



**Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana**

**Evaluación del mecanismo de acción de una lectina recombinante del frijol  
Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células de cáncer de colon**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

**Presenta:**

Q.B.P. JOSÉ LUIS DENA BELTRÁN

**Dirigido por:**

DRA. MARGARITA TERESA DE JESÚS GARCÍA GASCA

**SINODALES**

Dra. Margarita Teresa de Jesús Teresa García Gasca  
Presidente

Dr. Alejandro Blanco Labra  
Secretario

M. en C. Dania Martínez Alarcón  
Sinodal

Dr. Ulisses Moreno Celis  
Sinodal

Dra. Dulce María Palmerín Carreño  
Sinodal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Enero 2020  
México

## RESUMEN

La fracción concentrada de lectinas (FCL) extraída a partir del frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) ha mostrado efecto citotóxico diferencial a través de apoptosis sobre células de cáncer de colon. Asimismo, es capaz de inhibir la tumorigenesis temprana en colon con baja toxicidad y buena tolerabilidad. Sin embargo, su purificación presenta bajos rendimientos, altos costos y tiempo de obtención, por lo que se generó una lectina recombinante (Lr) utilizando la levadura *Pichia pastoris*. El objetivo del presente trabajo fue comparar los efectos citotóxicos de la FCL y Lr sobre el ciclo celular, apoptosis y necrosis, así como el mecanismo de acción de la Lr sobre células de cáncer de colon por la posible interacción con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Los resultados mostraron que la Lr presenta citotoxicidad similar a la FCL mediante inducción de apoptosis dependiente de caspasas en células de cáncer de colon. Se observó arresto en la fase G0/G1 y disminución de la fase S del ciclo celular. Se utilizaron células de cáncer de colon SW-480, que sobreexpresan el EGFR, para determinar el mecanismo de acción. Los efectos apoptóticos se corroboraron en esta línea celular al determinar la activación de PARP, HA2X y p-53. El mecanismo de acción está relacionado con la interacción con el EGFR mediante su fosforilación y eventual degradación, efecto que desencadena la activación de proteínas proapoptóticas como p38 y la disminución de Akt. La participación del EGFR fue comprobada utilizando células CHO-K1, las cuales no expresan el EGFR, y en donde la exposición a Lr no indujo apoptosis. Los resultados obtenidos aportan información fundamental sobre el efecto citotóxico de la Lr y su mecanismo de acción por la interacción con uno de los blancos terapéuticos de cáncer de colon. Futuros estudios se enfocarán en determinar la toxicidad *in vivo* de la Lr así como su efecto en cáncer de colon inducido en ratas.

**Palabras clave:** apoptosis, cáncer de colon, citotoxicidad, EGFR, frijol Tépari, lectina recombinante.

## SUMMARY

The concentrated lectin fraction (FCL) extracted from the Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) has shown differential cytotoxic effect through apoptosis on colon cancer cells. It is also able to inhibit early tumorigenesis in the colon with low toxicity and good tolerability. However, its purification is an expensive and slow process that provides low yields. Therefore, a recombinant lectin (Lr) was generated using *Pichia pastoris* yeast. The objective of this work was to compare the cytotoxic effects of FCL and Lr on the cell cycle, apoptosis and necrosis, as well as the mechanism of action of Lr on colon cancer cells by the possible interaction with the epidermal growth factor receptor (EGFR). The results showed that Lr exhibits cytotoxicity similar to FCL by induction of caspase-dependent apoptosis in HT-29 colon cancer cells. Arrest was observed in the G0/G1 phase and decrease in the S phases of the cell cycle. SW-480 colon cancer cells, which overexpress EGFR, were used to determine the mechanism of action. Apoptotic effects were corroborated in this cell line when determining the activation of PARP, HA2X and p-53. The mechanism of action is related to the interaction with EGFR through its phosphorylation and eventual degradation, an effect that triggers the activation of proapoptotic proteins such as p38 and the decrease of Akt. The participation of EGFR was confirmed using CHO-K1 cells, which do not express EGFR, and where the exposure to Lr did not induce apoptosis. The obtained results provide fundamental information about the cytotoxic effect of Lr and its mechanism of action by interaction with one of the therapeutic targets used in colon cancer. Future studies will focus on determining the *in vivo* toxicity of Lr, as well as its effect on induced colon cancer in rats.

**Key words:** apoptosis, colon cancer, cytotoxicity, EGFR, recombinant lectin, Tepary bean.

## DEDICATORIAS

*Este trabajo está dedicado a mi familia, por su apoyo incondicional y enseñanza de que la constancia y entrega nos trae la mejor recompensa. La esencia de mi vida no sería la misma sin sus enseñanzas; el carácter de todo lo puedo y ser perseverante para no desistir aún ante las adversidades.*

*Gracias José Luis y Lorena.*

Dirección General de Bibliotecas UNQ

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT por el apoyo económico tanto en la beca de maestría como el apoyo para la estancia de investigación.

A FOPER-UAQ 2019-01069 por el financiamiento para cumplir con el proyecto.

Al Dr. Porfirio Nava y a su grupo de trabajo (M. en C. Aurora, Dra. Carolina y Dra Sandy) que formaron parte esencial del presente trabajo y me devolvieron la pasión, a su manera, por la investigación durante mi estancia en el CINVESTAV-Zacatenco.

Agradecimientos al comité sinodal por sus valiosas aportaciones:

Dra. Teresa García Gasca por compartir su conocimiento y creer en mí para la elaboración de dicho proyecto. Aún más gracias por dejarme formar parte de su grupo de trabajo, que sin duda ha sido una gran experiencia conmovedora.

Dr. Alejandro Blanco y Dr. Ulisses Moreno, por sus contribuciones tan valiosas y consejos tanto de aspectos técnicos como de la misma realización de esta tesis.

Dra. Dulce Palmerín, gracias por enseñarme que la constancia en el trabajo, respeto y puntualidad son claves para el éxito personal y profesional. Sobre todo, por recordarme la dicha de que un investigador aún conserva un niño con una curiosidad infinita por descubrir.

M. en C. Dania Martínez, gracias por tus enseñanzas, transmitir y mostrarme que aún existen personas altamente apasionadas por la investigación, que, si quiero algo, debo intentarlo hasta el final. Total, no se pierde nada y se puede ganar mucho.

A mis amigos del laboratorio, por su valiosa amistad y ocurrencias tan divertidas durante este tiempo: Josué López, Paola García, Gloria Casique.

Dr. Napoleón Navarro Tito por dejarme una gran expectativa sobre un mentor y ser un amigo. Sin su apoyo y exigencia previa, no reconocería parte de mis fortalezas en la investigación.

Miriam Zuñiga Eulogio por tu apoyo incondicional forjado de lazos inquebrantables aun en la distancia.

Jessica Paola Gómez por tu amistad y lealtad, sin duda incomparable.

A Cristian, Beto y Julio, por presenciar parte del camino recorrido, sin sus esencias habría sido más difícil, infinitas gracias por formar parte de mis alegrías.

