiente, que está compuesto por componentes celulares y la matriz extracelular (MEC). Estas interacciones, mediadas por citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores de inflamación o enzimas que remodelen la matriz, afectan directamente el desarrollo del tumor (Shlyakhtina y col., 2021).

El término “cáncer” se relaciona con tumores malignos. Estos pueden surgir en cualquier órgano, con distinta sintomatología clínica (Murray y col., 2012). El cáncer tiene procesos complejos en su biología; las células sufren cambios en su tasa de proliferación, patrones de adhesión y migración a tejidos, siendo estos factores clave en la metástasis (García-Gasca y col., 2012). Para que el cáncer se pueda diseminar hacia otros tejidos e invadir el órgano se tiene que pasar por un proceso de transición epitelial a mesenquimal (TEM); esto incluye muchos cambios en la célula incluyendo las interacciones entre células y la MEC (Shlyakhtina y col., 2021). La comunicación entre las células y la MEC se ve mediada en su mayoría por oligosacáridos, estos se pueden conjugar con proteínas o lípidos en la membrana formando glicosilaciones (Varki, 1993). Estos glicoconjugados funcionan como mediadores de las interacciones celulares, por lo que es de esperar modificaciones en las glicosilaciones durante las neoplasias (Balog y col., 2012).

Todas las células eucariotas tienen el mismo proceso de síntesis de glicoproteínas, sin embargo, existen diferencias en este proceso que van a diferenciar a una célula maligna de una normal (Mazalovska y Kouokam, 2020). Las alteraciones en los glicanos en la superficie celular están ligadas con el potencial maligno de una célula para convertirse en un tumor (Pinho y Reis, 2015). Por lo tanto, estos glicanos en la

superficie celular son una diana biológica para considerar en el combate de las neoplasias.

Se ha demostrado que las neoplasias están asociadas a múltiples y complejas alteraciones en las glicosilaciones (Gorelik y col., 2001). Algunos de los cambios en glicanos más comunes son el incremento de cadenas cuaternarias β 1-4, sialización externa de α 2-6 en poli-*N*-acetilactosaminas (LacNAc) de *N*-glicanos, incremento de fucosilación α 1-6, sobreexpresión de mucinas y *O*-glicanos incompletos, alteración en la expresión de grupos sanguíneos y antígenos sialil-Lewis, incremento en la segmentación de *N*-Acetilglucosamina (GlcNAc), sobreexpresión de hialuronato y también por el incremento en la ramificación β 1-6 de *N*-glicanos (**Figura 1**) (Hakamori, 1996; Gorelik y col., 2001; Pinho & Reis, 2015).

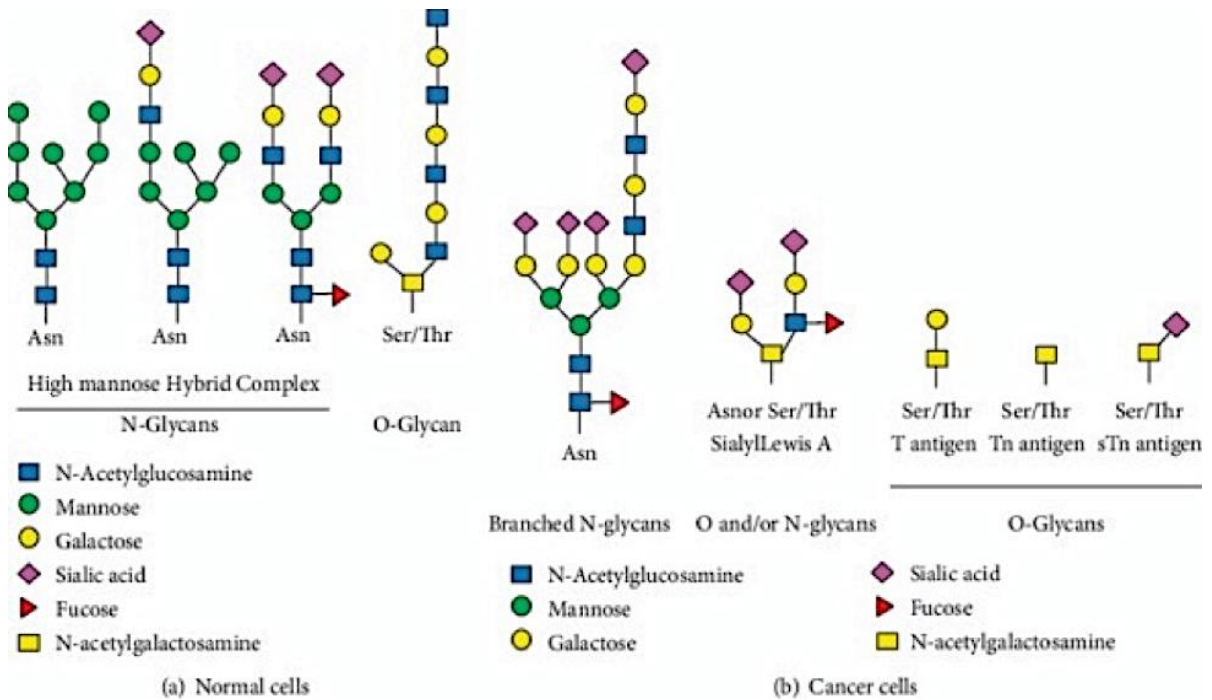


Figura 1. Representación esquemática de algunos *N*-glicanos. a) células normales y b) células con cáncer (Mazalovska y Kouokam, 2020).

1.2 Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) se origina en el colon o el recto, principalmente en el revestimiento interno (pólipos) (American Cancer Society, 2020). Se asume que la célula originaria de estos pólipos es una célula madre que acumuló múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas inactivando así los genes supresores de tumores y activando los oncogenes (Dekker y col., 2019). Se pueden encontrar distintos tipos de CCR. En primer lugar, están los adenocarcinomas que se caracterizan por ser el tipo de cáncer más común y originarse en las células que producen moco para lubricar el interior del colon y del recto. Los tumores carcinoides se generan a partir de células productoras de hormonas en el intestino mientras que los tumores estromales gastrointestinales se forman en las células especializadas de la pared del colon y estos pueden ser encontradas en gran parte del tracto digestivo, los linfomas se crean a partir de células del sistema inmune y, por último, los sarcomas se originan en los vasos sanguíneos, capas musculares y otros tejidos conectivos de la pared del colon y del recto (American Cancer Society, 2020). En el **Anexo 1** se explican las distintas etapas del cáncer de colon.

1.2.1 Epidemiología del cáncer de colon

De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer, dentro de las principales causas de muerte en todo el mundo, el cáncer ocasionó en 2020 un aproximado de 10 millones de fallecimientos (WHO, 2022). Las neoplasias más comunes encuentran al cáncer de mama, representando un 11.7 % del total, cáncer de pulmones (11.4 %), cáncer colorrectal (10 %), cáncer de próstata (7.3 %), cáncer de estómago (5.6 %), cáncer de hígado (4.7 %), cáncer cérvico uterino (3.1 %) y con el 46 % otro tipo de cánceres (International Agency for Research on Cancer, 2020).

En el 2018 en México se registraron un total de 190,667 casos de cáncer y, dentro de las neoplasias más comunes, el cáncer colorrectal representó el 7.8% de los casos totales; siendo este el tercer tipo más común encontrando en la población mexicana (PAHO, 2020). A mediados del año 2020, INEGI reportó 683,823

defunciones, de las cuales, el 9 % fueron causadas por tumores malignos (60,421). Durante el 2017, se registró a los tumores malignos de órganos digestivos como una de las principales causas de morbilidad hospitalaria (INEGI, 2021).

Se sabe que factores como la edad, la genética y factores ambientales influyen en el desarrollo de esta neoplasia. La presencia de familiares que hayan desarrollado esta condición aumenta el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal en un 20 %. A su vez, se ha visto que la descendencia étnica Afroamericana, el sexo masculino, la enfermedad inflamatoria intestinal, la colitis ulcerosa, la obesidad, el estilo de vida sedentario, el consumo de carne roja y alimentos procesados, consumo de tabaco y alcohol, entre otros, son parte de los factores de riesgo más comunes (Thanikachalam y Khan, 2019).

1.2.2 Terapias convencionales contra el cáncer de colon

Actualmente existen varios tipos de tratamientos para el CCR, dependiendo de la etapa en la que se encuentre el paciente como la cirugía, terapias adyuvantes como la quimioterapia y radioterapia, terapias inmunológicas y terapia con moléculas pequeñas, con proteínas o con productos naturales (Mármol, y col., 2017; ASCO, 2021a). En etapa 0 (cero) se utiliza comúnmente la cirugía (colonoscopia) para la extirpación del pólipo o un área con el tumor canceroso, en caso de que el tumor sea de un gran tamaño, puede llegar a realizarse una extirpación parcial del colon (American Cancer Society, 2018). En el **Cuadro 1** se presentan las terapias o tratamientos más comunes para combatir el CCR.

Los distintos tratamientos provocan efectos secundarios o llegan a generar complicaciones en el estado de salud del paciente como son la fatiga, dolores musculares, alergias, vómito, pérdida de apetito (ASCO, 2021b). Por lo anterior, es necesario desarrollar tratamientos alternativos que disminuyan estos efectos y abaraten los costos.

Cuadro 1. Tratamientos comunes para el cáncer de colon

Etapa	Tipo de terapia	Fármaco o técnica empleada
Etapa 0	Cirugía.	Colonoscopia o colectomía parcial.
Etapa 1	Cirugía.	Colonoscopia o colectomía parcial.
Etapa 2	Cirugía.	Colectomía parcial.
	Quimioterapia y/o radioterapia.	5-Fluorouracilo, leucovorina, oxaliplatino, capecitabina.
Etapa 3	Cirugía.	Colectomía parcial junto con los ganglios linfáticos cercanos.
	Quimioterapia y radioterapia.	FOLFOX, CAPEOX, 5-FU con leucovorina o capecitabina.
Etapa 4	Cirugía.	Colectomía en caso de pocas y pequeñas áreas de metástasis.
	Quimioterapia y radioterapia.	FOLFOX, FOLFIRI, CAPEOX, FOLFOXIRI, bevacizumab, ziv-aflibercept, cetuximab, panitumumab, regorafenib, trifluridina y tipiracil.
	Inmunoterapia.	Pembrolizumab

American Cancer Society, 2018; Argiles, y col., 2020 Buccafusca, y col., 2019.

Abreviaturas: 5-FU (5-Fluorouracilo), FOLFOX (5-FU, leucovorina y oxaliplatino), FOLFIRI (leucovorina, 5-fu, e irinotecán), FOLFOXIRI (leucovorina, 5-FU, oxaliplatino e irinotecán), CAPEOX (capecitabina y oxaliplatino).

1.3 Lectinas

El desarrollo de nuevos agentes terapéuticos contra el CCR ha ganado importancia gracias a la innovación de nuevas moléculas procedentes de productos naturales (Moreno-Celis y col., 2020). Las lectinas han llamado mucho la atención por su potencial aplicación como herramientas en la glicobiología, desde el descubrimiento de la primer lectina, “ricina”, con su función de hemoaglutinación (Tsaneva & Van Damme, 2020), por ser glicoproteínas abundantes en plantas, leguminosas, animales, bacterias, hongos y virus (Lagarda-Dias y col., 2017; Ferriz-Martínez y col., 2010), por tener la habilidad de unirse específica y reversiblemente con carbohidratos o conjugados glicosilados, como glicoproteínas, glicolípidos o polisacáridos (Ferriz-Martínez y col., 2010), hasta presentar un amplio rango de interacciones moleculares, desde puentes de hidrógeno y enlaces tipo Van der Waals (Mazalovska y Kouokam, 2020).

Las lectinas se encuentran en todos los reinos y, a pesar de ser distintas estructuralmente, tienen la capacidad de reconocer estructuras complejas de carbohidratos (Tsaneva y Van Damme, 2020). Se clasifican de varias maneras, con base en su localización subcelular, por su estructura molecular, por su secuencia de aminoácidos o por su abundancia (Ferriz-Martínez y col., 2010; Tsaneva y Van-Damme, 2020). La clasificación por su estructura define tres grupos: merolectinas, hololectinas y quimerolectinas. Las merolectinas poseen un único sitio de unión a carbohidratos, son pequeñas, monovalentes y por consiguiente incapaces de precipitar en glicoconjugados o aglutinar células. Por otro lado, las hololectinas contienen al menos dos sitios de unión idénticos o muy homólogos, son di- o multivalentes y capaces de aglutinar células o precipitar glicoconjugados. Por último, las quimerolectinas, consisten en una fusión de proteínas en la cual, hay un sitio de unión a carbohidratos y un dominio que puede ser catalítico enzimático definido u otra actividad biológica que actúa independientemente del dominio a carbohidrato, dependiendo del número de dominios a carbohidratos se podrán comportar como merolectinas u hololectinas. Además, se considera que las quimerolectinas tienen una subclasificación más, las superlectinas, diferenciadas de las anteriores por que incluye múltiples dominios a carbohidrato distintos dentro de la lectina (Peumans y Van-Damme, 1995; Ferriz-Martínez y col., 2010; Tsaneva y Van-Damme, 2020). En el **Cuadro 2** se muestra la clasificación de las lectinas con base en su secuencia y estructura tridimensional.

La primera lectina descubierta mostraba altos efectos tóxicos, pero posteriormente se encontró que no todas son tóxicas, en su mayoría no muestran actividad hemoaglutinante y las lectinas más abundantes son las quimerolectinas. Las lectinas ofrecen distintas aplicaciones, desde la agricultura, hasta la medicina (Tsaneva y Van-Damme, 2020) como su capacidad de distinguir grupos sanguíneos (Goldstein y Hayes, 1978), diagnóstico y terapia de tumores malignos, así como ser un pilar importante en el desarrollo de la inmunología (Tsaneva y Van-Damme, 2020).

Cuadro 2. Clasificación de lectinas con base en su secuencia y estructura tridimensional

Dominio de lectinas en plantas	Ligando típico	Localización en la célula	Estructura tridimensional del dominio de la lectina
<i>Agaricus bisporus</i> lectin (ABA)	GlcNAc/GalNAc, galactosa, antígeno-T	Núcleo, citoplasma	β -sandwich
Amarantina	GalNAc, antígeno-T	Núcleo, citoplasma	Trébol β
Aglutinina relacionada a quiquitina (CRA)	N-glicanos altos en manosa	Vacuola, membrana	Barril TIM
Cyanovirin	Manosa, N-glicanos altos en manosa	Núcleo	Tripe lámina β y horquilla β
<i>Euonymus europaeus</i> L. lectin (EUL)	Galactósidos, N-glicanos altos en manosa	Núcleo, citoplasma	ND
<i>Galanthus nivalis</i> L. lectin (GNA)	Manosa, oligosacáridos de manosa, N-glicanos altos en manosa	Vacuola, núcleo, citoplasma o membrana	Prisma β
Heveina	Quitina, (GlcNAc) _n , ácido siálico.	Vacuola	Motivo común estructural de 30-43 residuos, ricos en glicina y cisteína en posiciones conservadas, organizado alrededor de un núcleo de cuatro disulfuros
Jacalina	Manosa/, N-glicanos altos en manosa o galactosa/ N-glicanos complejos	Núcleo, citoplasma	Prisma β
Lectina de leguminosas	Manosa/Glucosa, Galactosa/GalNAc, (GlcNAc) n, fucosa, ácido siálico, N-glicanos altos en manosa y N-glicanos complejos	Vacuola, núcleo, citoplasma o membrana	β -sandwich
LysM	Quitina, (GlcNAc) _n , peptidoglicanos	Vacuola, núcleo, citoplasma o membrana	Estructura β - α - α - β
<i>Nicotiana tabacum</i> L. lectin (Nictaba)	(GlcNAc) _n , N-glicanos altos en manosa y N-glicanos complejos	Núcleo, citoplasma	ND

B-Ricina	Galactosa/GalNAc, Galactosa sialitada /GalNAc	Vacuola, núcleo, citoplasma	Trébol β
Calexina y calreticulina	Glc ₁ Man ₉	ER	β -sandwich
Lectinas tipo M	Man ₈	ER	Barril β
Lectinas tipo L	Varios	ER, Golgi	β -sandwich
Lectinas tipo P	Man6-phosphate	Vía secretoria	Barril β
Lectinas tipo C	Manósidos, galactósidos, ácidos siálicos y otros	Membrana y espacio extracelular	Combinación α/β / parecido a lectina tipo C
Lectinas tipo S (galectinas)	β -galactósidos	Citoplasma y espacio extracelular	β -sandwich
Lectinas tipo I (siglecs)	Ácido siálico	Membrana	β -sandwich
Lectinas tipo R	Varios	Golgi, membrana	Trébol β
Lectinas de caja F	(GlcNAc) ₂	Citoplasma	β -sandwich
Lectinas tipo fibrinógeno	GlcNAc, GalNAc	Membrana espacio extracelular	ND
Lectinas Chi	Chito-oligosacáridos	Espacio extracelular	Barril α/β / TIM
Lectinas tipo F	Oligosacáridos con terminaciones en fucosa	Espacio extracelular	β -sandwich
Intelectinas	Galactosa, galactofuranosa y pentosas	Membrana y espacio extracelular	Varias estructuras
Annexinas	Glucosaminoglicanos, heparina y sulfato de heparina	Membrana	ND

Tsaneva y Van-Damme, 2020.

1.3.1 Lectinas como agentes anticancerígenos

El efecto terapéutico de las lectinas se atribuye a su actividad antitumoral y efectos citotóxicos por apoptosis y autofagia (Estrada-Martínez y col., 2017; Bhutia y col., 2019) (**Cuadro 3**). Se han estudiado algunas de estas lectinas con el fin de servir como terapias contra el CCR. La lectina de muérdago coreana ha mostrado efectos contra la línea celular de cáncer de colon (COLO) por la activación de caspasas-2, 3, 8 y 9. También, la lectina procedente de las hojas de *Morus alba* L. mostró efectos citotóxicos, en este caso, contra la línea celular HCT-15 (adenocarcinoma colorrectal humano) por efectos antiproliferativos e inducción de apoptosis. A su vez, la lectina obtenida de *Lotus corniculatus* L. presentó efectos antiproliferativos en la línea celular

HCT116 (carcinoma colónico humano) por inducción de apoptosis (Estrada-Martínez y col., 2017).

Cuadro 3. Lectinas reportadas con actividad apoptótica o autofagia

Lectina	Azúcares de unión	Tipo de cáncer o línea celular	Mecanismo de inhibición	Referencia
<i>Viscum álbum</i> L. (ML-I)	Galactosa	Células T y M de leucemia.	Apoptosis por activación de caspasa 8, caspasa 9 y caspasa 3.	Bantel y col., 1999.
		Células CT26.	Apoptosis por generación de ROS y activación de vía SEK/JNK.	Beztsinna y col., 2018.
		Glioma (en ratón).	Apoptosis por vía dependiente de caspasas y activación de células NK.	Schötterl y col., 2018.
<i>Viscum álbum</i> var. <i>coloratum</i> Ohwi (KMLC)	Galactosa / N-acetilgalactosamina	Células SK-Hep-1.	Apoptosis vía p21 y p53 independiente de activación de Bax y caspasa 3; inhibición de Bcl-2.	Lyu y col., 2002.
		Células Hep3B.	Apoptosis por generación de ROS y activación de ruta SEK/JNK.	Kim y col., 2004.
		Células A253.	Apoptosis por inhibición de telomerasa, disminución de fosforilación de Akt y activación de caspasa 3.	Choi y col., 2004.
Concanavalin A (Con A)	Manosa /glucosa	Células A375.	Apoptosis dependiente de caspasas.	Liu y col., 2009a.
		Células HeLa.	Autofagia por supresión de PI3K/Akt/mTOR y regulación de MEK/ERK.	Roy y col., 2014.
		Hepatoma (en ratones SCID).	Autofagia por regulación de BNIP3.	Pratt y col., 2012.