**El presente trabajo se llevó acabo en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la dirección de la Dra. Teresa García Gasca y en colaboración con el Laboratorio 41 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV-Zacatenco, con la colaboración del Dr. Porfirio Nava Domínguez.**

## ÍNDICE

RESUMEN.....	i
SUMMARY .....	ii
DEDICATORIAS .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
ÍNDICE .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1  Cáncer.....	3
2.2  Cáncer de colon.....	6
2.3  Bases moleculares del cáncer de colon .....	7
2.4  Tratamiento contra cáncer de colon .....	8
2.5  Lectinas vegetales .....	9
2.5.1  Aplicaciones de las lectinas en biomedicina.....	11
2.6  Sistemas heterólogos de lectinas .....	14
2.6.1  Levadura <i>Pichia pastoris</i> como sistema de producción .....	15
<b>III. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>18</b>
<b>V. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
6.1.  Objetivo general.....	18
6.2.  Objetivos específicos .....	18
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
6.1  Diseño del estudio .....	19

6.2 Material biológico .....	19
6.2.1 Purificación de la lectina recombinante (Lr).....	19
6.2.2 Cultivo celular .....	19
6.3 Efecto de la Lr sobre ciclo celular y apoptosis.....	19
6.4 Lactato deshidrogenasa.....	21
6.5 Determinación de la interacción de la Lr sobre el EGFR .....	21
6.6 Resistencia Eléctrica Transepitelial.....	23
6.7 Análisis estadístico .....	23
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>46</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>47</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aplicaciones de las lectinas .	12
<b>Figura 2.</b> Actividad aglutinante de la Lr.	25
<b>Figura 3.</b> Proporción de lectina recombinante respecto a la lectina nativa y efecto citotóxico de la Lr sobre células HT-29.	26
<b>Figura 4.</b> Evaluación del efecto de la FCL y la Lr sobre el ciclo celular en células de cáncer de colon HT-29.	28
<b>Figura 5.</b> Inducción de apoptosis por la FCL y la Lr sobre células de cáncer de colon HT-29.	29
<b>Figura 6.</b> Marcadores de apoptosis en células de cáncer de colon tratadas con lectina recombinante.	31
<b>Figura 7.</b> Efecto de la lectina recombinante sobre la fosforilación de EGFR, p38 y Akt en células de cáncer de colon SW-480.	35
<b>Figura 8.</b> Efecto de la lectina recombinante sobre la activación y degradación de vías canónicas del EGFR en células de cáncer de colon SW-480.	36
<b>Figura 9.</b> Efecto de la Lr sobre la degradación de EGFR en células de cáncer de colon SW-480.	38
<b>Figura 10.</b> Internalización y degradación del EGFR en células de cáncer de colon SW-480 tratadas con la Lr.	39
<b>Figura 11.</b> Modificación en la morfología de células de cáncer de colon SW-480 tratadas con la Lr.	40
<b>Figura 12.</b> Disminución en la resistencia transepitelial en células CaCo2 tratadas con lectina recombinante.	42
<b>Figura 13.</b> Localización de la Lr sobre HT29.	43
<b>Figura 14.</b> Mecanismo de acción de la Lr sobre células de cáncer de colon.	45

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente existen diversas investigaciones enfocadas en el estudio de compuestos bioactivos de plantas que presentan posibles aplicaciones biomédicas y/o biotecnológicas. El estudio de estos compuestos bioactivos ha favorecido la obtención de nuevas alternativas terapéuticas o ha permitido utilizar dichas moléculas como moldes para la producción de forma sintética (Araújo y col., 2013). Algunas de las moléculas en investigación son las lectinas, proteínas con capacidad de unirse a carbohidratos de manera específica y reversible. Su distribución es ubicua, siendo las lectinas de leguminosas las más estudiadas por presentar características con interés farmacéuticos (Yau y col., 2015).

Las investigaciones realizadas a partir de lectinas vegetales se han enfocado en su uso como terapias alternativas contra cáncer. Por ejemplo, las lectinas del muérdago, que se encuentran en fases clínicas y son empleadas como agentes adyuvantes durante quimioterapias o radioterapia en Europa (Liu y col., 2010). El interés de utilizar a las lectinas como tratamiento coadyuvante, deriva de su capacidad para interactuar con los glicanos presentes en la superficie de células tumorales, desencadenando respuestas como la inhibición de la división celular, apoptosis y modulación del sistema inmune, entre otras (Gondim y col., 2017). Sin embargo, las lectinas provenientes de leguminosas también se han reconocido como factores anti nutricionales por su unión a la mucosa gástrica evitando la absorción de nutrientes o por su interacción con enzimas digestivas (Nakata y Kimura., 1985).

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado una fracción concentrada de lectinas (FCL) de frijol Tépari, la cual presenta efecto citotóxico diferencial sobre fibroblastos transformados, además de reducir neoplasias malignas tempranas en ratas con

cáncer de colon inducido químicamente con baja toxicidad por vía oral (García-Gasca y col., 2012; Ferriz-Martínez y col., 2015; Moreno Celis y col., 2017).

La FCL podría ser utilizada como tratamiento adyuvante en el cáncer de colon. No obstante, su proceso de purificación es costoso, demora tiempo y proporciona bajos rendimientos de una fracción de lectinas semipura. En este sentido, se optó por estrategias de ingeniería genética para obtener una lectina recombinante a partir de la levadura *Pichia pastoris*. Este proceso incrementa el rendimiento y permite obtener una lectina pura, además disminuye el tiempo y costo de obtención. Sin embargo, aún es necesario conocer el efecto citotóxico de la lectina recombinante y su mecanismo de acción sobre células tumorales. Estudios realizados previamente, muestran un efecto citotóxico dependiente de la concentración en la línea celular HT-29. En el presente trabajo se observó que la lectina recombinante tiene un efecto sobre el ciclo celular y apoptosis similar a las lectinas nativas del frijol Tépari, además de identificar que el EGFR y sus vías canónicas participan en el mecanismo por el cual la lectina induce a apoptosis en células de cáncer de colon.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Cáncer

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial, en el 2015 se calcularon 8.8 millones de muertes por esta patología. Dentro de los tipos de cáncer con mayor frecuencia son el cáncer de pulmón (1.69 millones de muertes), cáncer hepático (788 mil defunciones), cáncer colorrectal (774 mil muertes), cáncer gástrico (754 mil defunciones) y de mama (571 mil muertes) (OMS, 2017). El cáncer es considerado una enfermedad multifactorial causada por modificación en múltiples vías de señalización celular y alteración de productos génicos que producen la transformación de células normales a células tumorales. Para el desarrollo del cáncer se han considerado como factores cruciales el estilo de vida (tabaquismo, alcoholismo, hábitos dietéticos), contaminación ambiental, radiación e infecciones, así como enfermedades crónicas (Bustamante y col., 2002; Raya Pérez, 2006; Ardekani y Jabbari, 2009).

Durante la carcinogénesis, las células se caracterizan por adquirir nuevas capacidades biológicas, dentro de las cuales se incluyen la constante señalización en la proliferación, crecimiento, resistencia a muerte celular, inducción de angiogénesis y capacidad de invasión y metástasis. El desarrollo del cáncer consta de múltiples etapas que finalmente permiten la diseminación de las células. La fase de iniciación que involucra cambios irreversibles en células somáticas posterior a exposición de algún carcinógeno (Hanahan y Weinberg, 2011). La primera etapa de la carcinogénesis la célula experimenta mutaciones creando el desarrollo de la neoplasia, en la cual predispone su función celular y la de su progenie (Devi, 2004).

Se reconocen genes responsables en la transformación puesto que promueven la proliferación y crecimiento celular autónomo en las células cancerosas, los cuales son conocidos como oncogenes y se forman mediante la mutación de sus homólogos celulares, los protooncogenes (Franco Vera, 2014). Estos últimos codifican proteínas con múltiples funciones como factores de crecimiento o sus

receptores, transductores de señales, factores de transcripción o componentes del ciclo celular. Las proteínas codificadas por oncogenes cumplen funciones similares a los protooncogenes. Sin embargo, su activación es constitutiva lo que conlleva a una autosuficiencia en el crecimiento celular (Kumar y col., 2010). Adicionalmente, los genes supresores de tumores, que en su estado nativo frenan el ciclo celular y promueven la apoptosis, constituyen el segundo grupo de genes relacionados con el cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

Estas alteraciones genéticas concluyen en la transformación celular, que algunas veces se percibe como un paso intermedio a la fase de la promoción. Durante la promoción las células transformadas también dependen de factores intra y extracelulares que pueden cambiar temporalmente los patrones de expresión génica específicos como las citocinas, lípidos, carbohidratos entre otros. Lo anterior favorece el potencial de proliferación y crecimiento celular, produciendo así el desarrollo de la neoplasia (Devi, 2004; Sarkar y col., 2013).

La tercera etapa de la carcinogénesis es la progresión tumoral, donde el aumento de la proliferación celular incrementa el tamaño del tumor y permite más heterogeneidad de la población celular. La progresión tumoral se divide en dos eventos que son característicos de tumores malignos. Primero la invasión a través de la degradación de la matriz extracelular por el incremento en la secreción de metaloproteinasas, seguido de la metástasis que consiste en la diseminación vascular o linfática por cambios en las interacciones célula-célula, donde se adquiere la capacidad de migrar y fijarse a nuevos componentes de otros tejidos (Lambert y col., 2017).