<i>Dioclea violacea</i> Mart. ex Benth. (DVL)	Manosa /glucosa	Células de glioma en ratones C6.	Apoptosis por activación de caspasa 3.	Chang y col., 2007.
		Células U78.	Autofagia por inhibición de Akt, ERK1/2 y TORC1.	Nascimento y col., 2018.
<i>Dioclea lasiocarpa</i> Mart. ex Benth. (DLL)	Manosa /glucosa	Células celulares de glioma, A549, MCF-7, PC3, A2780.	Inducción de autofagia por activación de caspasa 3.	Nascimento y col., 2019.
<i>Dioclea lasiophylla</i> Mart. ex Benth. (DlyL)	Manosa	Células de glioma en rata C6.	Inducción de autofagia por activación de caspasa 3.	Nascimento y col., 2017.
<i>Bauhinia forficata</i> Link. (BFL)	N-Acetilgalactosamina	Células MVF7.	Apoptosis por caspasa 9.	Leal y col., 2018.
<i>Polygonatum cyrtoneuma</i> Hua. (PCL)	Manosa /ácido siálico	Células A375.	Apoptosis por activación de caspasa, acumulación de ROS y activación de p53 y p38.	Cagliari y col., 2018.
		Células L929.	Apoptosis y autofagia a través de las vías Ras-Raf y PI3K/Akt.	Liu y col., 2009c.
		Células A549.	Apoptosis y autofagia mediada por ROS y vías MAPK y NF-κB.	Liu y col., 2010.
		Células MCF-7.	Apoptosis vía caspasa dependiente.	Liu y col., 2016.
<i>Polygonatum odoratum</i> (Mill). Druce (POL)	Manosa	Células A375.	Apoptosis vía caspasa dependiente.	Liu y col., 2009b.
		Células L929.	Apoptosis vía caspasa dependiente.	Yang y col., 2011.
		Células A549.	Apoptosis y autofagia por inhibición de la vía Akt- NF-κB o Akt-mTOR.	Li y col., 2014.
<i>Remusatia vivipara</i> (Roxb.) Schott. (RVL)	Manosa	MDA-MB-231, MCF-7.	Inducción de apoptosis.	Sindhura y col., 2017.

Lectinas provenientes del frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius* A. Grey) han mostrado efectos sobre distintas líneas celulares de cáncer de colon (CaCo-2, HT-29 y

SW480). El mecanismo de acción involucra la inducción de apoptosis (Moreno-Celis y col., 2020).

1.4 Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*)

Phaseolus acutifolius, conocido como frijol Tépari es una leguminosa que se cultiva en México desde hace 5,000 años aproximadamente. Pertenece al género *Phaseolus* y es una de las cinco especies domesticadas por el hombre junto con *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus coccineus* L., *Phaseolus linatus* L., y *Phaseolus domosus* Macfady. Es una especie de ciclo corto, tolerante a altas temperaturas y sequías. Crece principalmente en las regiones áridas de México (Sierra Madre Occidental), en el sureste de Estados Unidos (Arizona, Nuevo México) y Costa Rica (Acosta-Gallegos, 2021).

En general, los frijoles son excelentes fuentes de proteínas, carbohidratos complejos, fibra dietética, vitaminas y minerales, pero también contienen fitoquímicos como polifenoles, inhibidores de proteasas, lectinas y ácido fítico (González de Mejía y col., 2005). En 2012, García-Gasca y colaboradores, caracterizaron un inhibidor de proteasas natural procedente de *P. acutifolius*, reportando a las lectinas como moléculas bioactivas, ya que mostraron efectos negativos sobre distintas líneas celulares de cáncer, particularmente sobre células CaCo2 de cáncer de colon.

Se ha encontrado que la fracción de lectinas del frijol Tépari (TBLF, por sus siglas en inglés) inducen la muerte celular en líneas celulares de cáncer de colon, HT-29 y arresta el ciclo celular en la fase G0/G1. El efecto apoptótico está relacionado con un aumento en la fosforilación de Ser46 de p53 y la activación de la caspasa 3 (Moreno-Celis y col., 2020).

Se ha encontrado que la TBLF presenta baja toxicidad en ratas Spargue Dawley, además de su efecto citotóxico para inhibir la tumorigénesis en el colon. Estudios realizados por López-Sánchez y colaboradores en 2010, mostraron la baja toxicidad por administración oral tanto a nivel agudo como subcrónico y se sugirió la dosis

máxima sin efectos adversos para iniciar los estudios contra el cáncer (50 mg/kg de peso). Asimismo, estudios realizados por Ferriz-Martínez y colaboradores (2015), mostraron efectos antinutricionales en la reducción del peso corporal sin alteraciones en marcadores sanguíneos en ratas Sprague Dawley al administrar la TBLF en dosis de 50 mg/kg. Los estudios de Alatorre-Cruz y colaboradores (2018), mostraron tras seis semanas de administración intragástrica con dosis de 50 mg/kg cada tercer día, efectos adversos como atrofia intestinal e hiperplasia pancreática siendo esta última reversible tras un periodo de recuperación de dos semanas, mientras que la atrofia intestinal no fue reversible en este periodo de tiempo. Pita-López y colaboradores (2020) mostraron que un periodo de recuperación de 6 semanas permitía que los efectos adversos fueran parcialmente reversibles, por lo que siguieron ampliar el periodo de recuperación para revertir todos los efectos adversos observados. La TBLF mostró capacidad inhibitoria de la tumorigénesis temprana de cáncer de colon químicamente inducido en ratas (Moreno-Celis y col., 2017).

1.4.1 Limitaciones de utilizar la TBLF

La TBLF está compuesta principalmente por dos lectinas mayoritarias (TBL-1 y TBL-2) (Torres-Arteaga y col., 2016). Para purificar una sola de las lectinas es necesario incrementar las operaciones unitarias y, con ello, incrementar el costo y el tiempo de producción, y disminuir el rendimiento. Por lo anterior, en 2019 Martínez-Alarcón y colaboradores (2019) implementaron un sistema de producción a través de la secreción de la proteína en la raíz de la planta *P. acutifolius* utilizando *Agrobacterium tumefaciens* como vector. Éste, poseía la secuencia clonada del gen encargado de producir una lectina glicosilada con actividad biológica. La desventaja principal de este proceso fue la baja viabilidad de las plántulas de frijol y la escasa cantidad de proteína recuperada.

Existen modelos reportados para expresión y producción de proteínas recombinantes, como son las bacterias y levaduras. *E. coli* es el organismo más utilizado para la expresión de proteínas recombinantes por su simplicidad y conocimiento del genoma. Sin embargo, no es el mejor modelo de expresión para

ciertas lectinas por múltiples motivos: falta de organelos intracelulares y de maquinaria glicosilante, la producción de proteínas de gran tamaño o, proteínas expresadas en altas concentraciones que tienden a formar agregados insolubles en el citoplasma. Por otro lado, las levaduras tienen las ventajas de un rápido crecimiento, fácil manipulación genética y cuentan con la maquinaria celular necesaria para modificaciones postraduccionales (glicosilaciones, formación de puentes disulfuro y actividad proteolítica). *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los organismos más utilizados para la expresión proteica, sin embargo, tiende a acumular el producto en vacuolas y citoplasma, presenta bajo rendimiento, su procesamiento de péptido señal es incompleto y sus glicosilaciones son muy antigénicas. En su lugar, *Pichia pastoris* es capaz de producir glicoproteínas en gran concentración sin ser antigénicas ya que no agrega residuos de manosa α -1-3 (Martínez-Alarcón y col., 2018).

1.4.2 Lectina recombinante

Martínez-Alarcón y colaboradores (2020), presentaron un nuevo proceso de producción para la lectina recombinante proveniente del frijol Tépari (rTBL-1) utilizando a *P. pastoris* y el plásmido pGAPZ α B que contiene sitios de replicación para la misma *P. pastoris*, un gen de resistencia a antibiótico y un péptido señal de *S. cerevisiae* para la expresión del factor α unido al *N*-terminal de la proteína, el cual es cortado por endopeptidasas (Kex2 y Ste13) del aparato de Golgi. Se reportaron rendimientos de 316 mg/L de cultivo. La lectina recombinante (rTBL-1) está conformada por un homo tetrámero compuesto por dos dímeros antiparalelos. Cada monómero lo constituyen 15 láminas β antiparalelas distribuidas en rollo y cada rollo está formado por seis hojas posteriores de láminas β , siete hebras cóncavas como hojas frontales, dos láminas conectoras trenzadas y dos cationes divalentes Ca^{+2} y Mg^{+2} unidos cada uno por coordinación con Asp131, Glu129, Asp139, His144, Leu133, y Asn135, así como dos moléculas de agua estructurales por ion (**Figura 2**).

La rTBL-1 se une a cadenas ramificadas β 1-6 de *N*-glicanos sin importar que en la ramificación existan unidades extra de lactosamina o ácidos siálicos α 2-3 (Martínez-

Alarcón, 2020). Uno de los cambios más importantes que se sufre en las neoplasias son las glicosilaciones, sobre todo la ramificación de cadenas β 1-6 de *N*-glicanos (Pinho y Reis, 2015) por lo que la rTBL-1 presenta potencial como agente terapéutico.

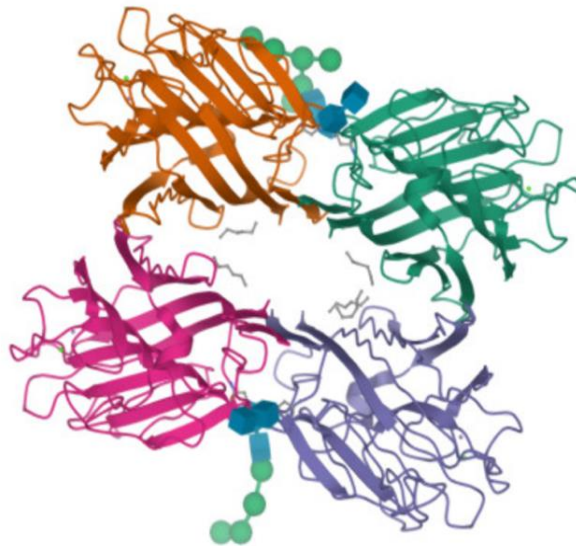


Figura 2. Estructura tridimensional de rTBL-1. Tetrámero con sus cuatro subunidades A, B, C y D junto con sus cationes Ca^{+2} (esferas grises) y Mg^{+2} (esferas negras) (Martínez-Alarcón y col., 2020; Protein Data Bank).

Vega-Rojas y colaboradores (2021), realizaron estudios con la rTBL-1 *in vitro* y *ex vivo* para evaluar los cambios que sufre la rTBL-1 en un proceso gastrointestinal. Encontraron que la bioaccesibilidad de la rTBL-1 disminuye en el lumen intestinal e incrementa en el lado basolateral. Sugieren que la proteína ingresa mediante la internalización de la membrana intestinal hacia el enterocito por la interacción con receptores intestinales como *N*-acetil glucosamina y ácido siálico. La rTBL-1 presenta efecto citotóxico similar a la TBLF (Palmerín-Carreño y col., 2021). Se sabe que es por inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular en fase G0/G1 (Dena-Beltrán y col., 2023), sin embargo, se desconocían los efectos adversos provocados por la

lectina, por lo que es necesario realizar estos estudios toxicológicos para conocer su comportamiento toxicológico.

Los estudios de toxicidad oral aguda en ratas y ratones en un rango de dosis de 5-300 mg/kg mostraron que la rTBL-1 no causó la muerte de animales ni la presencia de eventos adversos, con lo que se pudo clasificar a la rTBL-1 como una sustancia de categoría 3 con baja toxicidad y segura para continuar con ensayos de dosis repetidas (Ríos Ortiz, 2022; Balderrama-Ocádiz, 2023). En el estudio de toxicidad subcrónica en ratas se reportó que la dosis de 30 mg/kg de rTBL-1, que fue administrada diariamente durante 28 días, no causó la muerte de ningún animal y desarrolló menores efectos que la TBLF; no se reportaron afectaciones en la conducta de los animales, consumo de agua y alimento o en su peso corporal, tampoco en el perfil hematológico y bioquímico que fue determinado en los animales experimentales. Los análisis macroscópicos de órganos no indicaron cambios en el tamaño y peso de los órganos, mientras que se reportaron como preliminares algunos cambios observados mediante el análisis histopatológico como esplenomegalia o incremento de la pulpa blanca en el bazo (Ríos Ortiz, 2022).

El presente proyecto se desarrolló para complementar el perfil toxicológico de la rTBL-1 y demostrar la seguridad clínica para así continuar con el estudio de esta lectina como candidato terapéutico contra el cáncer de colon.

2. HIPÓTESIS

La rTBL-1 administrada a ratones CD-1 diariamente durante 28 días, de forma intragástrica en dosis NOAEL (30 mg/kg), presenta baja toxicidad en los animales en comparación con la TBLF.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar la toxicidad subcrónica de la rTBL-1 en ratones CD-1 con un esquema de administración intragástrica diaria con dosis NOAEL (30 mg/kg) por 28 días.

3.2 Específicos

- Realizar el estudio subcrónico por 28 días y determinar alteraciones fisiológicas en los animales de experimentación.
- Evaluar las alteraciones en marcadores metabólicos e inflamatorios en los grupos experimentales comparando con el grupo control.
- Estudiar la composición del tejido sanguíneo mediante biometría hemática en los grupos experimentales comparando contra el grupo control.
- Estudiar el efecto sobre órganos blanco en los grupos experimentales comparándolos con el grupo control mediante análisis histopatológico.
- Corroborar la actividad biológica de la rTBL-1 comparando con los hallazgos en animales provocados al administrar la TBLF.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño experimental

Para este estudio se utilizó el diseño experimental mostrado en la **Figura 3**. Se obtuvo la aprobación del comité de bioética de la Facultad de Ciencias Naturales (FCN), perteneciente a la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), con el número de registro 29FCN2021 como parte del macroproyecto “Evaluación preclínica de una lectina recombinante con potencial anticancerígeno: mecanismo de acción, estudios toxicológicos y farmacológicos y su posible uso como herramienta diagnóstica”, así como la aprobación del comité de bioética de la Facultad de Química (FQ) de la UAQ para el desarrollo de este proyecto con número de oficio CBQ22/007. El trabajo experimental se llevó a cabo siguiendo los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999 y los ensayos de toxicidad según la OECD Test Guide 407 (2008). La lectina recombinante (rTBL-1) se obtuvo de acuerdo con el método descrito por Martínez-Alarcón y col. (2020), modificado por Palmerín-Carreño y col. (2021) en el cual se introdujo un plásmido con la secuencia de la lectina en *P. pastoris* que posteriormente se colocó en un biorreactor con medio de cultivo bajo condiciones controladas (Palmerín-Carreño y col., 2021). El medio obtenido se centrifugó y el sobrenadante se purificó en columnas en gel con Sephadex con afinidad a níquel para después ser lavadas con un gradiente de imidazol (200 mM), se dializó mediante la técnica de osmosis inversa con agua destilada hasta tener una conductividad de 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y finalmente, la muestra obtenida se liofilizó para recuperar la rTBL-1. La lectina se mantuvo en congelación (-20°C) hasta su uso.

3.2 Animales de experimentación

Se utilizaron 20 ratones CD-1, 10 hembras (núlíparas y no gestantes) y 10 machos, de 5 semanas de edad obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Juriquilla. Los ratones se trasladaron al bioterio de la FCN, de la UAQ en el Campus Juriquilla, dentro del cual, se mantuvieron en jaulas durante siete días (semana de adaptación)

con el fin de aclimatarse a las condiciones del laboratorio y su posterior manipulación. Después, fueron pesados individualmente para ser divididos en dos grupos, grupo control (C), con 10 ratones (5 hembras y 5 machos), y tratamiento (Tx) con 10 ratones (5 hembras y 5 machos). Los grupos fueron conformados por aleatorización, los animales se concentraron en jaulas, con un máximo de 5 ratones (del mismo sexo) por jaula. Durante todo el experimento, las condiciones ambientales del bioterio se mantuvieron en las condiciones estándar: temperatura de 22 ± 3 °C en ciclos de luz de 12 h por 12 h de oscuridad y un porcentaje de humedad relativa entre el 50 % y 60 %. Se les administró *ad libitum* agua y alimento convencional de ratón.

Terminada la semana de adaptación se modificó el alimento para los roedores mediante un tratamiento térmico en autoclave durante 15 min a 105 °C y 6 psi para la desnaturalización de proteínas con el fin de que las lectinas propias del alimento no interfirieran en el experimento. La lectina recombinante se administró diariamente durante 28 días mediante una sonda intragástrica en dosis NOAEL de rTBL-1 (30 mg/kg) al grupo Tx, mientras que al grupo C se les administró el equivalente en volumen de solución salina. Culminando el esquema de administración, se realizó la matanza de los animales por dislocamiento, se recuperaron muestras sanguíneas mediante punción cardíaca y se recolectaron los órganos del animal (bazo, páncreas pulmones, riñones, timo, cerebro, gónadas, corazón, estómago, hígado, intestino delgado, intestino grueso y colon).

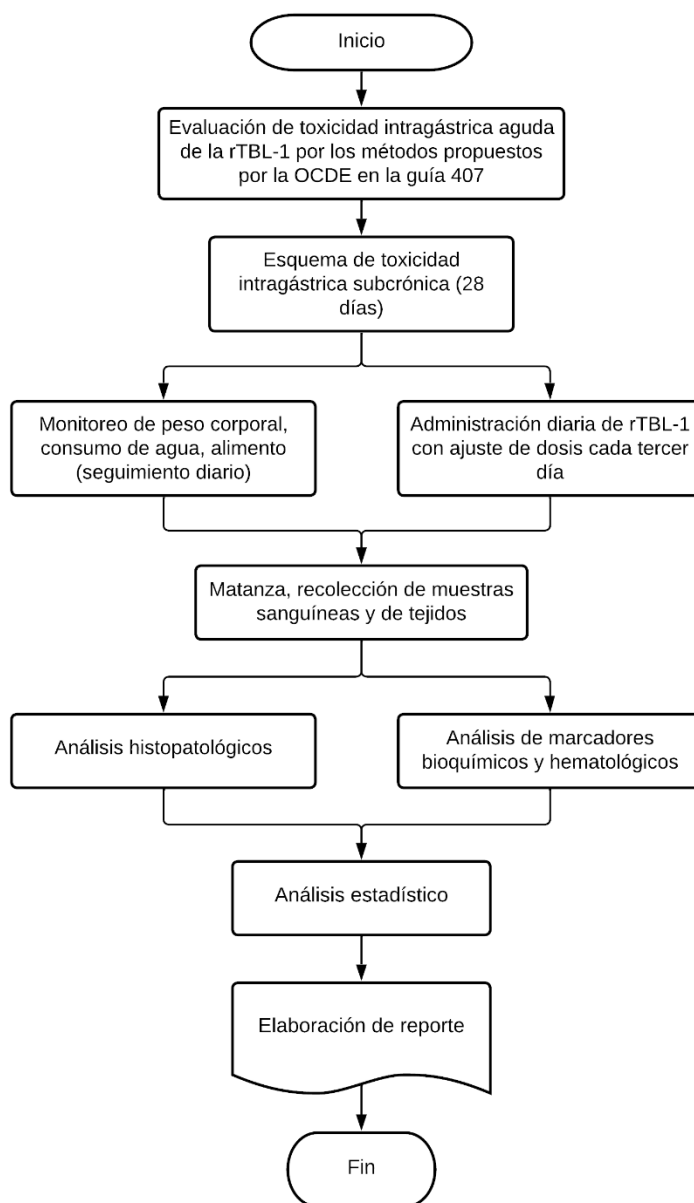


Figura 3. Diagrama de flujo de diseño experimental

3.2 Análisis de marcadores bioquímicos y hematológicos

Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos Microtainer® con gel separador (marcadores bioquímicos) y en tubos Microtainer® con EDTA-K₂ (biometría hemática completa) y se procedió a la separación del suero o plasma sanguíneo por centrifugación a 5,000 g para ser almacenado a -80 °C hasta su uso.

Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al laboratorio de la Unidad de Servicios Clínicos (USC) de la Facultad de Química, de la UAQ donde se determinaron los parámetros bioquímicos mediante un equipo Chemistry Analyzer (Mindray, BS-200) y reactivos marca Spinreact conforme a las indicaciones del fabricante las pruebas a realizar fueron: colesterol total (número de catálogo MI41021), triglicéridos (número de catálogo MI41031), creatinina (número de catálogo MI1001111), amilasa pancreática (número de catálogo 41202), urea (número de catálogo MI41041), albúmina (número de catálogo 1001020), aspartato aminotransferasa (AST) (número de catálogo 1001160), alanina aminotransferasa (ALT) (número de catálogo 1001170), fosfatasa alcalina (número de catálogo MI41233), proteínas totales (número de catálogo 1001291).

3.3 Análisis macroscópico de órganos

Los órganos de animales se observaron macroscópicamente, fueron extraídos y se resguardaron en recipientes con solución salina 0.9 % fría tratando de registrar su peso lo más rápido posible. El peso relativo de cada órgano se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Peso relativo (\%)} = \frac{\text{Peso del órgano}}{\text{Peso corporal}} \times 100$$

El índice de longitud de los intestinos se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de longitud} = \frac{\text{Longitud del intestino}}{\text{Peso corporal}}$$

3.4 Análisis histopatológico de órganos

Una vez que los órganos fueron pesados, se colocaron en un recipiente con una solución de formol al 10 % en buffer salino de fosfatos (pH=7.2). Las muestras fueron mantenidas en refrigeración hasta que fueron entregadas al Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Integral de la FCN-UAQ en dónde se realizó el proceso de

deshidratación de tejidos, montaje e inclusión en parafina, cortes de tejidos (6 μm) y tinción con hematoxilina-eosina. Los tejidos se analizaron mediante microscopía óptica a 10x, 40x y 100x por patólogos veterinarios.