Las mutaciones de los genes que regulan la apoptosis son indispensables para el desarrollo del cáncer, por lo que tal vía representa una barrera que debe superarse (Kumar y col., 2010). La vía apoptótica ha sido investigada como blanco molecular para inducir la muerte de células cancerosas evitando que una célula transformada continúe con su desarrollo. El proceso de apoptosis es una forma de muerte celular

organizada, por el cual las células no causan daño a tejidos adyacentes como ocurre durante la necrosis (Watson, 2004; Elmore, 2007).

El mecanismo de apoptosis es altamente complejo y sofisticado, que permite la homeostasis celular entre la velocidad de proliferación, diferenciación y muerte celular, en el cual involucra una cascada de eventos moleculares dependientes de energía y activación de una familia de proteasas denominadas caspasas (Watson, 2004). Existen varias vías principales que inducen apoptosis dependiente de caspasas, la vía intrínseca, la extrínseca y recientemente se ha descrito la vía perforina/granzima, la cual es mediada por linfocitos T para causar citotoxicidad. En la vía intrínseca participa la mitocondria y en la extrínseca intervienen receptores de muerte (Elmore, 2007). Las diferentes vías apoptóticas convergen en etapas finales del proceso que resulta en la fragmentación de ADN, degradación del citoesqueleto y proteínas nucleares, formación de cuerpos apoptóticos, expresión de ligandos reconocidos por células fagocíticas que finalizan dicho mecanismo (Kepp y col., 2011).

Alteraciones de la membrana y reconocimiento por los fagocitos derivan de cambios como el desplazamiento de la fosfatidilserina desde la hoja interna de la membrana a la externa, donde son reconocidos por los receptores de los fagocitos. La formación de cuerpos apoptóticos deriva por la incisión de proteínas como ROCK1 que permite la contracción del citoesqueleto de actina y la formación de dichas estructuras (Elmore, 2007; Taylor y col., 2008). Los diversos estímulos lesivos pueden resultar en muerte celular y no siempre comprometer la vía apoptótica, sino también inducir muerte celular de tipo necrosis, resultado de múltiples lesiones frecuentes como en la isquemia, exposición a toxinas, diversas infecciones y traumatismos. El proceso de necrosis conlleva a una desorganización y lisis del citoplasma y ruptura de la membrana plasmática, permitiendo la extravasación del contenido celular y produciendo atracción de células inmunes en el área originando inflamación (Taylor y col., 2008).

La desregulación de la apoptosis es considerada un marcador en diferentes tipos de cáncer humano, principalmente en cáncer colorrectal donde se ha reportado mutaciones en proteínas reguladoras de la apoptosis. En líneas celulares de cáncer colorrectal se ha observado resistencia a la apoptosis inducida por el receptor de muerte Fas (Watson, 2004; Fabregat y Gil, 2009).

## **2.2 Cáncer de colon**

Dentro de los tipos de cáncer más frecuentes, el cáncer de colon (CaCo) ocupa el cuarto lugar en México de acuerdo con el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). El CaCo es una enfermedad caracterizada por el crecimiento autónomo de células en cualquiera de las cuatro porciones del colon (ascendentes, transversos, descendentes y sigmoides). Generalmente es uno de los cánceres que se diagnostican en etapas avanzadas por lo que sus signos y síntomas son muy inespecíficos: cambios en la defecación como diarrea, estreñimiento, heces delgadas, sangrado rectal, sangre en heces, cólicos o dolor abdominal, debilidad, cansancio, pérdida inexplicable de peso y sensación persistente de defecar que no desaparece después de hacerlo (González Contreras, 2010; INSP, 2015).

El CaCo se forma a partir del epitelio de revestimiento del colon, que en condiciones normales se renueva a un ritmo rápido y en una semana aproximadamente se sustituye todo el recubrimiento epitelial. La renovación depende de células madre que se sitúan en invaginaciones del epitelio denominados criptas intestinales (González Contreras, 2010). Existen factores de riesgo que aumentan la posibilidad de desarrollar CaCo como la aparición de tumores benignos o adenomas denominados pólipos, los cuales son considerados precursores de una gran proporción de los cánceres colorrectales, ya que la enfermedad suele ser crónica común a periodo de unos 10 años durante los cuales el tumor crece. Sin embargo, otros factores de riesgo es padecer enfermedad inflamatoria intestinal, ser mayor de 50 años, presentar alteraciones familiares de cáncer colorrectal y algunas

enfermedades hereditarias como mutaciones en genes específicos; aunado a mala alimentación, sobrepeso y falta de actividad física (González Contreras, 2010).

### **2.3 Bases moleculares del cáncer de colon**

La carcinogénesis del colon involucra la mutación de genes que codifican proteínas como K-Ras, p53 y APC, los cuales se encuentran mutados en 40%, 60% y 80%, respectivamente. Los individuos con mutación en APC desarrollan poliposis adenomatosa familiar (APC), en la cual se presentan cientos de pólipos a lo largo del colon, los cuales pueden generar inestabilidad genética con el paso de los años. La función de la proteína APC es inhibir la vía de señalización Wnt, mediante la unión a  $\beta$ -catenina (componente de la vía) contribuyendo a la degradación de la proteína. Al inhibir a  $\beta$ -catenina se evita su translocación nuclear donde actúa como factor transcripcional para impulsar la proliferación celular (Morin y Weeraratna, 2003). Las mutaciones del gen APC se relacionan con etapas tempranas del CaCo seguido de activación de K-Ras, oncogén que afecta la señalización por receptores tirosina quinasa y promueve la formación de un adenoma intermedio. La siguiente progresión tumoral radica en mutaciones en SMAD4, considerado un supresor de tumores que afecta la vía de señalización por TGF- $\beta$  y, finalmente, daño en p53, el cual controla la transcripción de proteínas proapoptóticas como Puma, Noxa, Bid, Bad, por lo que las células tumorales evaden el proceso de apoptosis (Zhang y Yu, 2013; Xiao-Lan y col., 2015).

La proteína p53 es considerada una de las moléculas fundamentales contra el desarrollo del cáncer. En pacientes con mutaciones en p53 manifiestan resistencia a la quimioterapia y tienen un mal pronóstico, a diferencia de los pacientes con el gen silvestre (Xiao-Lan y col., 2015).

Las vías de señalización oncogénicas inducen a una reprogramación metabólica en células cancerosas que conllevan al crecimiento tumoral y una de las moléculas promotoras en los procesos metabólicos ya sea de forma directa o indirecta es el



receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), además de activar al ciclo celular de forma constante y es considerado un blanco terapéutico al igual que p53 (Sigismund y col., 2017). Esta adaptación metabólica en células cancerosas provee incremento bioenergético y de biosíntesis, como es el “efecto Warburg”, que se incrementa con el consumo de glucosa y glutamina favoreciendo el crecimiento y proliferación celular (Very y col., 2018).

## **2.4 Tratamiento contra cáncer de colon**

La apoptosis es el mecanismo citotóxico más inducido y esperado por la terapia anticancerígena como la radiación, quimioterapia o terapias dirigidas (Watson, 2004). La radiación y agentes quimioterapéuticos inducen daño en el ADN que desencadena fosforilación y acetilación; permitiendo la estabilización de p53, induciendo apoptosis principalmente por vía intrínseca. Por otra parte, las terapias dirigidas incluyen inhibidores de receptores tirosina cinasa y el uso de anticuerpos monoclonales, que han sido útiles en algunos tipos de cánceres. Algunos de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFR son el cetuximab y panitumumab (Siu-Fun Wong, 2005). Los cuales funcionan como agentes coadyuvantes en la quimioterapia e inducen apoptosis en células de CaCo. Otro anticuerpo es el Bevacizumab que es usado con la quimioterapia convencional para tratar el cáncer colorrectal metastásico (Zhang y Yu, 2013).

La búsqueda de nuevas alternativas como posibles tratamientos en oncología junto con estudios epidemiológicos proporcionan evidencias de que la alimentación tiene una función esencial en reducir riesgos de enfermedades como el cáncer de colon. Los compuestos químicos principalmente presentes en plantas, que, si bien no erradican la enfermedad, si influyen en la prevención y disminución de la fisiopatología (Naselli y col., 2015). Además, recientemente se estudian proteínas como las lectinas vegetales que cumplen funciones biológicas por su interacción con glicosilaciones aberrantes presentes en la superficie celular y eventualmente desencadenan una respuesta como un efecto antiproliferativo sobre células de

cáncer (Very y col., 2018). Las perspectivas sobre el uso de lectinas como terapia anticancerígena han emergido por la asociación entre glicosilaciones aberrantes y resistencia a fármacos. Estos cambios en las glicosilaciones, principalmente en N-glicanos, son participes en mecanismos celulares que involucran: metabolismo, señalización, crecimiento, adhesión célula-célula, interacción célula-matriz, invasión y metástasis (Madureira de Freitas Junior y Morgado-Díaz, 2015).

Algunos estudios vinculan la alta expresión de N-glicanos  $\beta$  1-6 ramificado con la progresión del cáncer. Los N-glicanos  $\beta$  1-6 ramificado son procesados en el aparato de Golgi de células cancerosas por un aumento en la actividad de enzimas como la MGAT5 (alfa-1-6 manosilglicoproteína 6 beta-N-acetilglucosaminiltransferasa A), lo cual promueve una estabilización y constante activación de receptores de factores de crecimientos, como el EGFR, en la superficie celular e impide el efecto de los tratamientos. (Madureira de Freitas Junior y Morgado-Díaz, 2015; Very y col., 2018).

## **2.5 Lectinas vegetales**

Las lectinas son proteínas que se encuentran distribuidas en todos los organismos; virus, bacterias, hongos, plantas y vertebrados superiores (Hernández Cruz y col., 2005). Sus actividades biológicas son muy variadas y dependen del organismo de origen. En animales están involucradas con migración y adhesión celular al igual que en el control de la producción de glicoproteínas y fagocitosis (Sharon y Lis, 2004). En microorganismos como bacterias, virus y parásitos, son ampliamente conocidas como adhesinas y su principal función está asociada a la adhesión y procesos de colonización (Sharon, 2008).

Las lectinas parecen estar mayormente distribuidas en plantas y se conoce su importante función durante la nodulación, así como parte de mecanismos de defensas contra insectos y otros fitopatógenos (Sharon y Lis, 2004). Asimismo, se ha observado que juegan un papel determinante para la especificidad del

reconocimiento del huésped en procesos simbióticos entre leguminosas y bacterias del género *Rhizobium* (Sharon y Lis, 2004). En las leguminosas las lectinas pueden llegar a representar de un 8 al 10% del contenido proteico de la semilla y la mayoría de las lectinas que se han estudiado por sus propiedades fisicoquímicas y biológicas son de origen vegetal (Micucci y Camps, 1987). Dentro de las lectinas de leguminosas más ampliamente estudiadas se encuentran Concanavalina A, PHA-L, las lectinas del muérdago, cacahuate, soya, entre otras (Lagarda-Díaz y col., 2017).

La primera lectina descubierta fue en el frijol *Ricinus communis*, considerada de las sustancias más tóxicas y su mecanismo de acción se basa en que la estructura proteica tiene dos subunidades (A y B) unidos por enlace sulfhidrilo. La subunidad B reconoce residuos de galactosa presentes en la membrana celular y permite su internalización mediante endocitosis dependiente de clatrina. Por otra parte, la subunidad A es la que interactúa con los ribosomas e impide la síntesis de proteínas (Sandvig y Van Deurs, 2002; Moshiri y col., 2016).

Los estudios toxicológicos de lectinas han mostrado ser relevantes cuando se ingieren sin algún método de cocción, como cuando se administra Concanavalina A (Con A) en ratas, estas manifiestan disturbios en la función del epitelio intestinal y existe interacción con enzimas digestivas, además de que la Con A no se modifica durante el tracto gastrointestinal (Nakata y Kimura, 1985).

Una de las leguminosas con mayor importancia nutricional es el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), cuyo consumo crudo se evaluó en roedores observando inhibición en el crecimiento, bajo balance de nitrógeno, reducción de la absorción intestinal de azúcares, aminoácidos y una respuesta inmune deteriorada (Marzo y col., 2011). La afectación a nivel gastrointestinal se ha observado con otras lectinas del frijol, sin embargo, eso no descarta las posibles aplicaciones que pueden tener principalmente en enfermedades como el cáncer, ya sea por la inducción de

apoptosis de células cancerosas o por ser inmunomoduladoras (Pereira-da-Silva y col., 2012).

### **2.5.1 Aplicaciones de las lectinas en biomedicina**

La capacidad de las lectinas para reconocer moléculas de manera específica mediante la unión a carbohidratos se ha aprovechado ampliamente en diferentes campos de la investigación; utilizándolas como herramientas para la purificación de proteínas, análisis estructurales, y sistemas de detección de oligosacáridos complejos. Además, se ha observado que tienen actividades biológicas como mitógenos y efectos antiproliferativos en células de cáncer humano, también se ha demostrado que son agentes de agregación celular y en ocasiones fungen como inmunomoduladoras. En el campo de la microbiología tienen función en la inhibición fúngica y bacteriana; también son utilizadas en la agricultura como agentes insecticidas (Figura 1) (Sharon, 2008; Anastácio, y col., 2014).

Las principales fuentes de análisis y aislamiento de estas glicoproteínas son de origen vegetal; siendo la semilla la mayor fuente de éstas por lo cual, la mayoría de las investigaciones se enfocan en las lectinas aisladas de semillas con el objetivo de conocer su bioactividad (Díaz y col., 1999; Anastácio y col., 2014).

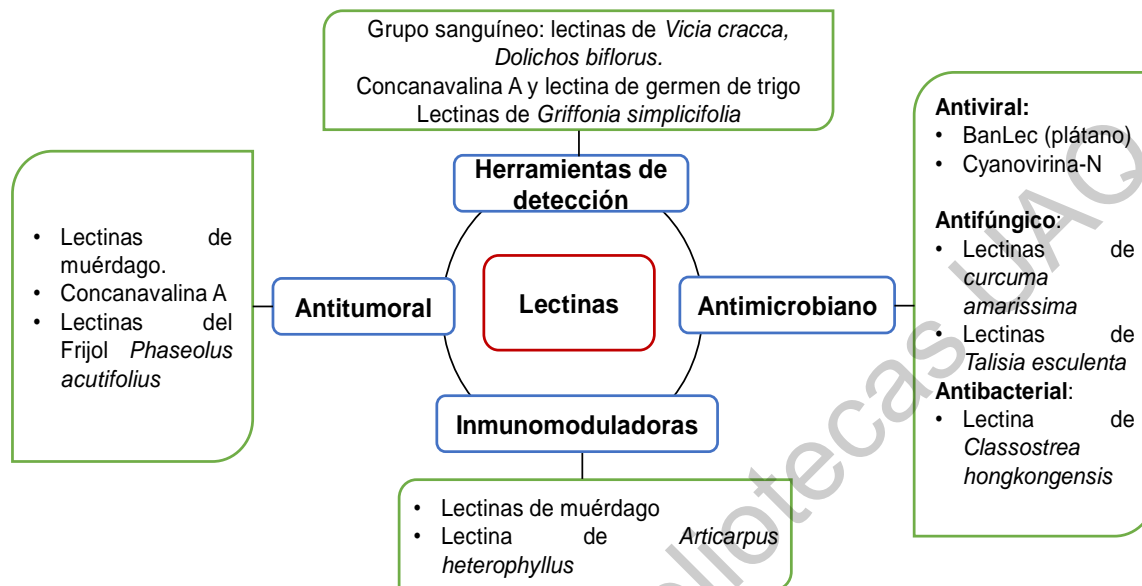


Figura 1. Aplicaciones de las lectinas (Modificado de Yau y col.,2015).