3.5 Análisis estadístico

La comparación entre medias de grupos se realizó mediante una *t* de Student ($p < 0.05$). El análisis estadístico junto con las gráficas se llevó a cabo en el programa GraphPad Prism 8.

3.6 Disposición de residuos

Los residuos biológico-infecciosos fueron desechados y resguardados hasta su destrucción según la "Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, "Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo". Los objetos punzocortantes se desecharon en un recipiente rígido hermético de polipropileno de color rojo con la leyenda "Residuos Peligrosos Biológico – Infecciosos". Los tubos Microtainer® con sangre, suero o plasma, así como los demás residuos no anatómicos fueron desechados en bolsas de polietileno de color rojo marcadas con la leyenda "Residuos Peligrosos Biológico – Infecciosos". Los residuos patológicos se desecharon en bolsas de polietileno de color amarillo marcadas con la leyenda "Residuos Peligrosos Biológico – Infecciosos". Los cadáveres animales fueron desechados en bolsas de polietileno de color rojo marcadas con la leyenda "Residuos Peligrosos Biológico – Infecciosos" y congelados. Todos los desechos fueron recogidos para su disposición final por una empresa (proveedor interno de la UAQ) para su posterior incineración.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudio de toxicidad subcrónica de rTBL-1 por vía intragástrica

La administración oral en dosis repetida de 30 mg/kg de la rTBL-1 a los ratones durante 28 días no generó ningún signo o síntoma de toxicidad clásicos en comparación al grupo control. Los animales no mostraron aletargamiento, piloerección, vómito, o alteraciones en su postura o en su marcha; tampoco se observaron cambios en el comportamiento conductual o diferencia en las expresiones faciales. Cuando la rTBL-1 fue administrada por vía oral en dosis mayores a ratones y ratas en el estudio de toxicidad aguda, no se reportaron cambios en los parámetros evaluados del comportamiento animal (Balderrama-Ocádiz, 2023; Ríos Ortiz, 2022). De igual manera, bajo los esquemas de dosis repetida durante 28 días, la rTBL1 en una dosis de 30 mg/kg, así como la dosis de 50 mg/kg de la TBLF no se observaron efectos en la conducta habitual de las ratas a las que fue administrada oralmente (López-Sánchez, 2008; Ríos Ortiz, 2022).

Lo anterior muestra que la vía oral es una mejor manera de administrar las soluciones de lectina en comparación a cuando lectinas de frijol Tépari fueron administradas por vía intraperitoneal, donde se reportó inflamación abdominal y la muerte de ratones (Reynoso-Camacho y col., 2003). Se ha reportado que una lectina extraída de las semillas de la planta *Abrus precatorius* L., administrada por vía intraperitoneal en dosis de 0.91 µg/kg causó un decremento significativo en la ganancia de peso corporal (Chaturvedi y col., 2015). También se reportó que una lectina proveniente de *Sambucus ebulus* L. administrada por vía intraperitoneal en dosis de 3.75 mg/kg provocó la muerte de 9 de 10 animales (Jiménez y col., 2013).

Para detectar la presencia de toxicidad temprana se monitoreó continuamente el peso corporal, así como la ingesta alimento y agua de los animales experimentales (Repetto Jiménez y Repetto Khun, 2009). En este estudio los ratones hembra y macho tratados con la rTBL-1 mantuvieron, conforme su crecimiento, la ganancia de peso al igual que los animales del grupo control (**Figura 4**). Con respecto a los ratones hembra, el peso corporal se mantuvo de forma similar que los animales del

estudio de toxicidad oral aguda de la rTBL-1 (Balderrama-Ocádiz, 2023). A su vez, en los estudios de toxicidad de la TBLF y rTBL-1 en ratas hembra no se observó afectación de este parámetro (López-Sánchez, 2008; Ríos Ortiz, 2022), pero si en las ratas macho tratadas con la dosis de 50 mg/kg de la TBLF que mostraron una disminución de su peso corporal con respecto al grupo control (López-Sánchez y col., 2010) o como lo reportado durante el periodo de tratamiento de 3 veces por semana de 50 mg/kg de la TBLF en el estudio de tolerabilidad en ratas donde la disminución de peso del grupo tratado con respecto al grupo control fue muy marcada (Ferriz-Martínez y col., 2015).

Los ratones tratados con la rTBL-1 mantuvieron un peso similar al grupo control. Los pesos de los ratones macho, tanto en grupo control como en tratamiento, se mantuvieron en un promedio aproximado de 30 g, mientras que, para las hembras, tanto en control como el de tratamiento se mantuvieron en un promedio aproximado de 24 g. Estos valores se encuentran dentro de los parámetros de referencia tanto para ratones adultos machos, 20-40 g, como para las hembras, 22-63 g, (Quesenberry y Carpenter, 2012). Estos resultados son consistentes con los estudios previos realizados con la TBLF en los cuales no se observó esta disminución de la ganancia de peso corporal en ratas jóvenes (López-Sánchez y col., 2010; Alatorre-Cruz, y col., 2018; Pita-López y col., 2020). Sin embargo, Ferriz-Martínez y colaboradores (2015), así como Moreno-Celis y colaboradores (2017) reportaron una disminución en el consumo de alimento durante las primeras semanas de tratamiento y pérdida de la ganancia de peso corporal al administrar TBLF en ratas adultas (Alatorre-Cruz y col., 2018). Por su parte, Ríos-Ortiz (2022) y Balderrama-Ocádiz (2023) no reportaron alteraciones significativas en el comportamiento del peso corporal de los animales al administrar la rTBL-1 en rata (estudio de toxicidad subaguda y subcrónica) y ratón respectivamente (estudio de toxicidad subaguda).

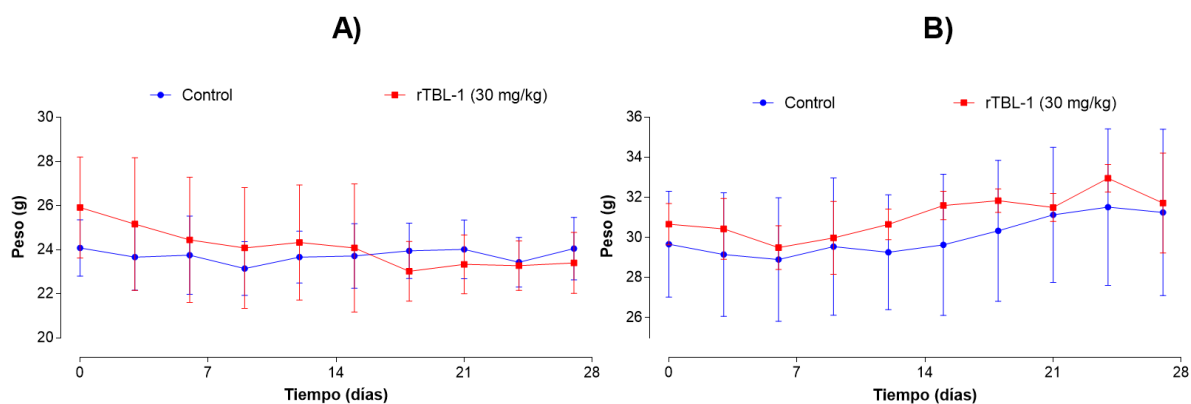


Figura 4. Peso corporal de los ratones en el estudio de toxicidad subcrónica. A) Ratones hembra y B) Ratones macho. El peso corporal fue monitoreado cada 72 horas desde la administración del tratamiento, se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratones por grupo. (*) Grupos estadísticamente diferentes, prueba *t* de Student, $p < 0.05$.

La pérdida de la ganancia de peso corporal es un indicador sensible de toxicidad después de la exposición a sustancias tóxicas; sin embargo, esta pérdida de ganancia de peso puede ser ocasionada por estrés o por adaptación fisiológica al tóxico, encontrándose a una reducción en la ingesta calórica cuando el peso corporal disminuye o cuando hay una acumulación de grasa durante la ganancia de peso corporal (Madingou y col., 2016). El consumo de agua y alimento se monitoreó diariamente durante todo el tratamiento (**Figura 5** y **Figura 6**).

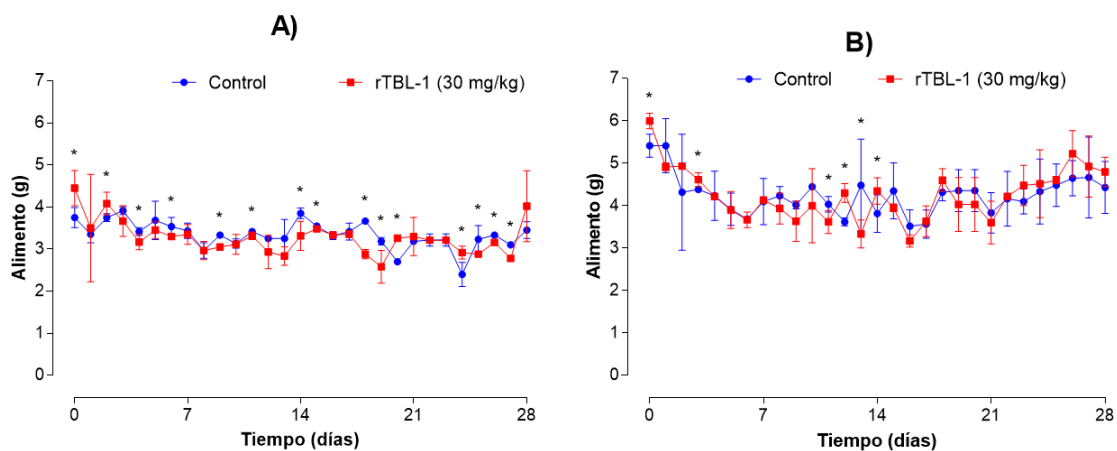


Figura 5. Ingesta de alimento por los ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. A) Ratones hembra; B) Ratones macho. La ingesta de alimento se registró diariamente desde la administración del tratamiento, se muestran los valores

promedio \pm desviación estándar de 5 ratones por grupo. (*) Grupos estadísticamente diferentes, prueba *t* de Student, $p < 0.05$.

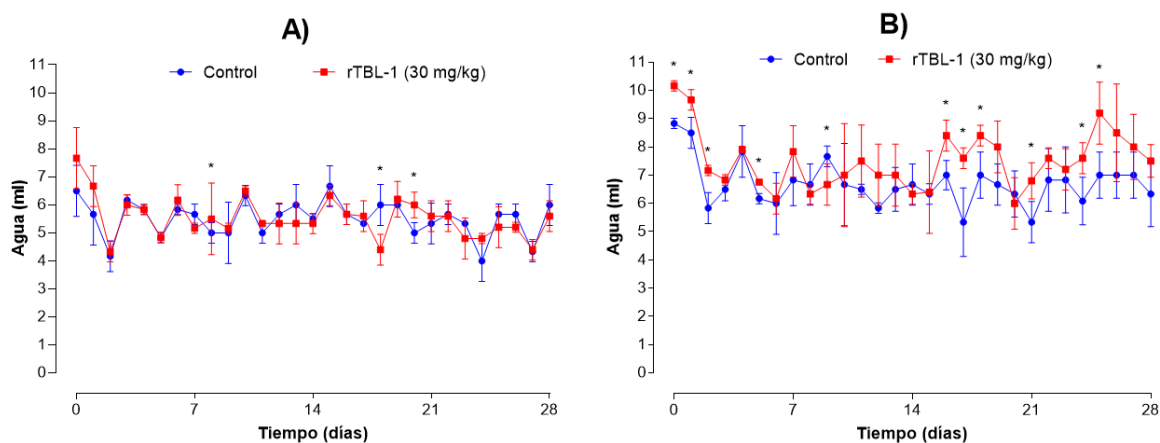


Figura 6. Consumo de agua de los ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. A) Ratones hembra; B) ratones macho. El consumo de agua se registró diariamente desde la administración del tratamiento, se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratones por grupo. (*) Grupos estadísticamente diferentes, prueba *t* de Student, $p < 0.05$.

Se observaron algunas diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) al comparar el consumo de agua entre el grupo en tratamiento contra el control, derivado posiblemente por desperdicios. Se sabe que el consumo normal de agua para los mamíferos es proporcional a su peso corporal (Fox y col., 2007), explicando así el mayor consumo por parte de los machos. Los valores de referencia para el consumo de agua para ratones son de 4.3 a 10 mL (Fox y col., 2007) mientras que el consumo de alimento es de 3 a 5 g por animal (Quesenberry y Carpenter, 2012). Por su parte, se observó que cada segundo día, las hembras mostraron una diferencia significativa en el consumo de alimento en el grupo tratado comparado con el grupo control, mismo que se observó oscilante. Sin embargo, los resultados finales muestran que la administración oral de la rTBL-1 bajo el esquema probado no provoca signos de toxicidad al no verse afectados en lo general los parámetros de peso corporal e ingesta de agua y alimento.

5.2 Efecto sobre parámetros metabólicos e inflamatorios

La guía 407 de la OCDE indica que se deben realizar investigaciones toxicológicas en distintos tejidos con el fin de identificar efectos o daños a tejidos mediante la medición de parámetros bioquímicos y la composición del tejido sanguíneo. Las muestras fueron recolectadas al término de la experimentación, al momento de realizar la matanza de los animales, por medio de punción cardiaca. La sangre fue colocada en tubos Microtainer® con gel separador para las pruebas bioquímicas, y en tubos Microtainer® con EDTA-K₂, para la biometría hemática.

En el **Cuadro 4** se muestran los resultados de los estudios bioquímicos realizados. Los parámetros que determinan la función hepática ALT, AST y ALP no mostraron cambios significativos ($p>0.05$) comparados con el grupo control, a excepción de la ALT ($p<0.05$). A su vez, se describen parámetros bioquímicos relacionados con la función renal (creatinina y urea) que tampoco presentaron cambios significativos ($p>0.05$) con respecto al grupo control. En los **Anexos 2-5** se muestran datos de referencia para parámetros bioquímicos de roedores por diferentes autores.

La enzima ALT disminuyó en el grupo de los machos en tratamiento en comparación con el control ($p<0.05$), sin embargo, no se considera que esta disminución sea de importancia fisiológica ya que se sabe que en caso de que se presenten daños hepáticos se esperaría un incremento de la ALT y AST debido a la degeneración del hepatocito y filtrado de estos analitos al espacio extracelular (Gupta, 2019). Por otro lado, el grupo en tratamiento de los ratones hembra mostró incremento estadísticamente significativo ($p<0.05$) en contraste con el grupo control, sin embargo, no se encontró elevación en AST ni en ALP por lo que, para considerar daño hepático se debería observar a la par la elevación de estas dos enzimas. En esa misma línea, estudios realizados con la lectina concavalina A, lectina que se sabe genera daño hepático, indican en sus resultados que para los efectos hepatotóxico el estado hormonal del animal influye ocasionando en las hembras una mayor susceptibilidad que los machos para el desarrollo de patologías en el hígado

(Heymman y col., 2015), como son la hepatitis autoinmune (Jaeckel y col., 2011), cirrosis biliar primaria y daño al hígado inducido por alcohol (Takamoto y col., 2003).

Cuadro 4. Bioquímica sanguínea de los ratones en el estudio de toxicidad subcrónica

Parámetro	Grupo					
	Hembras			Machos		
	Control	rTBL-1 (30 mg/kg)	<i>p</i>	Control	rTBL-1 (30 mg/kg)	<i>p</i>
Urea (mg/dL)	57.6±5.3	60.0±6.1	0.6328	70.2±8.1	66.9±10.1	0.5833
Creatinina (mg/dL)	0.4±0.1	0.4±0.2	0.9081	0.4±0.1	0.3±0.2	0.2732
Colesterol (mg/dL)	ND	ND	ND	102.3±14.0	101.0±21.2	0.9095
Triglicéridos (mg/dL)	ND	ND	ND	152.0±36.5	160.0±55.2	0.7937
ALT (UI/L)	197.4±47.3	335.5±34.6*	0.0151	197.2±54.9	119.7±24.4*	0.0203
AST (UI/L)	56.4±11.3	76.5±13.4	0.1180	74.8±11.3	97.8±34.1	0.2354
Fosfatasa alcalina (UI/L)	295.8±71.1	221.0±15.6	0.1498	269.7±68.3	313.8±76.8	0.3658
Proteínas totales (g/dL)	ND	ND	ND	5.9±0.5	5.9±0.1	0.8758
Albumina (g/dL)	5.5±0.2	5.3±0.7	0.6370	4.9±0.2	5.1±0.2	0.0902
Amilasa (UI/L)	1036.2±139.1	1004.5±109.6	0.7720	1045.2±120.5	1241.0±134.1*	0.0412

Se muestran los valores promedio ± desviación estándar de 5 ratones por grupo. Grupos que son diferentes significativamente con respecto al grupo control se señalan con un asterisco (*); prueba *t* de Student, $p < 0.05$. ALT: alanina-aminotransferasa; AST: la aspartato-aminotransferasa; ND: no determinado.

Lo anterior se da por aumento en la respuesta inmune del organismo, desencadenando la incidencia de enfermedades autoinmunes. Las hormonas sexuales (17 β -estradiol) puede regular la actividad de inmunológica de respuesta de linfocitos T, así como de proteínas inflamatorias de macrófagos (TNF- α e IFN- γ)

participando en la inducción de necrosis hepática (Takamoto y col., 2003) y por consecuente el aumento de enzimas hepáticas en suero sanguíneo.

La enzima ALT también se encuentra distribuida en músculo cardíaco o esquelético (Gupta, 2019), por lo que pudiera considerarse que la elevación en los niveles de ALT pudiera estar relacionada con daño en tejido cardíaco al momento de realizar la toma de muestra por punción cardíaca. Es importante corroborar estos hallazgos con los resultados histopatológicos para comprobar un efecto de toxicidad en el hígado. De igual forma, se hace mención que es necesario complementar el perfil hepático con las siguientes pruebas para poder identificar daños en los conductos hepatobiliares y de esta forma, generar un perfil más completo: GGT, gamma-glutamil transferasa; bilirrubinas; 5' nucleotidasa y ácidos biliares totales. Las pruebas anteriormente mencionadas no se realizaron debido a la escasa muestra sanguínea recuperada de la especie animal (un ratón de 30 g de peso corporal tiene alrededor de 1.8 mL de sangre en su organismo (Diehl y col., 2001).

Durante los estudios de toxicidad aguda y subcrónica en ratas no se encontraron alteraciones en parámetros bioquímicos hepáticos y renales en dosis por debajo de los 300 mg/kg de rTBL-1. En dosis de 300 mg/kg se observó, para el estudio de toxicidad aguda, una disminución de AST, encontrándose dentro de los valores de referencia para ratas (Ríos Ortiz, 2022). De igual manera, el estudio de toxicidad aguda en ratones no mostró alteraciones significativas en marcadores hepáticos y renales (Balderrama-Ocádiz, 2023). Además, estudios realizados con TBLF no mostraron indicios de daño hepático o renal (Lopez-Sanchez y col., 2010; Ferriz-Martinez y col., 2015; Moreno-Celis y col., 2017). Se ha reportado que otras lectinas como la Abrina en dosis de 0.91 µg/kg y la MuRL, proveniente de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel., en dosis elevadas de 5,000 mg/kg provocan alteraciones considerables en criterios de función hepática indicando daños en el hígado (Chaturvedi y col., 2015; da Silva y col., 2020).

Un indicador de la función y estado del páncreas es la amilasa pancreática; la cual se encontró elevada comparada contra el grupo control ($p < 0.05$). Estudios anteriores

realizados por Alatorre-Cruz y colaboradores en 2018, observaron hipertrofia en la porción exocrina de los acinos pancreáticos como un posible mecanismo compensatorio de la atrofia intestinal, mismo mecanismo que se cree, eleva la amilasa pancreática.