Dentro de las investigaciones biomédicas se ha estudiado la interacción entre lectinas y células, involucrando gran variedad de señales que son fundamentales para la regulación de procesos como (Ferriz-Martinez y col., 2010):

- Aglutinación celular.
- Inducción de apoptosis o arresto del ciclo celular.
- Disminución en la regulación de la telomerasa e inhibición de angiogénesis.
- Afectación directa sobre el sistema inmune por alteración de varias interleucinas o por activación de ciertas proteínas cinasas.
- Algunas lectinas pueden unirse a ribosomas e inhibir la síntesis proteica.

Unas de las lectinas de leguminosas ampliamente estudiadas son las del frijol común (*Phaseolus vulgaris*), por sus efectos antiproliferativos en células de cáncer y su actividad anti-obesogénica (Ang y col., 2014; Thompson y col., 2017). Sin

embargo, ha sido observado que la toxicidad de estas lectinas debe ser considerada antes de emplearse como herramientas biomédicas. Valadez-Vega y col. (2011) detectaron que lectinas extraídas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) son citotóxicas y tienen efecto antiproliferativo en células de cáncer de colon y carcinoma de epitelio cervical; reportando mayor actividad en células de colon. Dos de las principales propiedades de las lectinas del frijol Tépari son su efecto selectivo de células cancerosas y su baja toxicidad *in vivo* (García-Gasca y col 2012; Ferriz-Martínez y col., 2015).

Resultados de investigaciones previas han mostrado que una fracción concentrada en lectinas (FCL) extraída del frijol Tépari, inhibe de manera diferencial la proliferación *in vitro* de células cancerígenas, principalmente en células de cáncer de colon y mama (García-Gasca y col 2012). La administración oral de la FCL en roedores a una dosis de 50 mg/kg; no provocó toxicidad a diferencia de otras lectinas como las de *Phaseolus vulgaris*, las cuales afectan la absorción de nutrimentos, reducen la retención del nitrógeno y producen cambios morfológicos en el tracto gastrointestinal de ratas (Ferriz-Martínez y col., 2015). Moreno-Celis y col. (2017), evaluaron el efecto de la FCL del frijol Tépari en cáncer de colon inducido con 1,2, dimetilhidrazina (DMH) y azoximetano (AOM)/dextrano sulfato sódico (DSS); observando una disminución significativa en la tumorigenesis temprana desencadenada por DMH y disminución de focos de criptas aberrantes originados por la administración de AOM/DSS, al igual que efectos antiproliferativos y proapoptóticos. La inducción de apoptosis está relacionada con la vía de señalización mediada por Akt.

Para poder emplear las lectinas como moléculas coadyuvantes en cáncer de colon, se requiere de procesos que permitan su obtención a gran escala, sin embargo, los procedimientos de purificación precisan una gran inversión de tiempo y dinero (Patel y col.,2014). Por lo anterior, se ha optado generar sistemas de producción sintéticos que permitan evadir los inconvenientes asociados a la purificación convencional de

lectinas y contribuyan a incrementar el rendimiento y la pureza del producto (Martínez-Alarcón y col., 2018).

## 2.6 Sistemas heterólogos de lectinas

Las lectinas de leguminosas tienen importancia farmacéutica, pero su purificación a partir de plantas no permite obtener cantidades suficientes para su aplicación en áreas biomédicas. Por lo que se consideró una solución el empleo de herramientas moleculares a partir de los genes que codifican para estas proteínas (Patel y col., 2014). Los sistemas de producción de lectinas recombinantes ofrecen un alto rendimiento comparado a los métodos de purificación convencionales. Los modelos más importantes que han sido propuestos en la producción heteróloga incluyen el uso de bacterias y levaduras. Cada modelo ofrece ventajas y desventajas que se deben considerar para cada proteína en particular (Martínez-Alarcón y col., 2018).

Dentro de las bacterias, *Escherichia coli* ha sido la más empleada para estos fines, aunque también se han utilizado *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas sp.*, *Streptomyces lividans*, *Lactobacillus lactis*, entre otros (Luo y col., 2005). Los sistemas de expresión de proteínas recombinantes utilizando levaduras, han demostrado ser eficientes y económicos, de interés industrial y/o académico. Las levaduras ofrecen un ambiente apto para el plegamiento de proteínas eucarióticas, llevan a cabo algunas modificaciones postraduccionales y pueden secretar las proteínas recombinantes al medio de cultivo. Además, tienen ventajas de otros microorganismos por ser manipulables y de rápido crecimiento. Por otro lado, tienen una organización celular eucariótica que permite la realización de procesos de expresión y maduración características de células animales y vegetales, lo cual les da una ventaja para la producción de proteínas de origen eucariota (Serrano-Rivero y col., 2016). La levadura más utilizada debido a que se conoce su genética y fisiología es *Saccharomyces cerevisiae*. No obstante, algunas lectinas requieren modificaciones postraduccionales tales como la glicosilación y *S. cerevisiae* produce hiperglicosilaciones altamente antigénicas que además pueden

modificar la estructura de dichas proteínas. En cambio, con la levadura *Pichia pastoris* las antenas glúcidas son similares, al menos en tamaño, a las de organismos superiores. Este sistema también permite excretar las proteínas producidas al medio de cultivo, favoreciendo así la obtención de altas concentraciones del metabolito con mayor pureza (Martínez-Alarcón y col., 2018).

### **2.6.1 Levadura *Pichia pastoris* como sistema de producción**

La producción de proteínas heterólogas de virus, bacterias, hongos, animales y plantas ha sido efectuada exitosamente en *Pichia pastoris*. El uso de esta levadura permite obtener altos rendimientos y resulta ser más eficiente para la producción de proteínas recombinantes que contienen glicosilaciones, aunque se necesita más tiempo del bioproceso para alcanzar la máxima producción de los metabolitos de interés comparado a *E.coli*. Una de las ventajas de este sistema es la secreción de proteínas recombinantes al medio extracelular y su baja liberación de proteínas endógenas, lo que significa que la proteína recombinante secretada comprende la gran mayoría y sirve como primer paso en la purificación. Además, la secreción requiere la presencia de una secuencia de señal en la proteína expresada para dirigirla a vías de secreción y las proteínas recombinantes puedan secretarse al medio después de la escisión de la secuencia de señal de secreción (Oliveira y col., 2014).

La secuencia de señal secretora más ampliamente utilizada en *Pichia pastoris* es el péptido señal del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces*. La escisión incorrecta de esta secuencia ha sido reportada, lo que resulta en proteínas recombinantes con extensiones N-terminales. Esto ha ocurrido en la expresión de las lectinas vegetales recombinantes de PHA, Nictaba y frutalina (Lannoo y col., 2007). La expresión recombinante de PHA resultante fue hiperglicosilada e inactiva. Posteriormente, fue clonada la PHA con el péptido señal nativo y la PHA se observó que fue secretada y completamente funcional (Raemaekers y col., 1999). Por ende, *P. pastoris* se ha



utilizado como sistema de producción de lectinas de plantas incrementando el rendimiento en la producción de lectinas.

En nuestro grupo de trabajo Martínez-Alarcón (2017) utilizó *Pichia pastoris* como sistema heterólogo de producción de lectinas del frijol *Phaseolus acutifolius*, obteniendo un rendimiento de 316 mg/L. Sus resultados preliminares indican que la lectina obtenida conserva su actividad biológica contra células de cáncer de colon HT-29. Sin embargo, su bioactividad y el mecanismo por el cual induce muerte celular sobre células de cáncer de colon no está completamente dilucidado.