Se realizaron estudios sobre colesterol, triglicéridos para observar posibles efectos nutricionales sin llegarse a encontrar variaciones significativas ($p>0.05$). Anteriormente, se reportó que la TBLF exhibe un efecto antinutricional (López-Sánchez y col., 2010; Ferriz-Martínez y col., 2015; Moreno-Celis y col., 2017; Pita-López y col., 2020) causando una disminución de los niveles séricos de albúmina mientras que las proteínas totales se mantienen sin diferencia respecto al control (López-Sánchez y col., 2010; Alatorre-Cruz y col., 2018). En estudios recientes muestran como la rTBL-1 provoca, al contrario de la TBLF, un aumento en la concentración sérica de albúmina sin llegarse a salir de los valores de referencia para la especie; esto en ratas macho (Ríos Ortiz, 2022). Cabe mencionar que los valores de colesterol, triglicéridos y proteínas totales para los ratones hembra no se pudieron determinar por la falta de muestra sanguínea recolectada en los animales. Sin embargo, en estudios anteriores no se describen aumentos o disminuciones significativas para ratas hembra en estos parámetros (Alatorre-Cruz y col., 2018; Ríos Ortiz, 2022).

En conjunto con los estudios de marcadores metabólicos, la OCDE en su guía 407 indica que se debe realizar un análisis de la composición del tejido sanguíneo, el cual se muestra en el **Cuadro 5**. La composición de la fórmula roja se encontró sin alteraciones significativas ($p>0.05$) entre los grupos en tratamiento comparados con respecto a los controles. También se observa que las plaquetas se mantuvieron sin cambios estadísticamente importantes ($p>0.05$). Por otro lado, se observó incremento en el porcentaje de granulocitos (neutrófilos segmentados) en los ratones macho ($p<0.05$) pero no en ratones hembra. Se reporta que los ratones macho adultos poseen un conteo de granulocitos segmentados significativamente mayor que las hembras (Percy y Barthold, 2007).

Cuadro 5. Biometría hemática de los ratones en el estudio de toxicidad subcrónica

Parámetro	Grupo					
	Hembras			Machos		
	Control	rTBL-1 (30 mg/kg)	<i>p</i>	Control	rTBL-1 (30 mg/kg)	<i>p</i>
LEUCOCITOS (x10 ³ /μL)	8.3±1.9	6.1±1.1	0.1555	11.2±1.7	13.0±1.8	0.2079
Linfocitos (%)	87.0±2.0	88.0±1.0	0.4818	90.2±3.0	84.0±4.1	0.0504
Neutrófilos segmentados (%)	11.3±1.7	9.7±2.1	0.3630	6.6±1.7	13.0±2.7*	0.007
Neutrófilos en banda (%)	0±0	0±0	ND	0±0	0.3±0.5	ND
Eosinófilos (%)	1.7±0.6	1.5±0.7	0.7262	2.0±1.9	0.7±1.5	0.5778
Basófilos (%)	0±0	0.3±0.6	ND	0±0	0.3±0.5	ND
Monocitos (%)	1±0	1.5±0.7	0.2837	1.2±0.4	1.7±1.7	0.2957
ERITROCITOS (x10 ⁶ /μL)	9.7±0.5	10.1±0.1	0.2744	9.3±0.3	8.9±0.6	0.2274
Hemoglobina (g/dL)	15.1±0.4	15.4±0.5	0.4486	14.5±0.7	14.0±0.7	0.2432
Hematocrito (%)	60.1±3.3	61.6±0.6	0.4830	53.6±1.4	51.7±3.2	0.3157
MCV (fL)	61.7±1.0	61.1±0.4	0.3809	57.4±1.5	58.1±0.6	0.4295
MCH (pg)	15.6±0.3	15.3±0.4	0.4267	15.5±0.3	15.7±0.3	0.4252
MCHC (g/dL)	25.2±0.7	25.0±0.5	0.7422	27.1±0.4	27.1±0.4	0.9867
RDW (%)	16.4±1.5	16.9±0.4	0.6240	15.3±0.9	14.7±0.9	0.3521
PLAQUETAS (x10 ³ /μL)	501.0±120.8	360.7±49.7	0.1362	848.8±131.5	620.8±221.9	0.1275
MPV (fL)	6.1±0.2	6.3±0.3	0.2295	6.2±0.5	6.2±0.2	0.9232

Se muestran los valores promedio ± desviación estándar de 4 ratones por grupo. Grupos que son diferentes significativamente con respecto al grupo control se señalan con un asterisco (*); prueba *t* de Student, *p*<0.05. MCV: volumen globular medio; MCH: hemoglobina corpuscular media; MCHC: concentración media de hemoglobina corpuscular; RDW: ancho de distribución de glóbulos rojos; MPV: volumen plaquetario medio; ND: No determinado.

Los datos mencionados concuerdan con los históricos para la rTBL-1 de Rios-Ortíz (2022) y Balderrama-Ocádiz (2023) en los cuales, las alteraciones de los parámetros hematológicos se mantienen sin ningún cambio significativo encontrándose todos dentro de los valores de referencia. Los estudios realizados anteriormente en la TBLF reportaron incremento en el conteo de los granulocitos y una disminución en los linfocitos siendo este un indicativo de la activación del sistema inmune (Ferriz-Martínez y col., 2015; Moreno-Celis y col., 2017; Alatorre-Cruz y col., 2018), lo anterior se muestra en la **Figura 7** para los ratones macho. Cabe mencionar que el estudio de toxicidad subcrónica realizados con rTBL-1 en ratas mostró aumento en el porcentaje de monocitos y granulocitos en las ratas macho, sugiriendo una activación del sistema inmune (Rios-Ortíz, 2022) y, bajo el mismo hilo de ideas, también se sugiere activación del sistema inmune por el aumento en el porcentaje de granulocitos (6.2%). La activación del sistema inmune es liderada por los granulocitos polimorfonucleares en respuesta a un antígeno (González-Barro y col., 2003), en este caso el antígeno puede ser la lectina recombinante o un epítipo de ésta.

Figura 7. Porcentaje de células blancas en la sangre de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratones por grupo. (*) Grupos estadísticamente diferentes, prueba *t* de Student, $p < 0.05$.

5.3 Análisis macroscópico de órganos

Para poder observar de una manera más completa y profunda la toxicidad de un xenobiótico en algún órgano, se deben considerar tanto los resultados de estudios de bioquímica sanguínea junto con los histopatológicos. El análisis macroscópico de los órganos no mostró alteraciones en cuanto a su estructura, color y textura en los grupos tratados comparados contra el control. En el **Cuadro 6** se muestra el peso de los órganos tras la necropsia de los ratones. Como todos los animales son diferentes entre sí, en talla y peso, se hizo una relación porcentual entre del peso del órgano con respecto al peso corporal (peso relativo) para un análisis más profundo.

Cuadro 6. Pesos de órganos en el estudio de toxicidad aguda

Peso del órgano (g)	Hembras			Machos		
	Control	rTBL-1 (30 mg/kg)	p	Control	rTBL-1 (30 mg/kg)	p
Corazón	0.125±0.010	0.110±0.012	0.0640	0.135±0.015	0.159±0.016*	0.0401
Pulmones	0.305±0.075	0.316±0.056	0.7994	0.281±0.056	0.286±0.044	0.8791
Riñones	0.352±0.021	0.336±0.013	0.1855	0.520±0.072	0.532±0.020	0.7288
Bazo	0.089±0.018	0.095±0.016	0.5927	0.160±0.047	0.181±0.051	0.5175
Timo	0.117±0.027	0.093±0.016	0.1256	0.093±0.014	0.122±0.034	0.1158
Intestino delgado	1.618±0.127	1.623±0.345	0.9765	2.881±0.694	2.989±0.219	0.7485
Intestino grueso	1.442±0.211	1.354±0.154	0.4729	1.697±0.451	1.999±0.254	0.2283
Hígado	1.538±0.138	1.580±0.103	0.6004	2.142±0.428	2.346±0.183	0.3558
Cerebro	0.608±0.116	0.542±0.012	0.2413	0.510±0.037	0.552±0.032	0.0911
Gónadas	0.094±0.016	0.096±0.016	0.8483	0.171±0.029	0.203±0.010*	0.0480
Páncreas	0.472±0.123	0.366±0.091	0.1599	0.675±0.233	0.712±0.154	0.9320
Estómago	0.691±0.135	0.636±0.149	0.5577	0.722±0.161	0.793±0.135	0.4715

Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar del peso del órgano de 5 ratones por grupo. La comparación de medias se realizó por género de acuerdo con los pesos relativos, prueba "t de Student, $p < 0.05$. (*) Grupos estadísticamente diferentes. PO/PC= Relación del peso del órgano entre el peso corporal del animal. La comparación de medias se realizó por género de acuerdo con los pesos relativos, prueba t de Student, $p < 0.05$. (*) Grupos estadísticamente diferentes.

No se observó diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) al comparar los índices de longitud de los intestinos de los grupos en tratamiento con respecto a los grupos control (**Figura 8**). Los estudios de la TBLF no mencionan cambios para los índices de longitud de intestinos (Ferriz-Martínez y col., 2015; Alatorre-Cruz y col., 2018; Pita-Lopez y col., 2020). Mismo comportamiento que se aprecia en los estudios de toxicidad aguda y subcrónica en ratas con la rTBL-1 (Rios-Ortíz, 2022) y en los estudios de toxicidad aguda en ratón (Balderrama-Ocádiz, 2023).

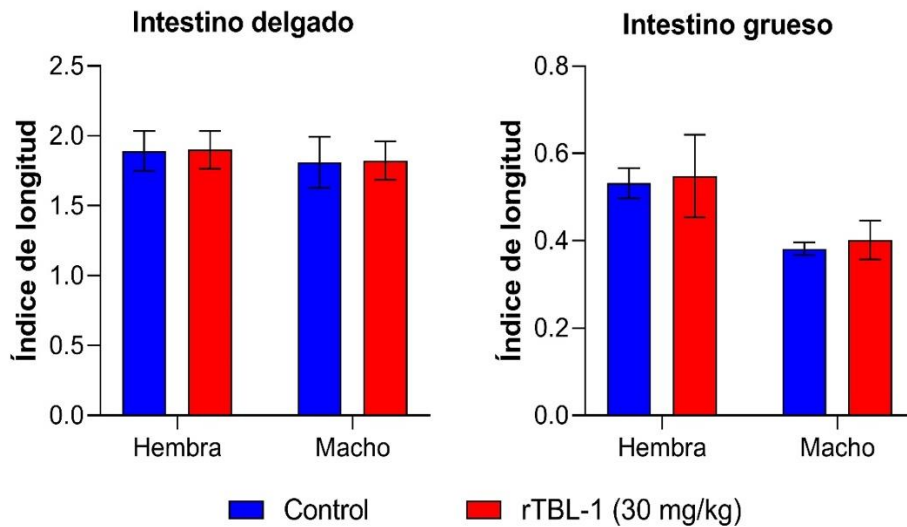


Figura 8. Índice de longitud de intestino delgado e intestino grueso de los ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratones por grupo. (*) Grupos estadísticamente diferentes, prueba *t* de Student, $p < 0.05$.

No se encontraron cambios estadísticamente significativos ($p < 0.05$) para ninguno de los órganos de los grupos tratados con respecto a los grupos control en el caso de ratones hembra. En el caso de ratones macho se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) para los testículos y para el corazón. En los estudios de toxicidad aguda y subcrónica para rTBL-1 en ratas no se describen cambios significativos en el peso de los órganos (Ríos-Ortíz, 2022) ni tampoco se advirtieron cambios en los pesos de órganos dentro del estudio de toxicidad aguda en ratones (Balderrama-Ocádiz, 2023).

La **Figura 9** muestra la comparación entre los pesos relativos (peso del órgano ajustado al peso corporal de cada individuo) para intestinos, estómago, hígado, páncreas y riñones. La administración vía oral de la TBLF no presentó disminución del peso de los riñones (Ferriz-Martínez y col., 2015; Alatorre-Cruz y col., 2018). De la misma manera, se reporta que la rTBL-1 no presenta disminución en el peso neto y relativo de riñones, así como en los estudios subcrónicos y subagudos en ratas y ratones respectivamente (Ríos-Ortíz, 2022; Balderrama-Ocádiz, 2023). Sin embargo,

se advirtió una disminución de los pesos de los riñones de ratas cuando fueron administradas por vía intraperitoneal lectinas de frijol Tépari en dosis iguales y superiores a 400 µg/kg (Reynoso-Camacho y col., 2003).

No se observaron cambios tanto en el peso bruto del hígado como en su peso relativo. Estudios anteriores han mostrado que lectinas de frijol Tépari administradas por vía intraperitoneal provocaron disminución del peso relativo en el hígado en los animales tratados (Reynoso-Camacho y col., 2003). Por su parte, tras la administración de la TBLF el hígado mantiene su peso mientras que los intestinos han mostrado un aumento en peso en los animales tratados con respecto al grupo control (Ferriz-Martínez y col., 2015; Alatorre-Cruz y col., 2018). Lo anterior indica que la administración oral es menos tóxica que la intraperitoneal.

Respecto al estómago, los resultados reportados para la TBLF no indicaron variaciones estadísticas en el peso del estómago (López-Sánchez y col., 2010; Ferriz-Martínez y col., 2015; Alatorre-Cruz y col., 2018). En el estudio de toxicidad aguda en ratas tratadas con la rTBL-1, se registró aumento en el peso relativo para el estómago derivado de la presencia de contenido gástrico, tanto del estómago como intestinos a pesar de que los animales se encontraran en ayuno (Ríos-Ortíz, 2022) mientras que el estudio de toxicidad aguda en ratones no se reporta este efecto (Balderrama-Ocádiz, 2023). Se cree que esta diferencia radica en el metabolismo de los mismos animales, ya que los ratones necesitan menos horas de ayuno para vaciar su contenido gástrico mientras que las ratas requieren un tiempo mayor; además, presentan el inconveniente de comenzar a ingerir el aserrín de la cama sanitaria (Percy y Barthold, 2007).

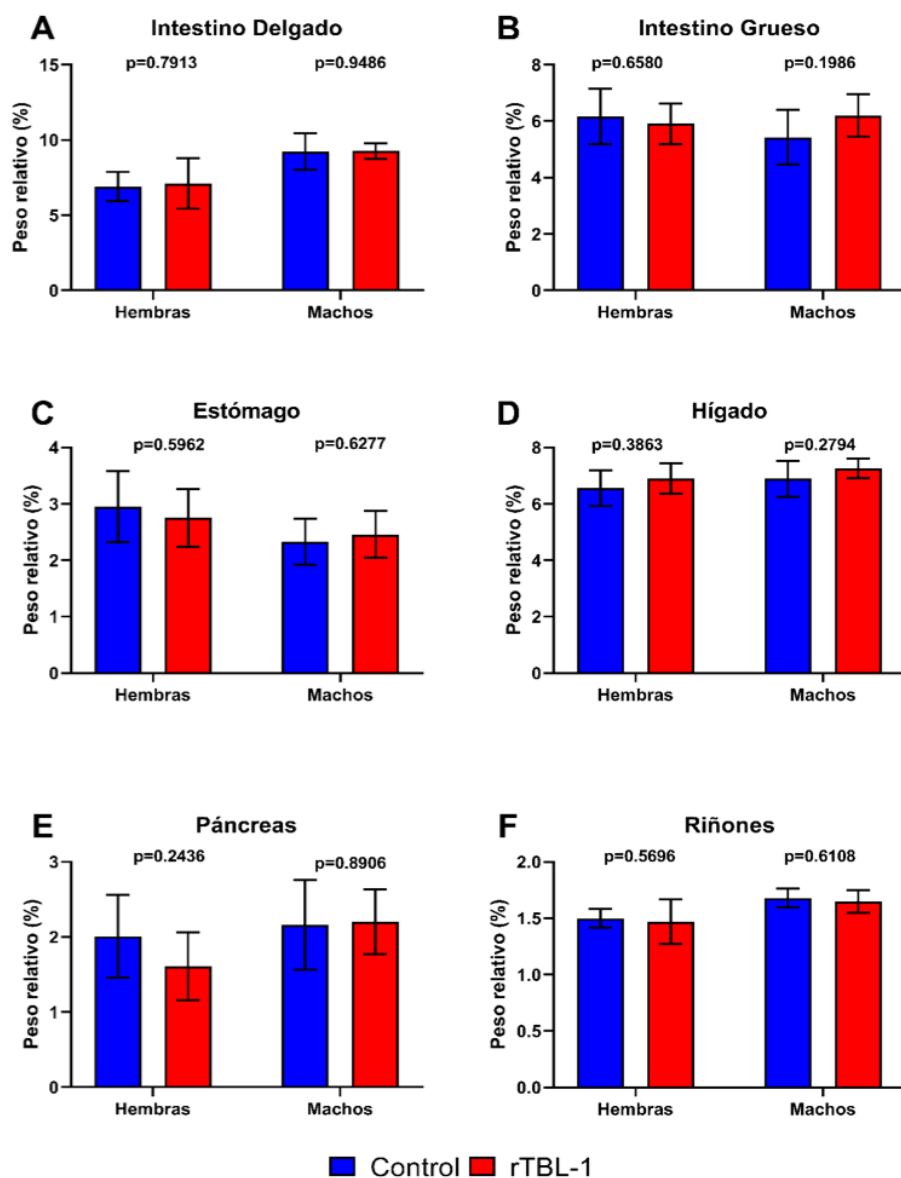


Figura 9. Pesos relativos de órganos de los ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. A) Intestino delgado, B) Intestino Grueso, C) Estómago, D) Hígado, E) Páncreas y F) Riñones. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratones por grupo. (*) Grupos estadísticamente diferentes, prueba *t* de Student, $p < 0.05$.

Con relación a los intestinos, no se apreciaron diferencias estadísticas tanto en el peso bruto del órgano como en los pesos ajustados en los grupos tratados con rTBL-1 comparados contra los grupos controles. Se informa que la TBLF provocó un aumento en el peso del intestino delgado y disminución del 20 % en el peso del colon

para ratas a los 48 días de tratamiento (Alatorre-Cruz y col., 2018). No obstante, estos resultados son variables, ya que también se ha reportado que la TBLF no ocasiona estos cambios en este parámetro (Ferriz-Martínez y col., 2015; Pita-Lopez y col., 2020). Los estudios de toxicidad aguda para la rTBL-1 indican una disminución estadísticamente significativa en el peso de intestino delgado en dosis de 50 mg/kg, sin embargo, en el estudio de toxicidad subcrónica no se advierten estos cambios (Ríos-Ortíz, 2022). Por otro lado, en los estudios de toxicidad aguda para ratones no se menciona ningún tipo de alteraciones para esta variable (Balderrama-Ocádiz, 2023).

El páncreas no presentó diferencia estadística entre los grupos tratados en comparación con los controles. Sin embargo, se aprecia una diferencia no significativa en ratones hembra, derivada de la recolección del tejido, causante a la falta de experiencia al momento de identificar y recolectar el tejido ya que se llegó a confundir con tejido graso llegando a descartar una porción del mismo órgano. El estudio de toxicidad aguda de la TBLF en ratas reportó disminución del peso relativo del páncreas del grupo en tratamiento en comparación con los controles al recibir una dosis de 50 mg/kg (López-Sánchez y col., 2010). Ferriz-Martínez y colaboradores (2015) en su estudio de tolerabilidad con la TBLF no reportaron cambios significativos en el peso del páncreas. Los estudios de toxicidad aguda con la rTBL-1 en ratas encontraron un aumento estadísticamente significativo en el peso relativo del órgano en dosis de 100 mg/kg, sin embargo, durante el estudio de toxicidad subcrónica, con dosis de 30 mg/kg, las ratas no presentaron este aumento (Ríos-Ortíz, 2022). Los estudios de toxicidad aguda en ratones no mostraron alteraciones significativas en el peso del páncreas (Balderrama-Ocádiz, 2023).

La **Figura 10** muestra la comparación de pesos relativos para timo, bazo, pulmones, corazón, cerebro y gónadas. En cuanto al peso del corazón en ratones macho ($p > 0.05$), el resultado puede atribuirse a la toma de muestra para la recolección de la sangre, por punción cardiaca y, que al momento de maniobrar para recolectar el tejido este se laceró o desprendió parte del tejido con la aguja alterando el peso. Además, al momento de realizar el pesaje de órganos se encontró que algunos

corazones todavía se encontraban unidos a pequeñas porciones de la aorta que influyeron en el peso final. No obstante, el peso relativo no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Rios-Ortíz (2022) y Balderrama-Ocádiz (2023) no advierten ningún aumento o disminución estadísticamente significativo en el peso del corazón.