Dirección General de Bibliotecas UNAO

### III. JUSTIFICACIÓN

La fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari (FCL), estudiada previamente por nuestro grupo de trabajo presenta efecto citotóxico diferencial sobre líneas celulares de diferentes tipos de cáncer humano, mientras que no presenta alta toxicidad al ser administrada de manera oral *in vivo*. Asimismo, es capaz de inhibir la tumorigenesis temprana de cáncer de colon mediante la inducción de apoptosis. Sin embargo, la purificación convencional de la FCL implica periodos largos y costosos con la obtención de bajos porcentajes de recuperación y pureza. Debido a lo anterior, se generó un sistema heterólogo de producción de una de las lectinas que componen la FCL, a partir de la levadura *Pichia pastoris*. Dicha estrategia contrarresta las desventajas de la purificación convencional y permite obtener una lectina recombinante que presenta alta similitud a una de las lectinas nativas y que, preliminarmente, se ha observado que presenta un efecto citotóxico sobre células transformadas. En este sentido, es necesario determinar el efecto citotóxico sobre células de cáncer de colon, así como evaluar el posible mecanismo de acción en vías importantes durante la carcinogénesis: EGFR/ PI3K / MAPK.

## **IV. HIPÓTESIS**

La lectina recombinante induce un efecto apoptótico sobre células de cáncer de colon, similar a las lectinas del frijol Tépari y su mecanismo de acción está relacionado con la interacción con el EGFR y la vía Akt.

## **V. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo general**

Evaluar el mecanismo de acción de una lectina recombinante sobre células de cáncer de colon.

### **6.2. Objetivos específicos**

- Determinar el efecto de la lectina recombinante sobre las fases del ciclo celular en células de cáncer de colon.
- Establecer el efecto apoptótico y necrótico de la lectina recombinante sobre células de cáncer de colon.
- Identificar las vías de señalización responsables de la inducción de apoptosis en células de cáncer de colon tratadas con la lectina recombinante.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Diseño del estudio**

Tipo de estudio: experimental y comparativo.

### **6.2 Material biológico**

#### **6.2.1 Purificación de la lectina recombinante (Lr)**

La purificación de la FCL y Lr fueron realizadas bajo la metodología de García-Gasca y col., 2012 y Martínez-Alarcón, 2017, respectivamente. La Lr fue purificada a través de una columna de afinidad a níquel por el uso de una bomba peristáltica bidireccional (Bomba Econo EP1 de BioRad), la columna fue lavada con solución amortiguadora ( $\text{NaCl} + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e imidazol 200 mM para eluir la lectina recombinante adherida. Finalmente, la muestra se dializó en membranas (Spectra/Por® 3 Dialysis Membrane) de 3.5 kDa para eliminar las trazas de sales y posteriormente ser liofilizada (Labconco, Modelo 77520). Una vez liofilizadas las muestras se cuantificó la proteína por el método de Bradford (1976) y se determinó actividad aglutinante (Jaffé, 1980) utilizando eritrocitos humanos A+ fijados con glutaraldehído (Turner y Liener, 1975).

#### **6.2.2 Cultivo celular**

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 (ATCC HTB-38), SW-480 (ATCC CCL-228) y C2BBE1 (CaCo2) y de ovario de hámster chino CHO-K1 (CCL-61) (American Type Culture Collection). Los cultivos se incubaron en condiciones de atmósfera humidificada con 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de oxígeno a 37°C.

#### **6.3 Efecto de la Lr sobre ciclo celular y apoptosis**

La línea celular HT-29 fue cultivada en medio DMEM (Gibco #12100-046) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (PAN Biotech #P30-3306) y 1%

de antibióticos (Gibco, #15240062). Previamente se realizó una homologación de la cantidad de proteína de la Lr con la cantidad de proteína de la lectina nativa de la FCL a partir de una densitometría de un gel de poliacrilamida al 13% (Laemmli, 1970) con el software Imagen J. Para confirmar la CL<sub>50</sub> se realizó una curva dosis-respuesta considerando la Lr a diferentes concentraciones (0.407 mg/mL, 0.224 mg/mL, 0.407 mg/mL, 0.611 mg/mL de liofilizado) en DMEM con albúmina sérica de bovino (ASB) al 0.5%. Después de 8 h de incubación, el número de células se determinó cosechándolas primero con un lavado de PBS1x/EDTA 1mM y después una incubación durante 5 min con PBS1x/EDTA 1 mM y finalmente con tripsina/EDTA (0.15 mM/0.5M, respectivamente) con el objetivo de evitar aglutinación y cuantificar las células utilizando una cámara de Neubauer para los diferentes ensayos (Moreno-Celis y col., 2017).

Una vez determinada la CL<sub>50</sub> se evaluó el efecto de la lectina recombinante sobre el ciclo celular y apoptosis, se utilizó la CL<sub>50</sub> de la FCL (0.402 mg/ml) (Ángeles-Zaragoza, 2010) y de la Lr (0.228 mg/mL) en DMEM al 0.5 % ASB. Se sembraron 1x10<sup>6</sup> de células en placas de 60 mm y se dejaron llegar a una confluencia de 80%. Se sincronizaron con medio DMEM suplementado con 2% de SFB durante 24 h. Posteriormente las células fueron separadas en un grupo control con DMEM al 0.5% de ASB y la CL<sub>50</sub> en DMEM al 0.5% de ASB; 0.402 mg/ml de la FCL y 0.228 mg/mL de la Lr durante 8 h.

Para determinar el efecto sobre ciclo celular de la Lr se tomaron 1 x10<sup>6</sup> células y se centrifugaron a 300 x g durante 5 min, se realizó un lavado con PBS 1x seguido de fijación con etanol al 70%. Después de 3 h a -20°C se tomaron 200 µL de la suspensión celular fijada, se centrifugó a 300 g durante 5 min y se realizaron 3 lavados con PBS 1x. Posteriormente se agregaron 200 µL del reactivo (Muse Cell Cycle Kit #MCH100106) dejando incubar durante 30 min a temperatura ambiente en ausencia de luz y finalmente se analizó en el citómetro Muse Cell Analyzer de acuerdo con las especificaciones del kit comercial Muse Cell Cycle #MCH100106. Se realizaron 4 experimentos independientes.

Para determinar el efecto apoptótico de la Lr se realizó el procedimiento previamente descrito hasta obtener la suspensión celular y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo (Muse Annexin V & Dead cell) en un tubo, seguido de 100  $\mu\text{L}$  de suspensión celular y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente para finalmente ser analizado en el citómetro Muse Cell Analyzer de acuerdo con las especificaciones del kit comercial Muse Annexin V & Dead cell (MCH100105). Se realizaron 3 experimentos independientes.

#### **6.4 Lactato deshidrogenasa**

Para evaluar el efecto sobre necrosis se determinó la actividad de lactato deshidrogenasa en la línea celular HT-29 sembrando 10,000 células en una placa de 96 pozos por triplicado para cada tratamiento previamente descrito: Control: 200  $\mu\text{L}$  del medio, control bajo:  $1 \times 10^4$  de células en 200  $\mu\text{L}$  que contiene medio, control alto:  $1 \times 10^4$  de células en 200  $\mu\text{L}$  que contiene medio y Triton X-100 al 1% y los tratamientos previamente descritos con  $1 \times 10^4$  de células en 200  $\mu\text{L}$ . Posterior a 8 h de incubación se centrifugaron las células a 250 g durante 10 min. Finalmente se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante al pozo correspondiente y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de kit comercial (LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay, BioVision #K311-400) incubando durante 30 min a temperatura ambiente para ser analizado por espectrofotometría a 495 nm. Se realizaron 3 experimentos independientes.

#### **6.5 Determinación de la interacción de la Lr sobre el EGFR**

La determinación del efecto de la Lr sobre el EGFR se llevó a cabo gracias a la colaboración del Dr. Porfirio Nava Domínguez del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV-Zacatenco.