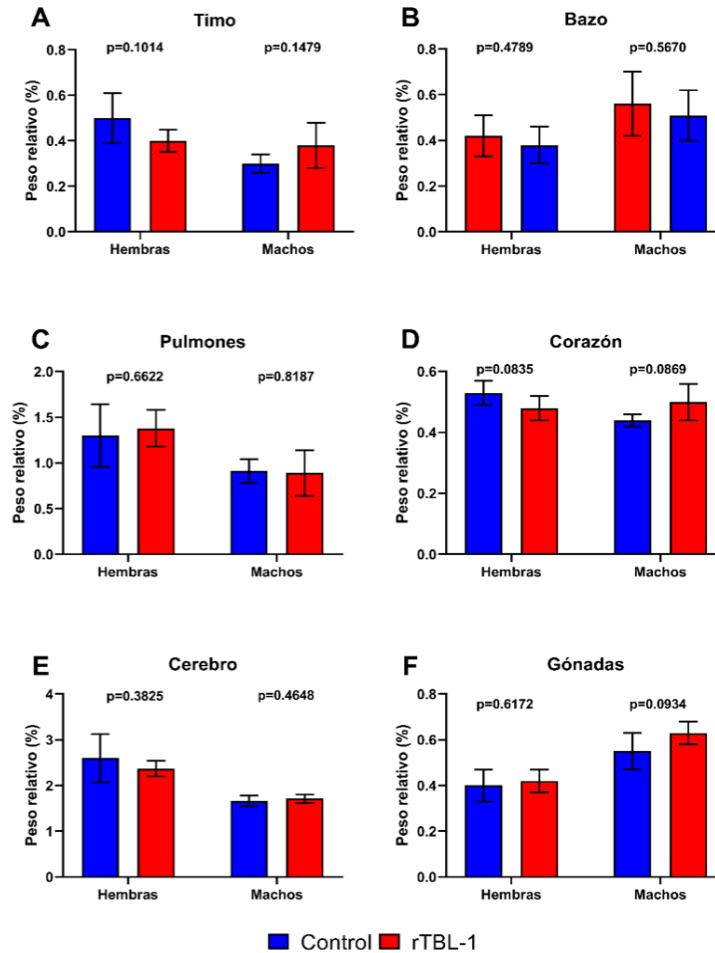


Figura 10. Pesos relativos de órganos de los ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. A) Timo, B) Bazo, C) Pulmones, D) Corazón, E) Cerebro y F) Gónadas. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratones por grupo. (*) Grupos estadísticamente diferentes, prueba “t” de Student, $p < 0.05$.

Respecto a los pulmones, Rios-Ortiz (2022) y Balderrama-Ocadiz (2023) no indicaron alteración en el peso de los animales tratados con la rTBL-1. Importante resaltar que al momento de realizar la necropsia se encontraron petequias en los pulmones de

los animales. Se teoriza que éstas fueron provocadas por partículas de polvo aspiradas provenientes de la cama sanitaria. En estudios paralelos (Ríos Ortiz, 2022) los animales utilizados poseían cama sanitaria proveniente del mismo saco y se encontraron los mismos signos.

El cerebro no mostró cambios significativos en el peso relativo de los animales en tratamiento comparados con los grupos control. Los datos mostrados por Ríos Ortiz (2022) y Balderrama-Ocádiz (2023) tampoco mostraron desviaciones significativas en el peso relativo del órgano. El bazo, timo y ovarios (en ratones hembra) y testículos (en ratones macho) no mostraron diferencias significativas ($p>0.05$) en sus pesos relativos. Sin embargo, el peso bruto de los testículos de los ratones tratados con la rTBL-1 y comparados contra el grupo control presentaron una diferencia estadística, misma que se puede atribuir al tamaño del animal. Se observó, asimismo, que el peso de los ratones del grupo en tratamiento fue mayor que los del grupo control ($p>0.05$). El aumento de peso provoca un aumento en la masa corporal del individuo y por ende un mayor tamaño o talla del animal y, en consecuente, observamos un aumento en el tamaño de los respectivos órganos.

Los estudios de toxicidad aguda de lectinas de frijol Tépari mostraron aumento significativo en el peso del bazo, así como disminución en el peso del timo al aplicar dosis superiores a 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por vía intraperitoneal (Reynoso-Camacho y col., 2003). Por otro lado, en el estudio de tolerabilidad para la TBLF no se reportaron variaciones estadísticamente significativas para el peso del bazo y timo (Ferriz-Martínez y col., 2015). También se describe para la TBLF un incremento en la pulpa blanca del bazo sin llegar a manifestar cambios en el peso; se cree que este incremento se debe a una activación del sistema inmune (Alatorre-Cruz y col., 2018). Los estudios de toxicidad aguda y subcrónica en ratas (Ríos-Ortiz, 2022), así como el estudio de toxicidad aguda en ratones (Balderrama-Ocádiz, 2023) no reportan un cambio significativo en el peso del timo.

5.4 Análisis histopatológico

Conforme marca la guía 407 de la OCDE los resultados del estudio de toxicidad subcrónica de la rTBL-1, deben ser complementados con un análisis histopatológico. A continuación, se describe el análisis de hígado, bazo, páncreas, intestino delgado e intestino grueso.

En el análisis del hígado de ratones del grupo tratado con rTBL-1 durante 28 días mostró moderada esteatosis grasa y diferencia en el tamaño de sus núcleos celulares (anisocariosis) así como la presencia de cromatina reactiva, alteraciones que no fueron observadas en el tejido hepático de los ratones grupo control, que solamente mostraron una ligera congestión (**Figura 11**). El aumento del número de células de Kupffer en el grupo tratado con rTBL-1 puede deberse a que el hígado mantiene una función adecuada y que estas células participan en mantener el equilibrio al eliminar productos de desecho de los hepatocitos que muestran las afecciones antes descritas.

Al no observarse alteraciones macroscópicas que puedan indicar la presencia de un hígado graso y que los parámetros bioquímicos de lípidos en suero sanguíneo no se observaron fuera de intervalos de referencia, la repercusión de la esteatosis grasa observada puede considerarse menor. Los hígados de ratas tratadas con la rTBL-1 y de ratas del grupo control presentaron hepatitis multifocal y congestión leve, por lo que se consideró que no se debió a un efecto de la rTBL-1. Sin embargo, el tejido hepático de las ratas tratadas con la lectina recombinante presentó degeneración glucogénica leve, lo que sugiere que la rTBL-1 puede influir de alguna manera en procesos metabólicos hepáticos sin que se tenga una repercusión observable a nivel sistémico bajo los parámetros evaluados en los ensayos de toxicidad (Ríos Ortiz, 2022). En los estudios realizados con la TBLF no se describieron alteraciones macroscópicas o microscópicas en el hígado de los roedores (López-Sánchez y col., 2010, Alatorre-Cruz y col., 2018).

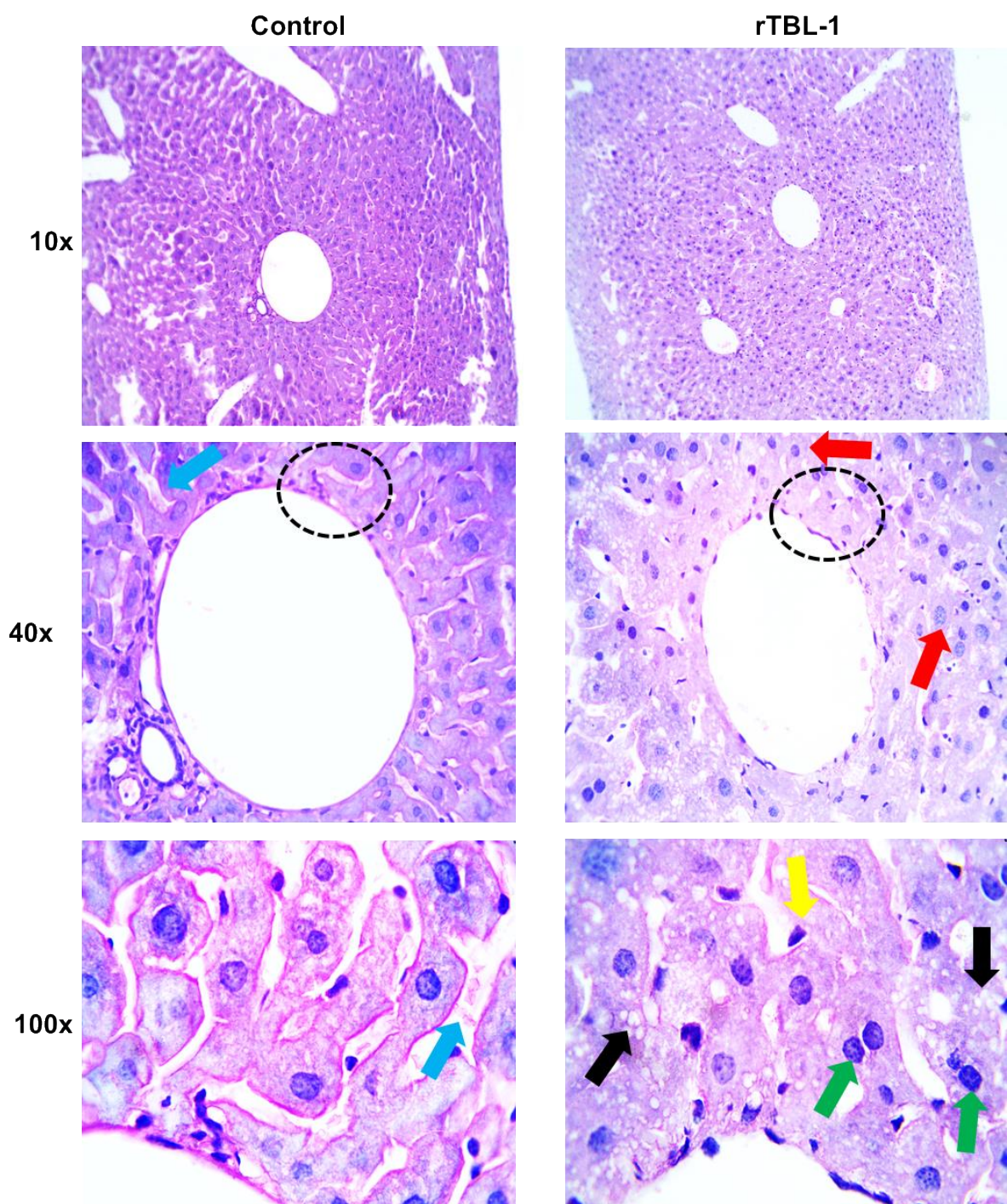


Figura 11. Micrográficas representativas de cortes histológicos del hígado de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y se muestran a diferentes aumentos. Principales cambios histopatológicos: anisocariosis hepática (flechas rojas), esteatosis grasa (flechas negras), cromatina reactiva (flechas verdes), hiperplasia de células de Kupffer (flechas amarillas) y congestión (flechas azules).

El bazo de los ratones no mostró cambios histopatológicos en ambos grupos dentro del ensayo efectuado (**Figura 12**). En el estudio de toxicidad subcrónica realizado en ratas fue descrita la presencia de hiperplasia de la pulpa blanca en el bazo de los animales tratados con la rTBL-1 (Ríos Ortiz, 2022), un efecto también observado en ratas a las que se administraron 50 mg/kg de TBLF durante 6 semanas (Alatorre-Cruz y col., 2018). Lo anterior sugiere la activación del sistema inmune, al menos apreciando los cambios histológicos del bazo siendo distinta entre las dos especies de roedores. Las alteraciones del órgano antes mencionadas se pueden considerar como leves al compararlas con las ocasionadas por otra lectina que ha sido ampliamente estudiada, la lectina abrina, proveniente de *A. precautorius*, que provocó degeneración del parénquima del bazo al día de la administración y al tercer día ya se observaba la formación de megacariocitos, atrofia de la pulpa blanca y degeneración celular (Chaturvedi y col., 2015).

Asimismo, el páncreas se presentó sin cambios en ambos grupos tratados con la rTBL-1 comparados contra el grupo control (**Figura 13**). Durante los estudios de la TBLF se describe para el páncreas una hipertrofia de los acinos pancreáticos con una exacerbada presencia de vacuolas por incremento de producción de enzimas, esto como un mecanismo compensatorio a la atrofia intestinal ocasionada por la misma TBLF y sus efectos antinutricionales (Alatorre-Cruz y col., 2018). Posteriormente, en los estudios de toxicidad subcrónica en ratas Sprague Dawley con la rTBL-1 no se observaron cambios en la histología del órgano en los grupos tratados (Rios-Ortíz, 2022). Sin embargo, se teoriza que esta lectina puede estar generando el mismo efecto compensatorio que el descrito por Alatorre-Cruz y colaboradores (2018) pero en un periodo mayor de tiempo. En este estudio la rTBL-1 provocó un aumento de la amilasa pancreática en suero sanguíneo en los ratones macho ($p < 0.05$,) por lo que es necesario realizar el estudio de toxicidad crónica para llegar a observar alteración morfológica tanto macroscópica como microscópica del órgano.

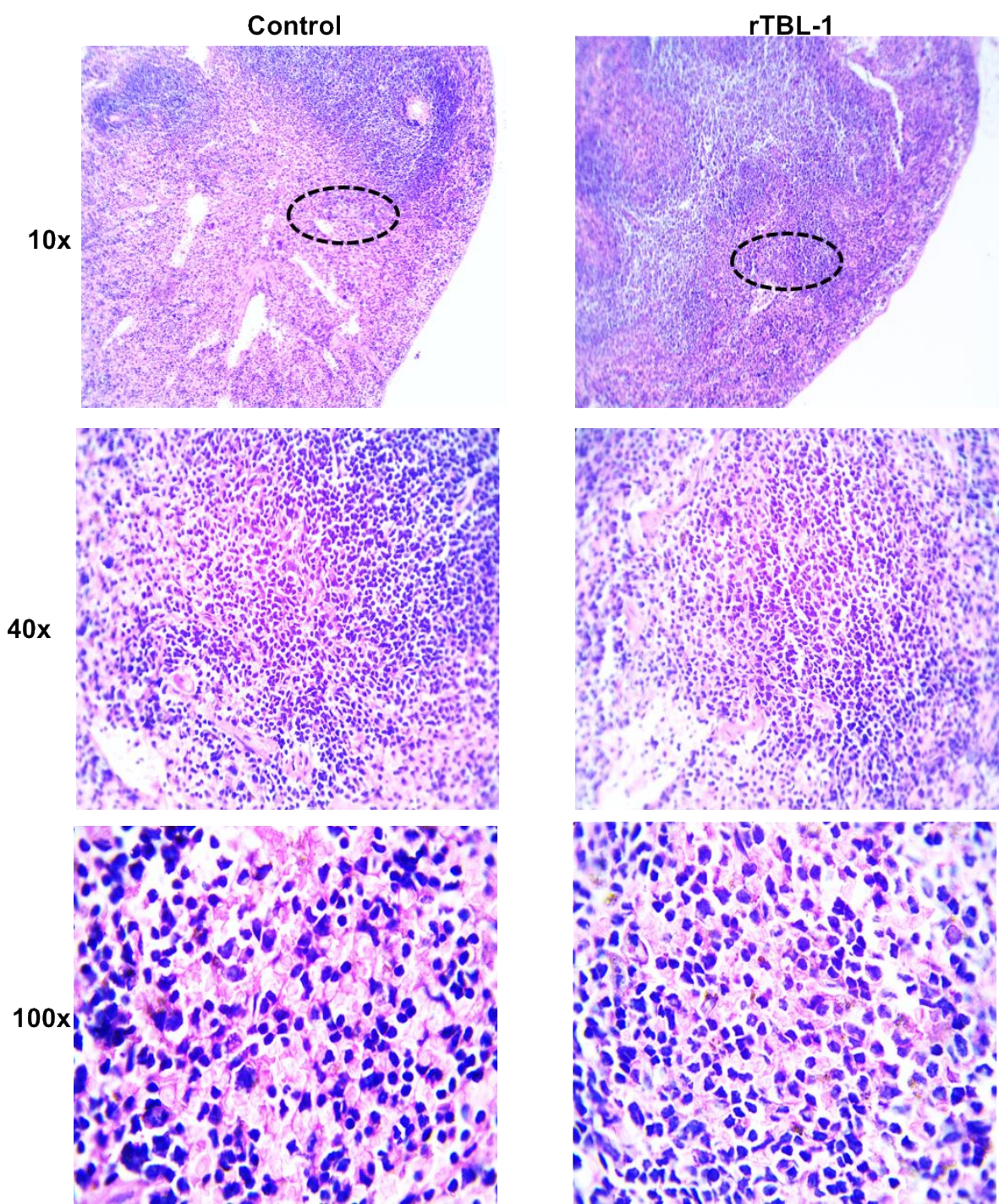


Figura 12. Micrografías representativas de cortes histológicos de bazo ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y se muestran a diferentes aumentos (10x, 40x y 100x).

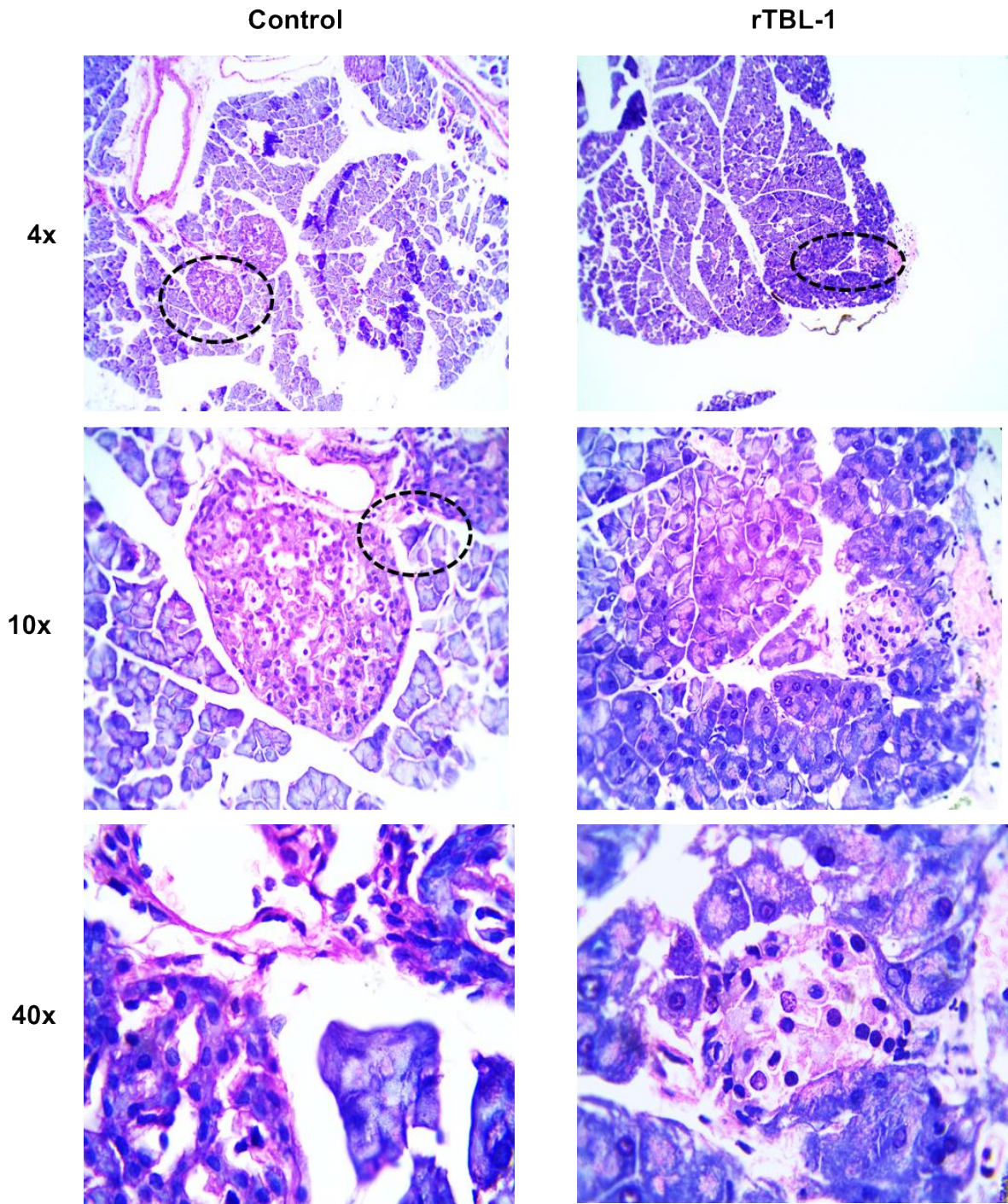


Figura 13. Micrografías representativas de cortes histológicos de páncreas ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y se muestran a diferentes aumentos (10x, 40x y 100x).

Actualmente se sabe que la TBLF ocasiona atrofia de vellosidades en el intestino (Moreno-Celis y col., 2017; Alatorre-Cruz y col., 2018; Pita-Lopez y col., 2020). En las Figuras **14-16** se atrofia de vellosidades en duodeno, yeyuno e íleon provocada por la rTBL-1. También se presta atención a morfología alterada en los grupos control atribuidas al daño por estrés mecánico al momento de manipular las muestras. Pita-López y col. (2020) mostraron que la atrofia de las vellosidades intestinales provocada por la TBLF se revirtió parcialmente después de 6 semanas de recuperación. Además, se ha reportado que la administración de otras lectinas ha llegado a afectar el epitelio intestinal, mayormente en duodeno y yeyuno, al unirse a los carbohidratos presentes en las membranas celulares sin que estas glicoproteínas pierdan actividad (Alatorre-Cruz y col., 2018).