Se utilizó la línea celular SW-480 dado que sobreexpresa el EGFR. Las células se cultivaron en medio DMEM/F12 (Sigma Aldrich) por 24 h y se probaron concentraciones de Lr: 0.5, 0.25, 0.05, 0.005 mg/mL de liofilizado. Los extractos

celulares fueron colectados con buffer de lisis RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% ácido deoxicólico, 0.1% de SDS, 50 mM de Tris, pH 8.0), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma Aldrich). Los extractos celulares fueron sonicados (Sonics Vibra Cell) y centrifugados posteriormente a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C, recuperando el sobrenadante. La concentración de proteína se realizó con ácido bicinonínico (Pierce BCA Protein Assay Kit #23225, Thermo Scientific) empleando ASB como estándar. La electroforesis (SDS-PAGE) se realizó utilizando 20 µg de proteína con buffer de muestra 4X (LDS Sample Buffer#1772836, Novex by Life Technologies) en vidrios de 1.5 mm con geles al 10% de acrilamida (Laemmli, 1970). La transferencia a membrana de nitrocelulosa se realizó durante 2.5 h a 0.45 amperes, a 4°C. Se tiñó la membrana con rojo de Ponceau para evaluar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana. La membrana fue bloqueada con leche descremada por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Los anticuerpos correspondientes (PARP escindida, Cell signaling #9541; Caspasa 3 escindida, Cell signaling #9661; fosfo-p38 MAPK, Cell signaling #9211; Fosfo-Akt, Cell signaling #4060; PCNA, Cell signaling #13110; E-cadherina, Santa-Cruz #59778; Fosfo-EGFR, Cell signaling #3777; EGFR total, Neo Markers (MS-400-P1) Fosfo-H2A, Abcam #ab81299; GAPDH, Santa Cruz 32233; Anti-His, Pierce MA121315) se utilizaron a una dilución 1:1000 y se incubaron las membranas aproximadamente durante 24 h a 4°C, seguido de 3 lavados con TBS-Tween al 0.1% para posteriormente incubar con el anticuerpo secundario (Burro anti-ratón, Alexa Fluor 488 Invitrogen A1100; Burro anti-conejo, Alexa Fluor 594 Invitrogen A11012) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Se realizaron 3 lavados con TBS-Tween al 0.1% y se reveló mediante reacción de quimioluminiscencia. Para determinar la vía de degradación del EGFR se utilizaron los inhibidores MG132 (Sigma-Aldrich # C2211) para proteasoma, y cloroquina difosfato (Sigma Life Science #C6628-256) para la vía lisosomal.

Para determinar la localización de la Lr y su efecto sobre el EGFR se utilizó microscopia confocal. Brevemente las células fueron sembradas en cubreobjetos

circulares tratados previamente con poli-L-Lisina (Sigma). Una vez que alcanzaron una confluencia de 80% fueron tratadas con la CL<sub>50</sub> a diferentes tiempos, se dieron 3 lavados con PBS1x y las células fueron fijadas con formalina durante 10 min. Se lavó 3 veces con PBS1x y se permeabilizó con Tritón al 0.5% durante 10 min seguido de lavados con PBS 1x y un bloqueo con BSA al 1% durante 1 h. Los cubreobjetos una vez bloqueados se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C, seguido de lavados e incubación con anticuerpo secundario o faloidina (Faloidina iFluor 555 ab 176756) si es el caso en ausencia de luz durante 1 h, para finalmente ser lavados con PBS1x y montados en portaobjetos con fluoroshield/DAPI (Sigma F6057). Las laminillas fueron observadas en un microscopio confocal marca Leica TCS SP8 (CINVESTAV-Zacatenco) o microscopio confocal LSM 510+ Laser Multifotónico (UNAM-Juriquilla).

#### **6.6 Resistencia Eléctrica Transepitelial**

Para determinar el efecto de la Lr sobre la permeabilidad intestinal se utilizó la línea celular C2BBE1 (Clona de CaCo<sub>2</sub>). Las células fueron cultivadas en DMEM con alta glucosa de 4500 mg/L y glutamina 0.584 g/L, suplementado con suero fetal bovino al 10%, 10 mg/L de holotransferrina humana, aminoácidos no esenciales (Gibco, Waltham, MA) y 1x de penicilina y estreptomina (100 µg/mL) (Gibco, Waltham, MA). Las lecturas se hicieron cada 30 min durante 3 h con Millicell-Electrical Resistance System (Millicel-ERS) MERS00001.

#### **6.7 Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con prueba *post hoc* para comparar los grupos tratamiento respecto al control (Dunnett,  $\leq 0.05$ ) y análisis de *t*-student para comparar los efectos de la Lr vs FCL utilizando el programa Prisma 5.



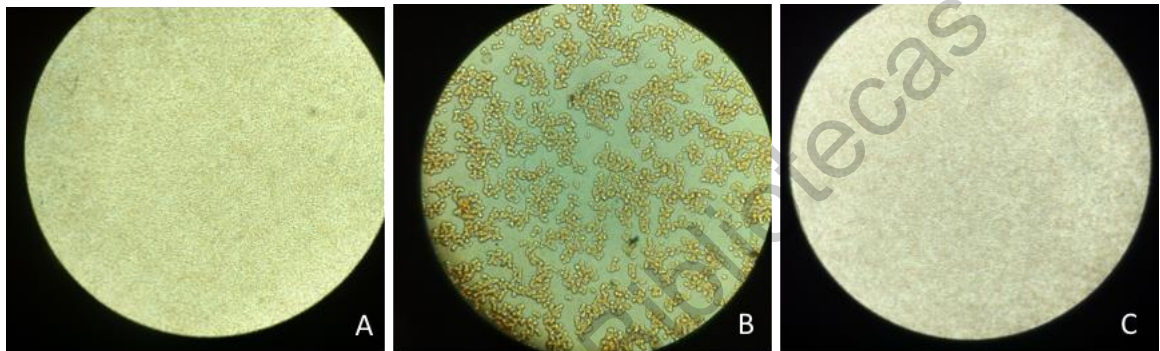
## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cáncer de colon ocupa el tercer lugar en incidencia y segundo en mortalidad a nivel mundial (Bray y col, 2018). Actualmente estudios se han enfocado en investigar compuestos extraídos de plantas con el fin de aplicaciones biomédicas en enfermedades como el cáncer. El uso de estas moléculas bioactivas permite la adquisición de nuevas alternativas preventivas o terapéuticas, ya sea a partir de las moléculas naturales o de su obtención sintética (Araújo y col., 2013). Una de las alternativas ampliamente investigadas, son las lectinas, que reconocen patrones de glicosilación aberrantes sobre células cancerosas. Esta capacidad de reconocimiento específico permite utilizarlas como tratamientos coadyuvantes contra algunos tipos de cáncer como en la leucemia linfoblástica, en el caso de las lectinas del muérdago (Vervecken y col., 2000).

Las lectinas purificadas a partir del frijol Tépari han sido estudiadas por su efecto citotóxico diferencial y por reducir neoplasias malignas en etapas tempranas en ratas con cáncer de colon inducido químicamente (García-Gasca y col., 2012; Moreno-celis y col., 2017). Sin embargo, la purificación de manera convencional ha mostrado desventajas en cuanto rendimiento, tiempo y pureza. Recientemente se optó por la producción heteróloga de una de estas lectinas en la levadura *Pichia pastoris*, contrarrestando las desventajas de la purificación convencional (Martínez-Alarcón., 2017). La selección del sistema de producción de proteínas biofarmacéuticas muestra gran impacto, principalmente por las modificaciones postraduccionales como la glicosilación, sobre las propiedades bioquímicas y, por ende, terapéuticas de las proteínas expresadas, por lo que son relevantes la evaluación de su bioactividad en diferentes sistemas (Walsh, 2010).

Parte de los hallazgos del presente trabajo para comparar la bioactividad de la proteína recombinante del frijol Tépari versus las lectinas nativas fue la determinación de la capacidad aglutinante sobre eritrocitos humanos tipo A+,

reconociendo ausencia de actividad aglutinante comparado con las lectinas nativas del frijol (Figura 2). Dicho resultado concuerda con los reportados por Martínez-Alarcón en eritrocitos de conejo. La ausencia de eritroaglutinación pudiera favorecer en la disminución de efectos secundarios en un organismo *in vivo*, sin embargo, aún es importante determinar su efecto leucoaglutinante como las que presenta una de las lectinas del frijol *Phaseolus vulgaris* (Hamelryck y col., 1996).