Asimismo, se observa en el duodeno e íleon hiperplasia linfoide de placa de Peyer y tejido linfoide reactivo, respectivamente. Se observó incremento de mucosidad similar a lo mostrado tras el tratamiento con la TBLF, provocando así un estado de inflamación en la zona (Pita-López y col., 2020) y activación del sistema inmune. La TBLF provocó también un adelgazamiento del tejido intestinal y un incremento de folículos linfoides en placas de Peyer en ratas tratadas con la misma TBLF sugiriendo una hiperactivación de la respuesta del sistema inmune (Alatorre-Cruz y col., 2018).

Algunas lectinas como la lectina proveniente de *P. vulgaris*, al ser administrada por vía oral en dosis de 60 mg, provocaron la muerte de una tercera parte de los sujetos de estudio (ratones ddY) por anomalías en la absorción de nutrientes en el intestino, esto es generado por un desordenamiento más severo en las vellosidades que consecuentemente desarrolla el síndrome de mala absorción (Hara y col., 1983), La ricina, lectina sumamente tóxica, provoca atrofia severa en la mucosa y en las vellosidades así como elongación de las criptas intestinales a las 5 h posteriores a su administración por vía oral en ratas (Ishiguro y col., 1992). La lectina Ebulin f., proveniente de *S. ebulus* L., a dosis de 5 mg/kg provocó la muerte de los animales, y ocasionó lesiones importantes a las 24 h de su administración por vía intraperitoneal en ratones Swiss (Jímenez y col., 2013).

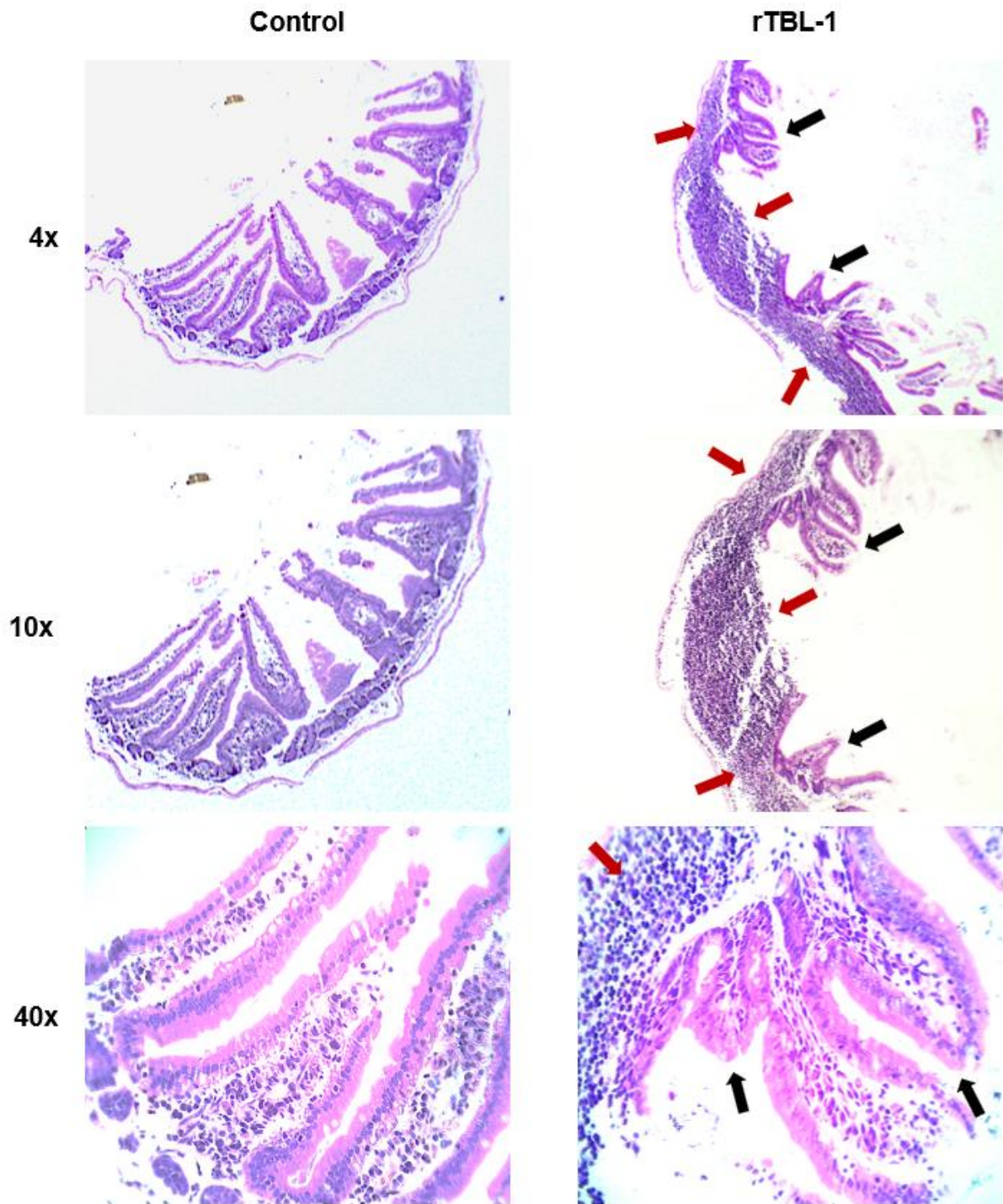


Figura 14. Micrografías representativas de cortes histológicos del duodeno de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y se muestran a diferentes aumentos. Principal cambio histopatológico: hipertrofia linfoide (flechas rojas) y atrofia de vellosidades (flechas negras).

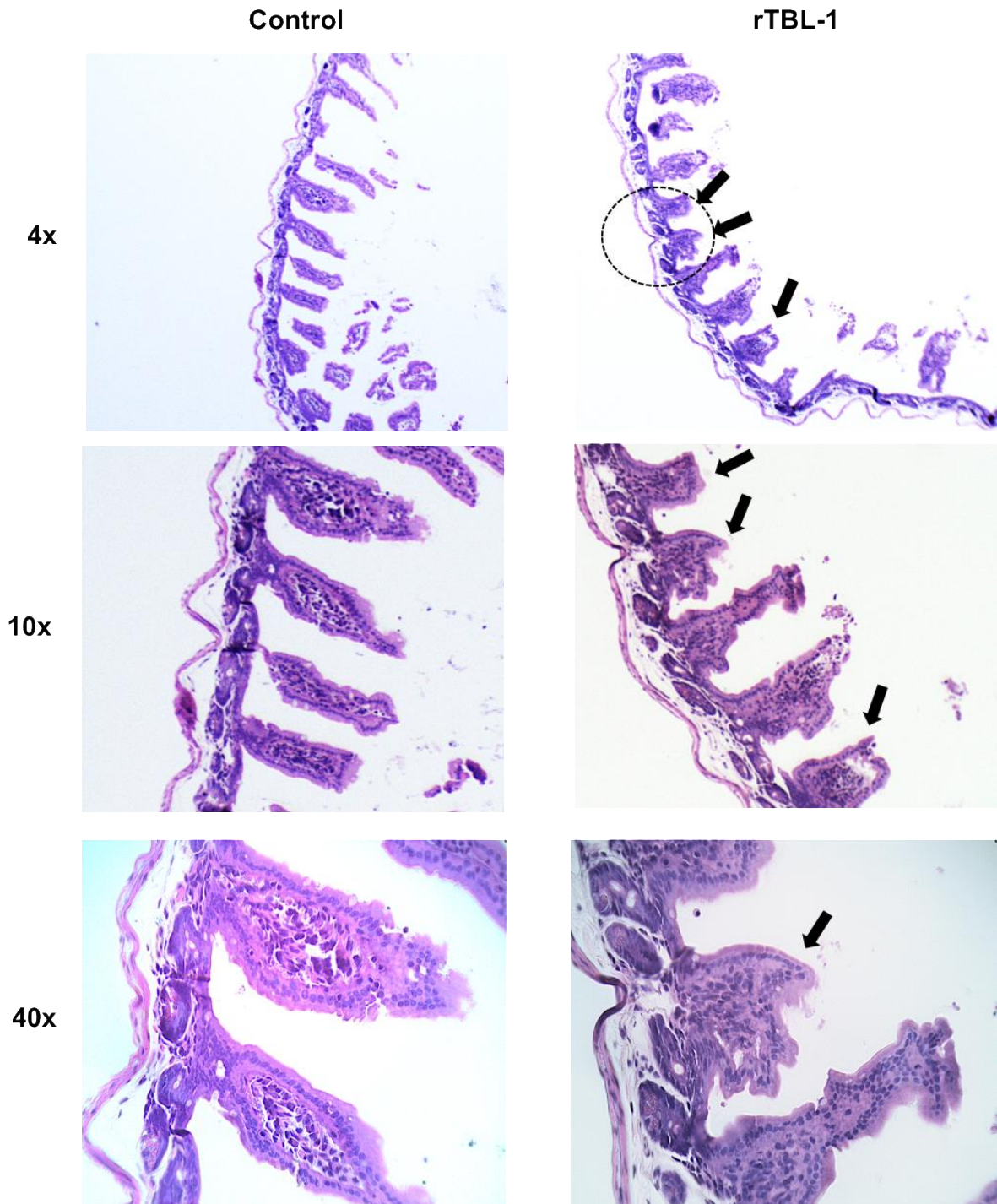


Figura 15. Micrografías representativas de cortes histológicos del yeyuno de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y se muestran a diferentes aumentos. Principal cambio histopatológico: Atrofia de vellosidades (flechas negras).

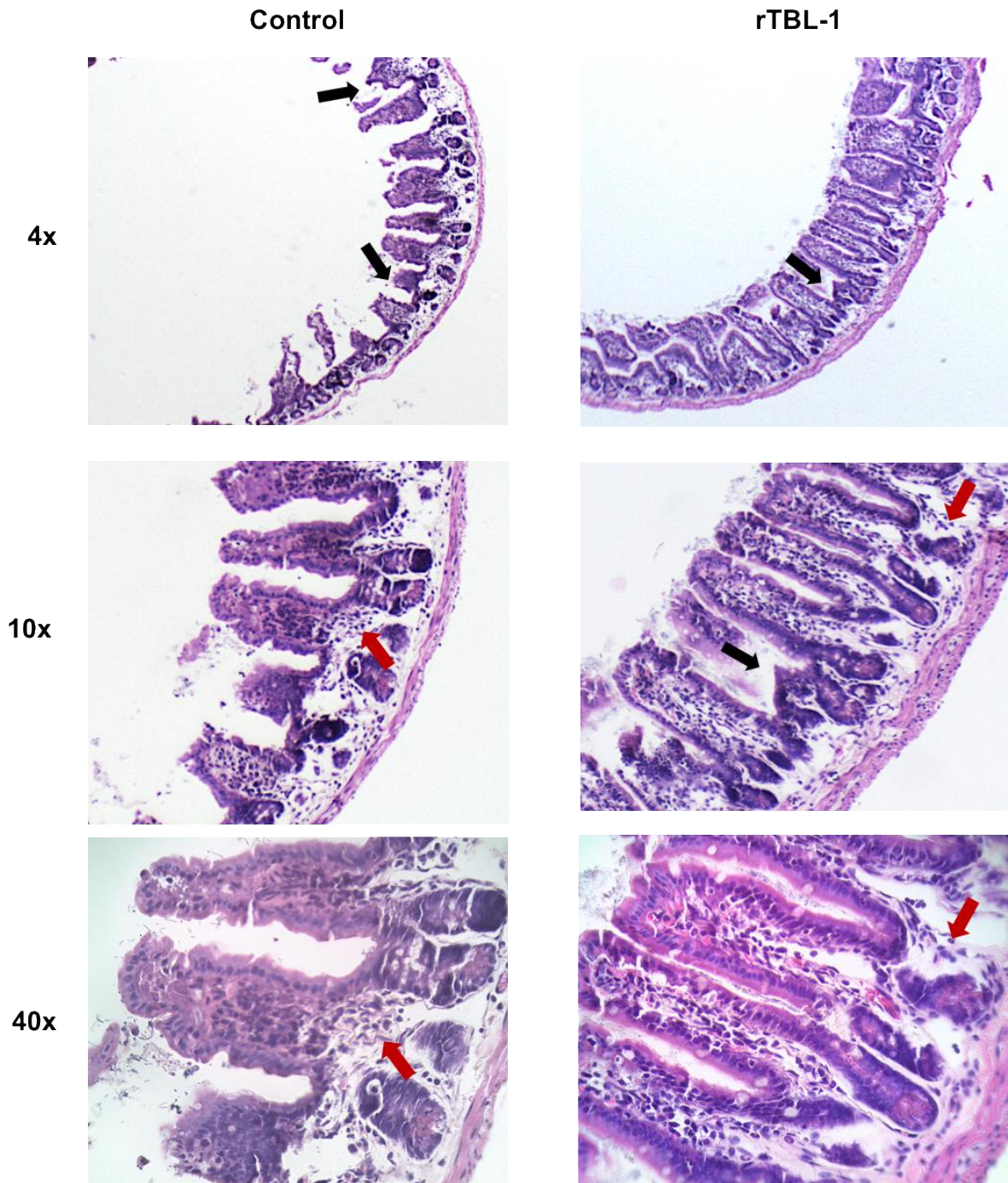


Figura 16. Micrografías representativas de cortes histológicos del íleon de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y se muestran a diferentes aumentos. Principal cambio histopatológico: hipertrofia linfoide (flechas rojas) y atrofia de vellosidades (flechas negras).

Los cortes histológicos para colon se muestran en las **Figuras 16-18**. El colon ascendente de los ratones de ambos grupos se encontró sin cambios histológicos. El colon transversal y descendente de los ratones en tratamiento manifestaron una hiperplasia de placa de Peyer, lo que permite reforzar la premisa de que la rTBL-1 activa sistema inmune. Conjuntamente en el colon descendente mostró atrofia de vellosidades, sin embargo, debido a un barrido por efecto mecánico al momento de manipular la muestra, esta alteración no fue observable en las microfotografías.

Estudios histopatológicos realizados con la TBLF mencionan que, tras su administración, se examina la presencia de tejido colónico inflamado en respuesta a la unión de las lectinas a glicoproteínas o glicolípidos presentes en la membrana intestinal y, que esta unión afecte la capacidad de absorción de nutrientes. También se presencia atrofia en el epitelio con una disminución en el largo de las vellosidades, así como una fusión en las estructuras de los colonocitos (Moreno-Celis y col., 2017; Alatorre-Cruz y col., 2018). Desafortunadamente, en el presente estudio no se llevó a cabo la medición de las vellosidades presentes en el colon, por lo que se propone tomarlo en cuenta para los estudios posteriores de la rTBL-1 y así obtener más información.

En el **Cuadro 7** se muestra un resumen de los principales hallazgos al realizar el análisis microscópico de las muestras de tejido de los órganos de los ratones. Es importante mencionar que, si bien se presentan efectos adversos de la rTBL-1, son en lo general menores a los observados para la TBLF en ratas. Es posible que esta aparente disminución se deba, tanto a la diferencia por especie animal, como a que la rTBL-1 es una lectina única en la fracción proteínica, a diferencia de la TBLF, la cual mostró efectos antinutricionales (Ferriz-Martínez y col., 2015; Alatorre-Cruz y col., 2018; Pita-López y col., 2020) y anticancerígenos (Moreno-Celis y col., 2017; 2020).

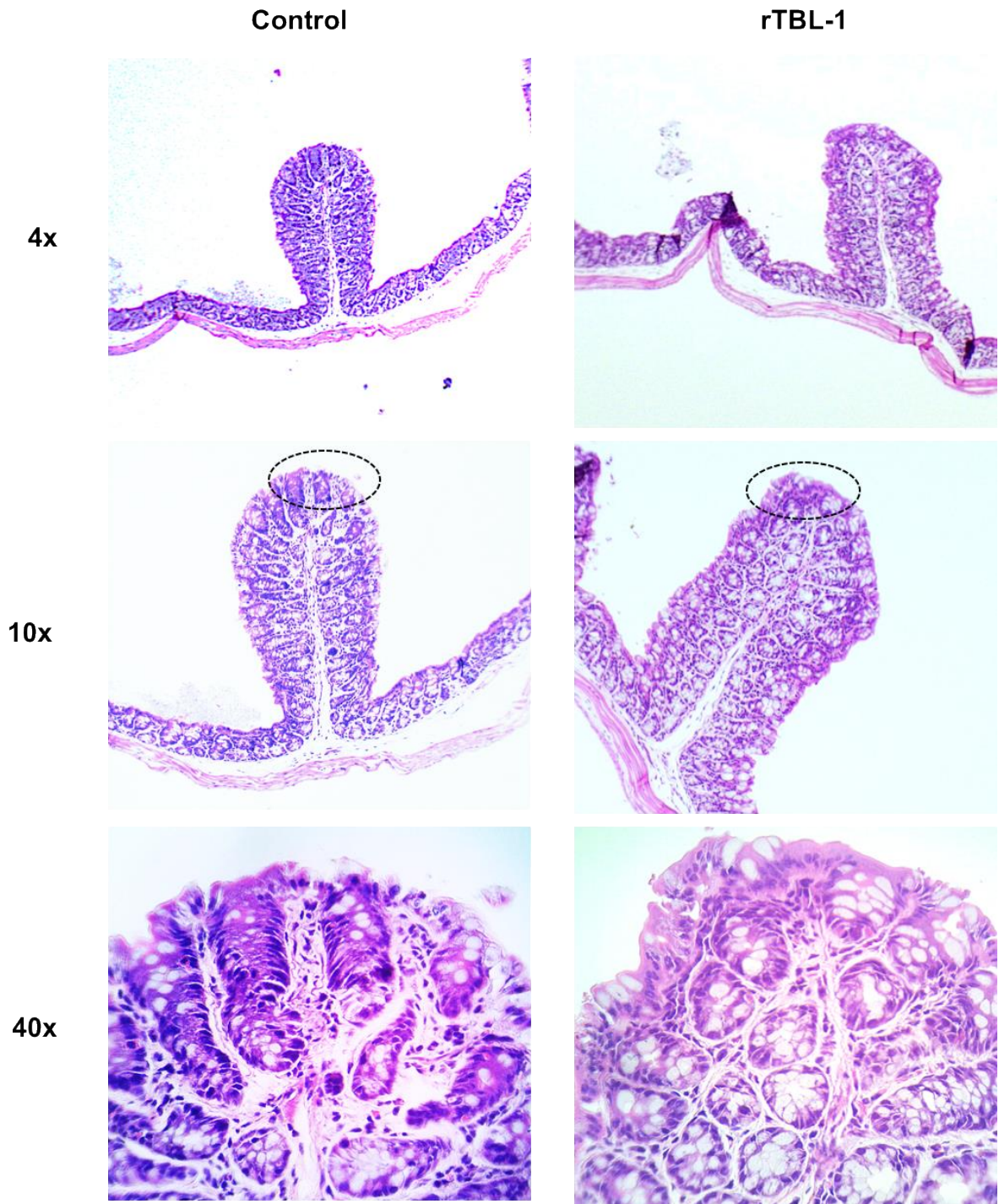


Figura 17. Micrografías representativas de cortes histológicos del colon ascendente de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y se muestran a diferentes aumentos.

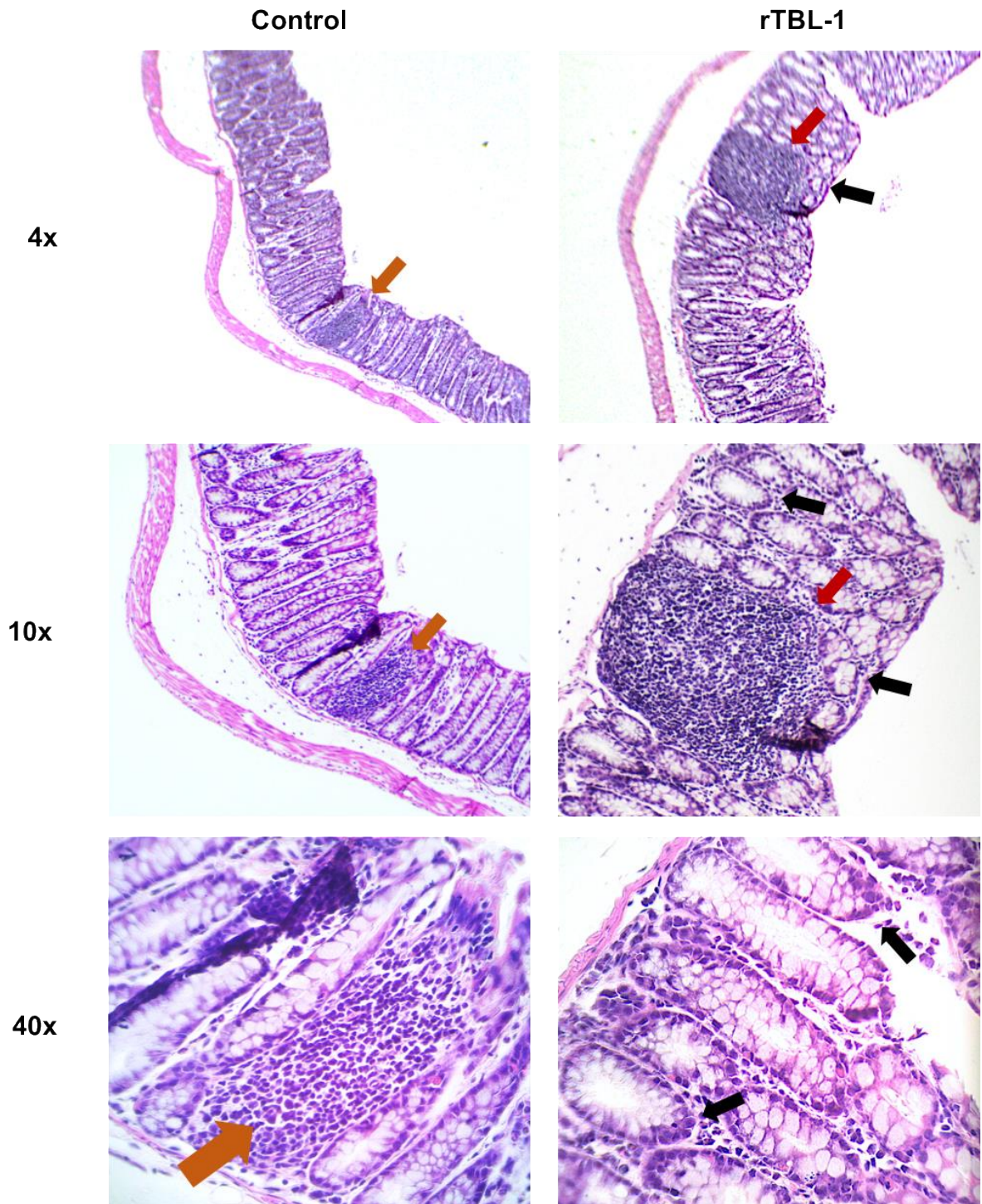


Figura 18. Micrografías representativas de cortes histológicos del colon transverso de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y se muestran a diferentes aumentos.

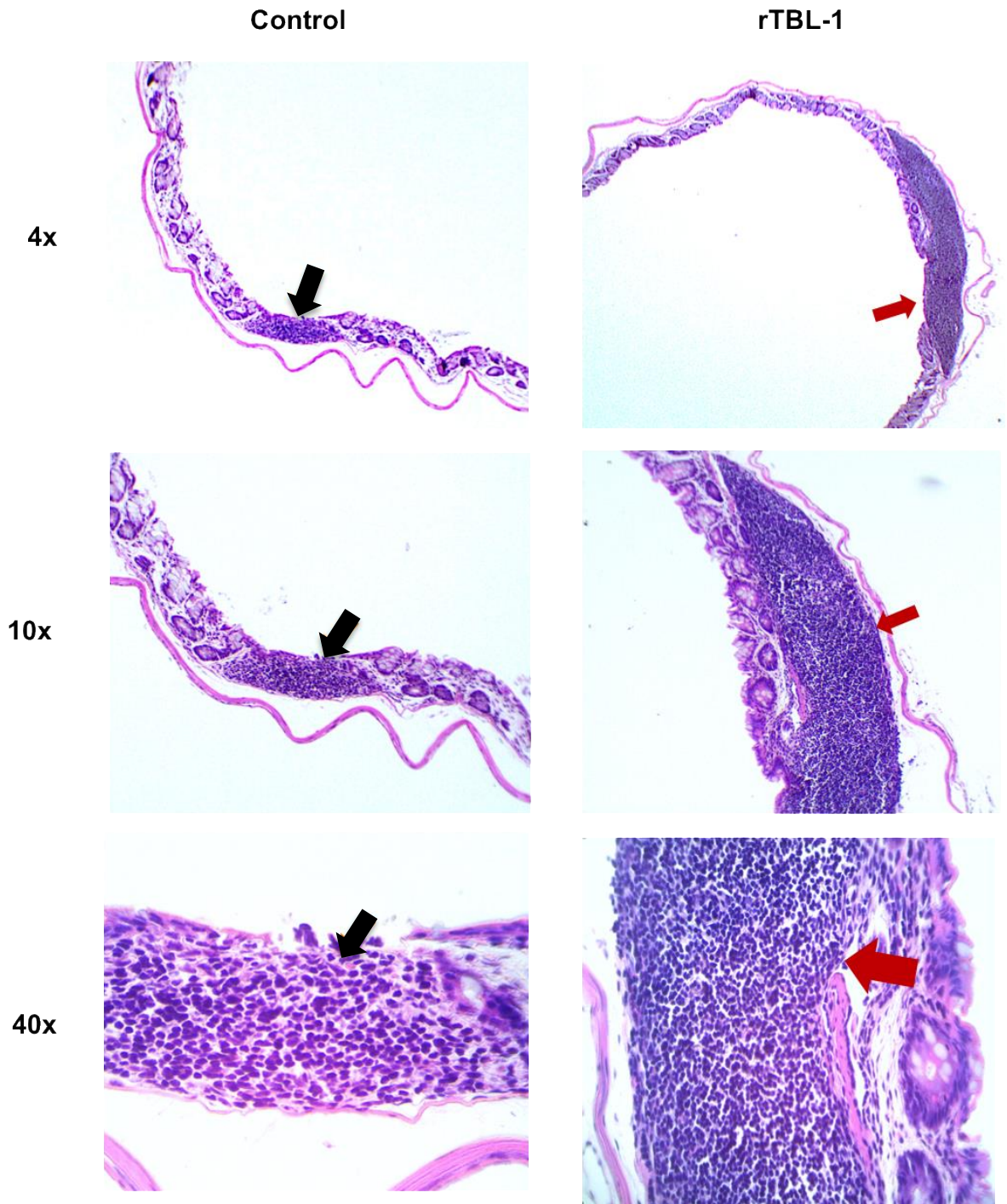


Figura 19. Micrografías representativas de cortes histológicos del colon descendente de ratones tratados con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y se muestran a diferentes aumentos. Principales cambios histológicos: placa de Peyer reactiva (flecha roja) e hiperplasia de placa de Peyer (flechas negras),

Cuadro 7. Evaluación histopatológica de órganos de ratones tratados con rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica

Órgano	Grupo	
	Control	rTBL-1 (30 mg/kg)
Hígado	Congestión (+)	Anisocariosis hepática Células de Kupffer prominentes Cromatina reactiva Esteatosis grasa (++)
Bazo	SCHT	SCHT
Páncreas	SCHT	SCHT
Duodeno	SCHT	Atrofia de vellosidades (+) Hiperplasia linfocitaria en placa de Peyer (+)
Yeyuno	Atrofia de vellosidades (+)	Atrofia de vellosidades (++)
Íleon	Atrofia de vellosidades (+)	Atrofia de vellosidades (++) Tejido linfocitario reactivo
Colon ascendente	SCHT	SCHT
Colon transversal	Hiperplasia de placa de Peyer (+)	SCHT
Colon descendente	Atrofia de vellosidades (+) Hiperplasia de placa de Peyer (+)	Reactividad de placa de Peyer (+)

SCHT: Sin cambios histopatológicos. Escala de intensidad: (+) ligero, (++) moderado (+++) severo (+++++) muy severo.

La rTBL-1 presenta efectos adversos similares a la TBLF como es la atrofia intestinal y el aumento en células linfocitarias locales, pero con menores efectos antinutricionales y de toxicidad. Se conservan los efectos de la activación del sistema inmune, así como su actividad citotóxica (Dena-Beltrán y col., 2023), por lo que se presume que se mantendrá también su actividad anticancerígena. Es necesario realizar un estudio similar al elaborado por Moreno-Celis y col. (2017) para confirmar la actividad sobre cáncer de colon químicamente inducido.

6. CONCLUSIONES

La administración de la rTBL-1 en dosis NOAEL (30 mg/kg) presentó efectos adversos menores en los ratones tratados que los del grupo control demostrando seguridad tras un periodo de administración diario durante 28 días. No obstante, se señala un ligero efecto hepático que, por el tiempo de duración del experimento no se pudo describir a detalle. Se hace la sugerencia que en estudios complementarios como toxicidad crónica se realice en una especie distinta dando énfasis en el perfil de toxicidad hepática para apreciar probables efectos ya que el modelo animal utilizado para este experimento presentó la limitación de un bajo volumen sanguíneo recuperado, lo que no permitió la ejecución de ciertas pruebas bioquímicas, marcadas como ND (no determinado) en las tablas, así como la realización de estudios complementarios.

Se confirma que la rTBL-1 mantiene su actividad por la prevalencia de alteraciones en el epitelio intestinal características de la lectina, principalmente la atrofia intestinal, identificada desde los estudios pasados realizados en la TBLF. Además, no se observaron los efectos adversos descritos en bazo y páncreas que anteriormente presentó la TBLF en ratas. También, se describe la activación del sistema inmune, sugiriendo este comportamiento como uno de los efectos más importantes a nivel sistémico que provoca la administración de la rTBL-1.

7. BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Gallegos, J. A., Ayala-Garay, A. V., Reyes-Muro, L. (2021). El cultivo del frijol presente y futuro para México. Celaya: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

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., López-Herrera, G., Rodríguez-Méndez, A. J., Zamora-Arroyo, A., Gutiérrez-Sánchez, H., De Souza, T. C. 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, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.008>

American Cancer Society. (2018). Treatment of colon cancer, by stage. [Monografía en internet]. American Cancer Society. Consultado el 24 de junio de 2021. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/treating/by-stage-colon.html>

American Cancer Society. (2020). What is colorectal cancer? [Monografía en internet]. American Cancer Society. Consultado el 24 de junio de 2021. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.html#references>

American Cancer Society. (2021). Etapas del cáncer colorrectal. [Monografía en internet]. American Cancer Society. Consultado el 11 de agosto de 2021. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/clasificacion-de-la-etapa.html>

Argiles, G., Taberner, J., Labianca, R., Hochhauser, D., Salazar, R., Iveson, T., Laurent-Puig, P., Quirke, P., Yoshino, T., Taieb, J., Siena, S., Arnold, D. L. (2020). Localised Colon Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 31(10), 1291-1305. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.06.022>

ASCO. (2021a). Colorectal Cancer: Statistics [Monografía en internet]. American Society of Clinical Oncology. Consultado el 6 de enero de 2022. Disponible en: <https://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/statistics>

ASCO. (2021b). Colorectal cancer – types of treatment [Monografía en internet]. American Society of Clinical Oncology. Consultado el 3 de noviembre de 2021. Disponible en: <https://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/types-treatment>

Bantel, H., Engels, I. H., Voelter, W., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S. (1999). Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer research*, 59(9), 2083–2090.

Balderrama-Ocádiz, B. W. (2023). Efecto de la administración oral aguda de lectina recombinante de frijol tépari (rLTB-1) en ratones CD-1 (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Querétaro, México. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/4341>

Balog, C. I. A., Stavenhagen, K., Fung, W. L., Koeleman, C. A. M., McDonnell, L. A., Verhoeven, A., Mesker, W. E., Tollenaar, R. A. E. M., Deelder, A. M., Wuhrer, M. (2012). N-glycosylation of colorectal cancer tissues. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(9), 571-585. <https://doi.org/10.1074/mcp.m111.011601>

Bezsinna, N., De Matos, M. B. C., Walther, J., Heyder, C., Hildebrandt, E., Lenewit, G., Mastrobattista, E., Kok, R. J. (2018). Quantitative analysis of receptor-mediated uptake and pro-apoptotic activity of mistletoe lectin-1 by high content imaging. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20915-y>

Bhutia, S. K., Panda, P. K., Sinha, N., Praharaj, P. P., Bhol, C. S., Panigrahi, D. P., Mahapatra, K. K., Saha, S., Patra, S., Mishra, S., Behera, B. P., Patil, S., Maiti, T. K. (2019). Plant lectins in Cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-

dependent cell death. *Pharmacological Research*, 144, 8-18.

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.04.001>

Bleicher, K. H., Böhm, H. J., Müller, K., Alanine, A. I. (2003). Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nature reviews. Drug discovery*, 2(5), 369–378.

<https://doi.org/10.1038/nrd1086>

Buccafusca, G., Proserpio, I., Tralongo, A. C., Giuliano, S., Tralongo, P. (2019). Early colorectal cancer: diagnosis, treatment and survivorship care. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 136, 20-30.

<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.01.023>

Cagliari, R., Kremer, F. S., Da Silva Pinto, L. (2018). Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 811-820. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.156>

Chang, C. P., Yang, M., Liu, H. S., Lin, Y. S., Lei, H. Y. (2007). Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. *Hepatology*, 45(2), 286-296. <https://doi.org/10.1002/hep.21509>

Chaturvedi, K., Jadhav, S. E., Bhutia, Y. D., Kumar, O., Kaul, R. K., Shrivastava, N. (2015). Purification and dose-dependent toxicity study of abrin in swiss albino male mice. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 61(5), 36–44.

Choi, S., Lyu, S., Park, W. (2004). Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of AKT. *Archives of Pharmacal Research*, 27(1). <https://doi.org/10.1007/bf02980049>

Da Silva, G. J., De Oliveira, A. S., Machado, J. C. B., Ferreira, M. R. A., De Medeiros, P. L., Soares, L. A. L., De Souza, I. A., Paiva, P. M. G., Coelho, L. C. B. B. (2020). Toxicity assessment of saline extract and lectin-rich fraction from *Microgramma vacciniifolia* rhizome. *Toxicon*, 187, 65-74.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.021>

Dena-Beltrán, J. L., Nava, P., Palmerín-Carreño, D., Martínez-Alarcón, D., Moreno-Celis, U., Valle-Pacheco, M., Castro-Guillén, J. L., Blanco-Labra, A., García-Gasca, T. (2023). EGFR and P38MAPK contribute to the apoptotic effect of the recombinant lectin from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) in colon cancer cells. *Pharmaceuticals*, 16(2), 290. <https://doi.org/10.3390/ph16020290>

Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L., Kasi, P. M., Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *The Lancet*, 394(10207), 1467-1480. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)32319-0)

Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., & Vorstenbosch, C. V. D. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 21(1), 15–23. <https://doi.org/10.1002/jat.727>

Estrada-Martínez, L. E., Moreno-Celis, U., Cervantes-Jiménez, R., Ferriz-Martínez, R. A., Blanco-Labra, A., García-Gasca, T. (2017). Plant lectins as medical tools against digestive system cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1403. <https://doi.org/10.3390/ijms18071403>

Ferriz-Martínez, R. A., Torres-Arteaga, Blanco-Labra, A., García-Gasca, T. (2010). The Role of Plant Lectins in Cancer Treatment. En *New approaches in the treatment of cancer* (pp. 71-89). Nova Science Publishers Inc. https://www.researchgate.net/publication/266558821_New_approaches_in_the_treatment_of_cancer

Ferriz-Martínez, R. A., García-García, K., Torres-Arteaga, I., Rodríguez-Méndez, A. J., De Jesús Guerrero-Carrillo, M., Moreno-Celis, U., Angeles-Zaragoza, M. V., Blanco-Labra, A., Gallegos-Corona, M. A., Robles-Álvarez, J., Mendiola-Olaya, E., Andrade-Montemayor, H., García, O., García-Gasca, T. (2015). Tolerability assessment of a lectin fraction from tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally

administered to rats. *Toxicology reports*, 2, 63-69.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.10.015>

Fox, J. G., Barthold, S. W., Davisson, M. T., Newcomer, C. E., Quimby, F. W., Smith, A. L. (2007). *The Mouse in Biomedical Research* (2a edición, Vol. 3). Ámsterdam: Elsevier.

Gámez, R., Más, R. (2007). Reseña analítica de "Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados". *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 38(3), 204-208.

García-Gasca, T., García-Cruz, M., Hernandez-Rivera, E., López-Matínez, J., Castaneda-Cuevas, A. L., Yllescas-Gasca, L., Rodríguez-Méndez, A. J., Mendiola-Olaya, E., Castro-Guillén, J. L., Blanco-Labra, A. (2012). Effects of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) protease inhibitor and semipure lectin fractions on cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 64(8), 1269-1278.
<https://doi.org/10.1080/01635581.2012.722246>

Goldstein, I., Hayes, C. E. (1978). The Lectins: Carbohydrate-Binding Proteins of plants and animals. *En Elsevier eBooks* (pp. 127-340). [https://doi.org/10.1016/s0065-2318\(08\)60220-6](https://doi.org/10.1016/s0065-2318(08)60220-6)

González-Barro, R. J. R., Naves, M. E., Larrea, L. C., Rodríguez, G. S., Almuzara, C. A. (2003). *Inmunología: Biología y patología del sistema inmunitario* (3ra ed.). Panamericana.

González De Mejía, E. G., Del Carmen Valadez-Vega, M., Reynoso-Camacho, R., Loarca-Piña, G. (2005). Tannins, trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) beans. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60(3), 137-145. <https://doi.org/10.1007/s11130-005-6842-0>

Gorelik, E., Galili, U., Raz, A. (2001). On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer metastasis reviews*, 20(3-4), 245-277. <https://doi.org/10.1023/a:1015535427597>

Goyal, V. K., Pandey, S., Kakade, S., Nirogi, R. (2016). Evaluation of clinical chemistry analytes from a single mouse using diluted plasma: effective way to reduce the number of animals in toxicity studies. *Laboratory Animals*, 50(5), 354-361. <https://doi.org/10.1177/0023677215620969>

Gupta, R. C. (2019). Biomarkers in toxicology (2da ed.). Academic Press: Elsevier.

Hakomori S. (1996). Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer research*, 56(23), 5309–5318.

Hara, T., Tsukamoto, I., Miyoshi, M. (1983). Oral toxicity of kintoki bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 29(5), 589-599. <https://doi.org/10.3177/jnsv.29.589>

Heymann, F., Hamesch, K., Weiskirchen, R., Tacke, F. (2015). The Concanavalin a model of acute hepatitis in mice. *Laboratory Animals*, 49(1_suppl), 12-20. <https://doi.org/10.1177/0023677215572841>

Protein Data Bank. (s.f.). rTBL Recombinant Lectin From Tepary Bean. Recuperado de: <https://www.rcsb.org/structure/6TT9>

INEGI. (2021). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. [Monografía de internet]. Comunicado de prensa. No. 105/21. Consultado el 24 de octubre de 2021. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_NaI.pdf

International Agency for Research on Cancer. (2020). Cancer today [Monografía en internet]. World Health Organization. Consultado el 11 de agosto de 2021. Disponible en: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&populati

[on_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0](#)

Ishiguro, M., Matori, Y., Tanabe, S., Kawase, Y., Sekine, I., Sakakibara, R. (1992). Biochemical studies on oral toxicity of ricin. V. The role of lectin activity in the intestinal absorption of ricin. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 40(5), 1216–1220. <https://doi.org/10.1248/cpb.40.1216>

Jaeckel, E., Hardtke-Wolenski, M., Fischer, K. (2011). The benefit of animal models for autoimmune hepatitis. *Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology*, 25(6), 643-651. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2011.10.006>

Jiménez, P., Gayoso, M. J., Tejero, J., Cabrero, P., Cordoba-Diaz, D., Basterrechea, J. E., Girbés, T. (2013). Toxicity in mice of Lectin ebulin F present in dwarf elderberry (*Sambucus ebulus* L.). *Toxicon*, 61, 26-29. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.10.009>

Kim, W. H., Park, W., Gao, B., Jung, M. H. (2004). Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe Lectin-Induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Molecular Pharmacology*, 66(6), 1383-1396. <https://doi.org/10.1124/mol.104.001347>

Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A. M., Vázquez-Moreno, L. (2017). Legume lectins: proteins with diverse applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1242. <https://doi.org/10.3390/ijms18061242>

Leal, R. B., Pinto-Junior, V. R., Da Silva Osterne, V. J., Wolin, I. A., Nascimento, A. L. T. O., Neco, A. H. B., Araripe, D. A., Welter, P. G., Neto, C. C., Correia, J., Rocha, C. R. C., Nascimento, K. S., Cavada, B. S. (2018). Crystal structure of DLYL, a mannose-specific lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. ex benth seeds that display cytotoxic effects against C6 glioma cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 64-76. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.080>

Li, C., Chen, J., Lu, B., Shi, Z., Wang, H., Zhang, B., Zhao, K., Qi, W., Bao, J., Wang, Y. (2014). Molecular switch role of AKT in polygonatum odoratum Lectin-Induced apoptosis and autophagy in human Non-Small Cell Lung Cancer A549 cells. *PLOS ONE*, 9(7), e101526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101526>

Liu, B., Li, C., Bian, H., Min, M., Chen, L., Bao, J. (2009a). Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of concanavalin A on human melanoma A375 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 482(1-2), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.12.003>

Liu, B., Peng, H., Yao, Q., Li, J., Van Damme, E. J., Balzarini, J., Bao, J. (2009b). Bioinformatics analyses of the mannose-binding lectins from Polygonatum cyrtonema, Ophiopogon japonicus and Liparis novversa with antiproliferative and apoptosis-inducing activities. *Phytomedicine*, 16(6-7), 601-608. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.010>

Liu, B., Cheng, Y., Bian, H. J., Bao, J. K. (2009c). Molecular mechanisms of Polygonatum cyrtonema lectin-induced apoptosis and autophagy in cancer cells. *Autophagy*, 5(2), 253–255. <https://doi.org/10.4161/auto.5.2.7561>

Liu, B., Wu, J., Li, J., Liu, J. G., Li, W., Li, C., Xu, H., Bao, J. (2010). Polygonatum cyrtonema lectin induces murine fibrosarcoma L929 cell apoptosis and autophagy via blocking RAS–RAF and PI3K–AKT signaling pathways. *Biochimie*, 92(12), 1934-1938. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.08.009>

Liu, T., Wu, L., Wang, D., Wang, H., Chen, J., Yang, C., Bao, J., Wu, C. (2016). Role of reactive oxygen species-mediated MAPK and NF-KB activation in polygonatum cyrtonemalectin-induced apoptosis and autophagy in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Journal of Biochemistry*, 160(6), 315-324. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw040>

López-Sánchez, C. (2008). Estudio sobre la toxicidad aguda y subcrónica vía oral de una lectina de frijol Tépari (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Querétaro. Disponible en: <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/689>

López-Sánchez, C., López-Martínez, F. J., Castañeda-Cuevas, A. L., Yllescas-Gasca, L., Ferriz-Martínez, R. A., Torres-Arteaga, I. C., García-Gasca, T. (2010). Evaluation of the toxicity in vitro and in vivo of lectins of Tepary Bean. *Ciencia@uaq*, 3, 3-13. https://www.uaq.mx/investigacion/revista_ciencia@uaq/ArchivosPDF/v3-n1/Evaluacion.pdf

Lyu, S., Choi, S., Park, W. (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>

Madingou, N., Traoré, A., Souza, A., Mounanga, M., Samseny, R. R. A., Ouedraogo, S., Traore, A. S. (2016). Preliminary studies of acute and sub-chronic toxicity of the aqueous extract of *Guibourtia tessmannii* (Harms) J. Leonard Stem barks (Caesalpinaceae) in mice and rats. *Asian pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(6), 506-510. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.04.001>

Mármol, I., Sánchez-De-Diego, C., Dieste, A. P., Cerrada, E., Yoldi, M. J. R. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and future Perspectives in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 197. <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>

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-Aviles, A., Espinoza-Núñez, A., Jamaica, L., Cruz-Hernández, A., Rodríguez-Torres, A., Castro-Guillén, 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*, 306, 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., García-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>

Matthews, H., Hanison, J., Nirmalan, N. (2016). “OmicS”-Informed Drug and Biomarker Discovery: Opportunities, challenges and Future Perspectives. *Proteomes*, 4(3), 28. <https://doi.org/10.3390/proteomes4030028>

Mazalovska, M., Kouokam, J. C. (2020). Plant-Derived Lectins as potential cancer therapeutics and diagnostic tools. *BioMed Research International*, 2020, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2020/1631394>

Moreno-Celis, U., Lopez-Martinez, J., Blanco-Labra, A., Cervantes-Jiménez, R., Estrada-Martínez, L. E., García-Pascalín, A. E., De Jesús Guerrero-Carrillo, M., Rodríguez-Méndez, A. J., Mejía, C., Ferriz-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>

Moreno-Celis, U., López-Martínez, F. J., Cervantes-Jiménez, R., Ferriz-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>

Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W., Weil, P. A. (2012). Harper bioquímica ilustrada (29ª ed.). México D.F: McGraw-Hill Education.

Nascimento, K. S., Santiago, M. Q., Pinto-Junior, V. R., Da Silva Osterne, V. J., Martins, F., Nascimento, A. L. T. O., Wolin, I. A., Heinrich, I. A., Da Silva Martins, M. M. F. P., Silva, M. S., Lossio, C. F., Rocha, C. R. C., Leal, R. B., Cavada, B. S. (2017). Structural analysis of dioclea lasiocarpa lectin: A C6 cells apoptosis-inducing protein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 92, 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.09.014>

Nascimento, A. L. T. O., Knaut, J. L., Rieger, D. K., Wolin, I. A., Heinrich, I. A., Mann, J., Juarez, A. V., Del Valle Sosa, L., De Paul, A. L., Moreira, C. G., Silva, I. B., Nobre, C. A. S., Da Silva Osterne, V. J., Nascimento, K. S., Cavada, B. S., Leal, R. B. (2018). Anti-glioma properties of DVL, A lectin purified from Dioclea violacea. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 566-577. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.106>

Nascimento, A. L. T. O., Wolin, I. A., Welter, P. G., Heinrich, I. A., Zanotto-Filho, A., Da Silva Osterne, V. J., Lossio, C. F., Silva, M. S., Nascimento, K. S., Cavada, B. S., Leal, R. B. (2019). Lectin from Dioclea violacea induces autophagy in U87 glioma cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 660-672. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.203>

Newman, D., Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770-803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

NOM-087-ECOL-SSA1-2002. (2002). Protección ambiental-Salud ambiental-Requisitos sanitarios que deben observarse en los establecimientos dedicados al manejo integral de residuos peligrosos. México: Secretaría de Salud.

NOM-062-ZOO-1999. (1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial. 2001.

OECD. (2008). Test no. 407: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. OECD Publishing.

PAHO. Pan American Health Organization. (2020). Mexico burden of cancer [Monografía en internet]. Washington, D.C. World Health Organization. Consultado el 24 de junio de 2021. Disponible en: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=4-cancer-country-profiles-2020&alias=51536-mexico-cancer-profile-2020&Itemid=270&lang=es

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>

Percy, D. H., Barthold, S. W. (2007). Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits (3ra ed.). Blackwell Publishing.

Peumans, W., Van Damme, E. J. M. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109(2), 347-352. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.347>

Pinho, S. S., Reis, C. A. (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, 15(9), 540-555. <https://doi.org/10.1038/nrc3982>

Pita-López, W., Gomez-Garay, M., Blanco-Labra, A., Aguilera-Barreyro, A., Souza, T. C. R., Olvera-Ramírez, A. M., Ferriz-Martínez, R. A., García-Gasca, T. (2020). Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) lectin fraction provokes reversible adverse effects on rats' digestive tract. *Toxicology Research*, 9(5), 714-725. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa062>

Pratt, J., Roy, R., Annabi, B. (2012). Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. *Glycobiology*, 22(9), 1245-1255. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws093>

Quesenberry, K. E., Carpenter, J. W. (2012). Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery (3ra ed.). Elsevier.

Repetto-Jiménez, M., Repetto-Khunn, G. (2009). Toxicología Fundamental (4ta ed.). Sevilla: Díaz de Santos.

Reynoso-Camacho, R., De Mejía, E. G., Loarca-Piña, G. (2003). Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food and Chemical Toxicology*, 41(1), 21-27. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(02\)00215-6](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(02)00215-6)

Rios-Ortiz, M. (2022). Evaluación toxicológica de una lectina recombinante de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) en ratas Sprague Dawley (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Querétaro, México. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/8218>

Roy, B., Pattanaik, A. K., Das, J., Bhutia, S. K., Behera, B., Singh, P., Maiti, T. K. (2014). Role of PI3K/AKT/MTOR and MEK/ERK pathway in concanavalin an induced autophagy in HELA cells. *Chemico-Biological Interactions*, 210, 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.01.003>

Schötterl, S., Huber, S. M., Lentzen, H., Mittelbronn, M., Naumann, U. (2018). Adjuvant therapy using mistletoe containing drugs boosts the T-Cell-Mediated killing of glioma cells and prolongs the survival of glioma bearing mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2018/3928572>

Serfilippi LM, Pallman DR, Russell B. Serum clinical chemistry and hematology reference values in outbred stocks of albino mice from three commonly used vendors and two inbred strains of albino mice. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2003;42(3):46-52.

Shlyakhtina, Y., Moran, K. J., Portal, M. M. (2021). Genetic and Non-Genetic Mechanisms underlying cancer evolution. *Cancers*, 13(6), 1380. <https://doi.org/10.3390/cancers13061380>

Sindhura, B., Hegde, P., Chachadi, V. B., Inamdar, S. R., Swamy, B. M. (2017). High mannose n-glycan binding lectin from *Remusatia vivipara* (RVL) limits cell growth, motility and invasiveness of human breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 654-665. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.081>

Takamoto, S., Nakamura, K., Yoneda, M., Makino, I. (2003). Gender-related differences in concanavalin A-induced liver injury and cytokine production in mice. *Hepatology Research*, 27(3), 221-229. [https://doi.org/10.1016/s1386-6346\(03\)00263-8](https://doi.org/10.1016/s1386-6346(03)00263-8)

Thanikachalam, K., Khan, G. N. (2019). Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients*, 11(1), 164. <https://doi.org/10.3390/nu11010164>

Torres-Arteaga, I., Guillen, J. L. C., 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). <https://doi.org/10.4172/2168-958x.1000117>

Tsaneva, M. T., Van Damme, E. J. (2020). 130 years of plant lectin research. *Glycoconjugate Journal*, 37(5), 533-551. <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09942-y>

Umscheid, C. A., Margolis, D. J., Grossman, C. E. (2011). Key Concepts of Clinical Trials: A Narrative review. *Postgraduate Medicine*, 123(5), 194-204. <https://doi.org/10.3810/pgm.2011.09.2475>

Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct. *Glycobiology*, 3(2), 97-130. <https://doi.org/10.1093/glycob/3.2.97>

Vega-Rojas, L. J., Campos-Vega, R., Mosqueda, J., Palmerín-Carreño, D., Escobedo-Reyes, A., Blanco-Labra, A., Escobar-García, K., García-Gasca, T. (2021).

Bioaccessibility and in vitro intestinal permeability of a recombinant lectin from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) using the everted intestine assay. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1049. <https://doi.org/10.3390/ijms22031049>

WHO. World Health Organization. (2021). Cancer [Monografía en internet]. World Health Organization. Consultado el 17 de enero de 2022. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Yang, Y., Xu, H., Zhang, Z., Liu, J. G., Li, W., Ming, H., Bao, J. (2011). Characterization, molecular cloning, and in silico analysis of a novel mannose-binding lectin from *Polygonatum odoratum* (Mill.) with anti-HSV-II and apoptosis-inducing activities. *Phytomedicine*, 18(8-9), 748-755. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.11.001>

8. ANEXOS

Anexo 1. Etapas del cáncer de colon.

Etapa AJCC	Agrupamiento para establecer etapa	Descripción de la etapa
0	Tis, N0, M0	El cáncer se encuentra en su etapa más temprana. Esta etapa también se conoce como carcinoma <i>in situ</i> o carcinoma intramucoso (Tis). No ha crecido más allá de la capa interna (mucosa) del colon o del recto.
I	T1 o T2, N0, M0	El cáncer ha crecido a través de la capa muscular de la mucosa (<i>muscularis mucosae</i>) hasta la submucosa (T1), y también es posible que haya crecido hasta la muscular propia (T2). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IIA	T3, N0, M0	El cáncer ha crecido hacia las capas más externas del colon o del recto, pero no ha atravesado estas capas (T3). No ha alcanzado órganos adyacentes. No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IIB	T4a, N0, M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto, pero no ha crecido hacia otros tejidos u órganos adyacentes (T4a). El cáncer aún no se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0) ni a sitios distantes (M0).
IIC	T4b, N0, M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto y está unido o crece hacia otros tejidos u órganos adyacentes (T4b). El cáncer aún no se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0) ni a sitios distantes (M0).
IIIA	T1, N1/N1c, M0	El cáncer ha crecido a través de la mucosa hasta la submucosa (T1) y también es posible que haya crecido hasta la muscular propia (T2). Se propagó a entre 1 y 3 ganglios linfáticos adyacentes (N1) o hacia áreas de grasa cercanas a los ganglios linfáticos, pero no a los ganglios en sí (N1c). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	T1, N2a, M0	El cáncer ha atravesado la mucosa hasta la submucosa (T1). De 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos están afectados por la propagación del cáncer (N2a). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
IIB	T2 o T3, N2a, M0	El cáncer ha crecido hacia la muscular propia (T2) o hacia las capas más externas del colon o del recto (T3). De 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos están afectados por la propagación del cáncer (N2a). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	T1 o T2, N2b, M0	El cáncer ha crecido a través de la mucosa hasta la submucosa (T1) y también es posible que haya crecido hasta la muscular propia (T2). Se propagó a siete o más

		ganglios linfáticos adyacentes (N2b). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
IIIC	T4a, N2a, M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto (incluyendo el peritoneo visceral), pero no ha alcanzado los órganos adyacentes (T4a). De 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos están afectados por la propagación del cáncer (N2a). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	T3 o T4, N2b, M0	El cáncer ha crecido hacia las capas más externas del colon o del recto (T3), o a través del peritoneo visceral (T4a), pero no ha alcanzado los órganos adyacentes. Se propagó a siete o más ganglios linfáticos adyacentes (N2b). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	T4B, N1 o N2, M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto y está unido o crece hacia otros tejidos u órganos adyacentes (T4b). Se propagó por lo menos a un ganglio linfático cercano o hacia áreas de grasa cercanas a los ganglios linfáticos (N1 o N2). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
IVA	Cualquier T, Cualquier N, M1a	El cáncer pudo o no haber crecido a través de la pared del colon o del recto (Cualquier T). Podría o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes. (Cualquier N). El cáncer se propagó a un órgano distante (tal como el hígado o el pulmón) o a un grupo de ganglios linfáticos distantes, pero no se ha propagado a partes distantes del peritoneo (el revestimiento de la cavidad abdominal) (M1a).
IVB	Cualquier T, Cualquier N, M1b	El cáncer pudo o no haber crecido a través de la pared del colon o del recto (Cualquier T). Podría o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (Cualquier N). El cáncer se propagó a más de un órgano distante (tal como el hígado o el pulmón) o a un grupo de ganglios linfáticos distantes, pero no se ha propagado a partes distantes del peritoneo (el revestimiento de la cavidad abdominal) (M1b).
IVC	Cualquier T, Cualquier N, M1c	El cáncer pudo o no haber crecido a través de la pared del colon o del recto (Cualquier T). Podría o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (Cualquier N). Se ha propagado a partes distantes del peritoneo (el revestimiento de la cavidad abdominal) y puede o no haberse propagado a órganos o a ganglios linfáticos distantes (M1c).

American Cancer Society, 2021.

**Anexo 2. Tabla Valores de Referencia Bioquímicos Ratones CD-1
(Charles-Rivers)**

Analito	Unidades	Machos	Hembras
Bioquímicos			
ALT	IU/L	45.08 ± 16.11	41.63 ± 13.91
AST	IU/L	80.55 ± 67.29	82.80 ± 39.85
ALP	IU/L	154.63 ± 50.03	156.54 ± 51.10
LDH	ND	ND	ND
Proteínas totales	g/dL	5.38 ± 0.95	5.23 ± 1.13
Albumina	g/dL	2.99 ± 0.62	2.95 ± 0.96
Colesterol	mg/dL	164.89 ± 27.95	133.15 ± 25.34
Triglicéridos	mg/dL	192.40 ± 66.72	284.05 ± 100.74
Creatinina	mg/dL	11.30 ± 0.60	10.73 ± 2.19
Urea	mg/dL	14.68 ± 3.99	12.80 ± 3.81
Amilasa	ND	ND	ND
Hematológicos			
WCB	K/μL	8.79 ± 2.54	8.77 ± 2.95
RBC	M/μL	8.93 ± 1.37	8.78 ± 1.12
HGB	g/dL	14.67 ± 2.21	14.55 ± 2.05
HCT	%	49.97 ± 7.67	49.43 ± 6.70
MCV	fL	56.10 ± 4.59	56.39 ± 3.75
MCH	Pg	16.45 ± 0.97	16.59 ± 1.09
MCHC	g/dL	29.50 ± 2.76	29.52 ± 2.65
RDW	%	16.79 ± 0.96	16.62 ± 1.09
PLT	K/μL	1528.88 ± 400.63	1383.53 ± 528.53

*Animales sin ayuno. ND: No disponible.

**Anexo 3. Tabla Valores de Referencia Bioquímicos Ratones CD-1
(Envigo)**

Analito	Unidades	Machos	Hembras
Bioquímicos			
ALT	IU/L	61.7 ± 24.1	58.9 ± 24.6
AST	IU/L	75.4 ± 29.3	88.4 ± 33.3
ALP	IU/L	82.7 ± 24.0	142.8 ± 33.33
LDH	ND	ND	ND
Proteínas totales	g/dL	5.4 ± 0.3	5.2 ± 0.2
Albúmina	g/dL	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1
Colesterol	mg/dL	138.9 ± 24.5	104.7 ± 20.3
Triglicéridos	mg/dL	ND	ND
Creatinina	mg/dL	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Urea	mg/dL	18.7 ± 2.3	19.8 ± 2.7
Amilasa	ND	ND	ND
HEMATOLÓGICOS			
WCB	K/uL	7.3 + 2.5	7.5 + 2.5
RBC	M/uL	9.2 + 0.8	9.4 + 0.7
HGB	M/uL	15.4 + 1.2	15.6 + 1.2
HCT	%	51.5 + 4.3	51.8 + 4.0
MCV	fL	55.9 + 1.9	55.4 + 1.8
MCH	pg	16.7 + 0.5	16.7 + 0.5
MCHC	g/dL	29.8 + 0.4	30.2 + 0.7
BASÓFILOS	%	0.1 + 0.1	0.1 + 0.1
NEUTRÓFILOS	%	12.0 + 3.9	11.2 + 3.5
LINFOCITOS	%	83.1 + 5.3	83.8 + 3.6
MONOCITOS	%	2.9 + 2.0	2.4 + 1.2
EOSINÓFILOS	%	1.9 + 0.7	2.5 + 1.2

Animales sin ayuno. ND: No disponible

**Anexo 4. Tabla Valores de Referencia Bioquímicos Ratones Swiss Albino
(Goyal y col., 2016)**

Analito	Unidades	Machos	Hembras
Bioquímicos			
ALT	IU/L	45.83±9.75	43.83±14.48
AST	IU/L	122.83±68.91	117.33±39.54
ALP	IU/L	185.17±25.15	221.50±10.33
LDH	ND	ND	ND
Proteínas totales	g/dL	5.38±0.19	5.20±0.28
Albúmina	g/dL	2.55±0.18	2.55±0.23
Colesterol	mg/dL	150.50±27.31	133.17±15.46
Triglicéridos	mg/dL	173.00±90.22	136.17±50.86
Creatinina	mg/dL	0.47±0.10	0.46±0.07
Urea	mg/dL	36.17±3.66	31.33±6.02
Amilasa	ND	ND	ND

ND: No disponible.

**Anexo 5. Tabla Valores de Referencia Bioquímicos Ratones CD-1
(Serfilippi y col., 2003)**

Analito	Unidades	Machos	Hembras
BIOQUÍMICOS			
ALT	IU/L	41 ± 12.6	29 ± 6.1
AST	IU/L	53 ± 10.8	59 ± 8.7
ALP	IU/L	58 ± 16.2	82 ± 21.3
LDH	ND	ND	ND
Proteínas totales	g/dL	5.5 ± 0.26	5.7 ± 0.23
Albúmina	g/dL	3.5 ± 0.22	3.9 ± 0.17
Colesterol	mg/dL	155 ± 24.3	108 ± 19.5
Triglicéridos	mg/dL	111 ± 27.3	107 ± 43.5
Creatinina	mg/dL	0.3 ± 0.07	0.4 ± 0.05
Urea	mg/dL	24 ± 2.5	17 ± 1.8
Amilasa	ND	ND	ND

Animales sin ayuno. ND: No disponible.