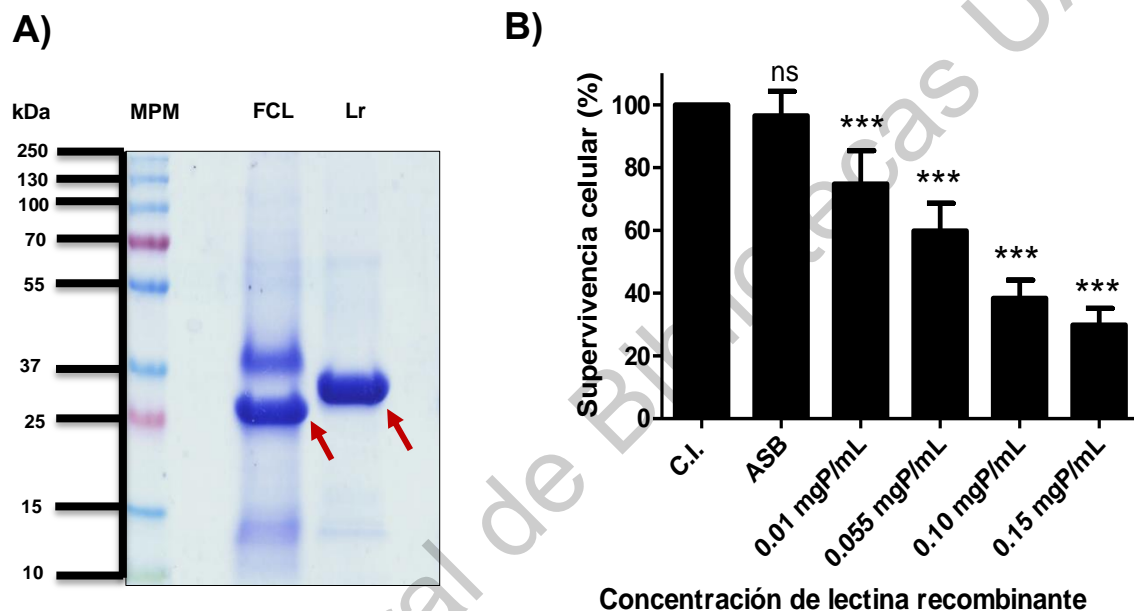


**Figura 2. Actividad aglutinante de la Lr.** Se realizaron diluciones dobles seriadas con eritrocitos humanos al 2%. A) Se utilizó PBS como control negativo. B) Primera dilución con 100  $\mu$ g de proteína de la FCL, C) Primera dilución con 100  $\mu$ g de proteína de la Lr. Las imágenes fueron observadas en un microscopio invertido a 10x.

La ausencia de la actividad aglutinante a partir de sistemas de producción heterólogos de lectinas también se ha observado en la lectina frutalina, estudio realizado por Oliveira y col. (2011) donde mostraron que frutalina no posee dicha actividad y también es producida a partir de la levadura *Pichia pastoris*, pero el efecto citotóxico se conservó sobre células HeLa (células de cáncer cervicouterino humano). De manera similar, la Lr de frijol Tépari obtenida en *P. pastoris* mostró efecto citotóxico sobre células de cáncer de colon HT-29 (Figura 3-B).

Para poder comparar el efecto citotóxico sobre células de cáncer de colon, primero se realizó la homologación de la Lr respecto a la FCL a partir de un gel de poliacrilamida al 13%, el cual fue analizado con el software Image J. Se observó que la Lr corresponde aproximadamente al 63% de proteína respecto a la FCL (Figura 3-A). La cantidad de lectina nativa (LN) presente en una  $CL_{50}$  de FCL corresponde a 0.055 mg/mL de proteína, por lo que se ajustó la concentración de

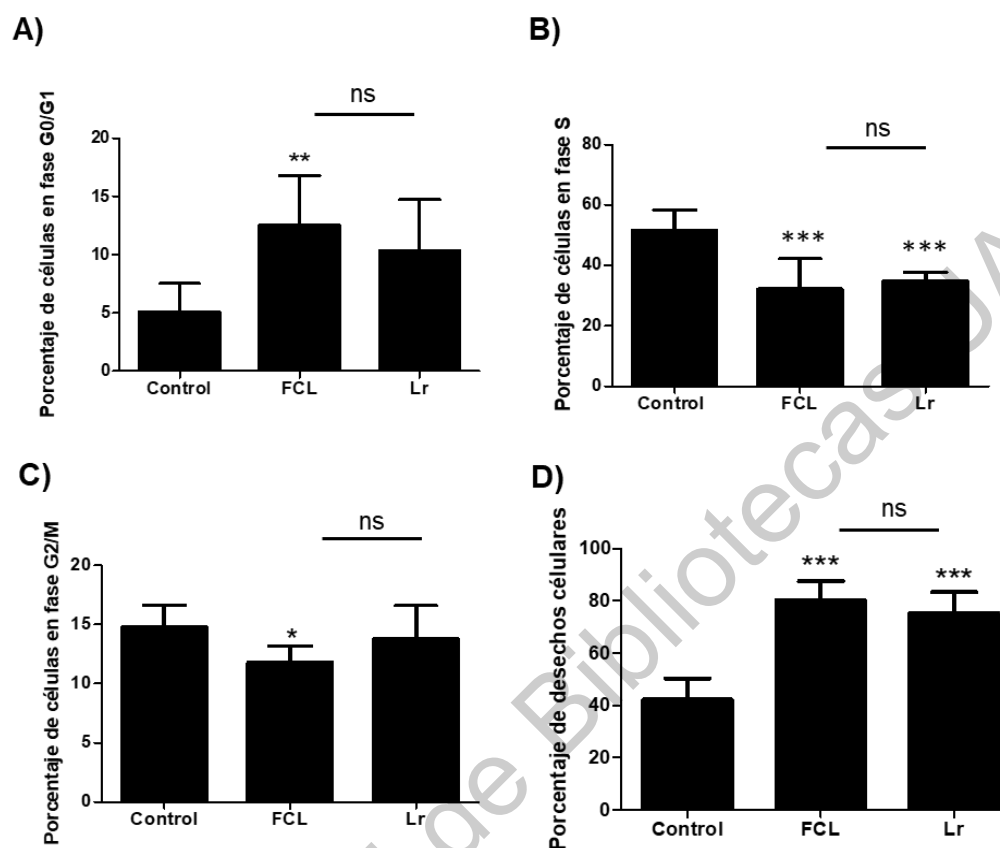
proteína del liofilizado de la Lr con el fin de obtener la misma cantidad y esperar un efecto citotóxico similar, el cual fue comprobado con una curva dosis-respuesta ( $y = -37.467x + 3.1047$ ,  $R^2 = 0.9027$ ) resultando en una  $CL_{50}$  de 0.056 mg/mL de proteína equivalente a 0.228 mg/mL de liofilizado. La diferencia en peso molecular entre la LN y la Lr se debe, principalmente, a la cola de hexahistidinas integrada en la Lr.



**Figura 3. Proporción de lectina recombinante respecto a la lectina nativa y efecto citotóxico de la Lr sobre células de cáncer de colon HT-29.** A) SDS-PAGE. (MPM) Marcador de peso molecular, (FCL) Fracción Concentrada de Lectinas, (Lr) Lectina recombinante. Las flechas señalan ambas lectinas. La proporción de Lr fue aproximadamente del 55% respecto a la lectina nativa presente en la FCL. Este análisis se hizo a partir del software Imagen J. B) Curva dosis-respuesta a 8 h de tratamiento con Lr. Fueron sembradas 10,000 células en placas de 24 pozos a diferentes concentraciones de Lr. El experimento fue realizado en 4 réplicas independientes. Los asteriscos muestran las diferencias significativas de las diferentes dosis (Dunnett,  $p \leq 0.05$ )  $\pm$  D.E. con respecto al control inicial.

La citotoxicidad de las lectinas ha sido estudiada y se ha asociado la bioactividad resultante a su interacción con carbohidratos en la superficie de células cancerosas. Uno de los efectos determinados en el presente trabajo y con el fin de comparar la LN y la Lr fue la evaluación del ciclo celular sobre células de cáncer de colon HT-29 (Figura 4). El efecto de la FCL y la Lr fue similar ya que se observó un incremento en el porcentaje de células en fase G0/G1 comparado al control, aun cuando no se

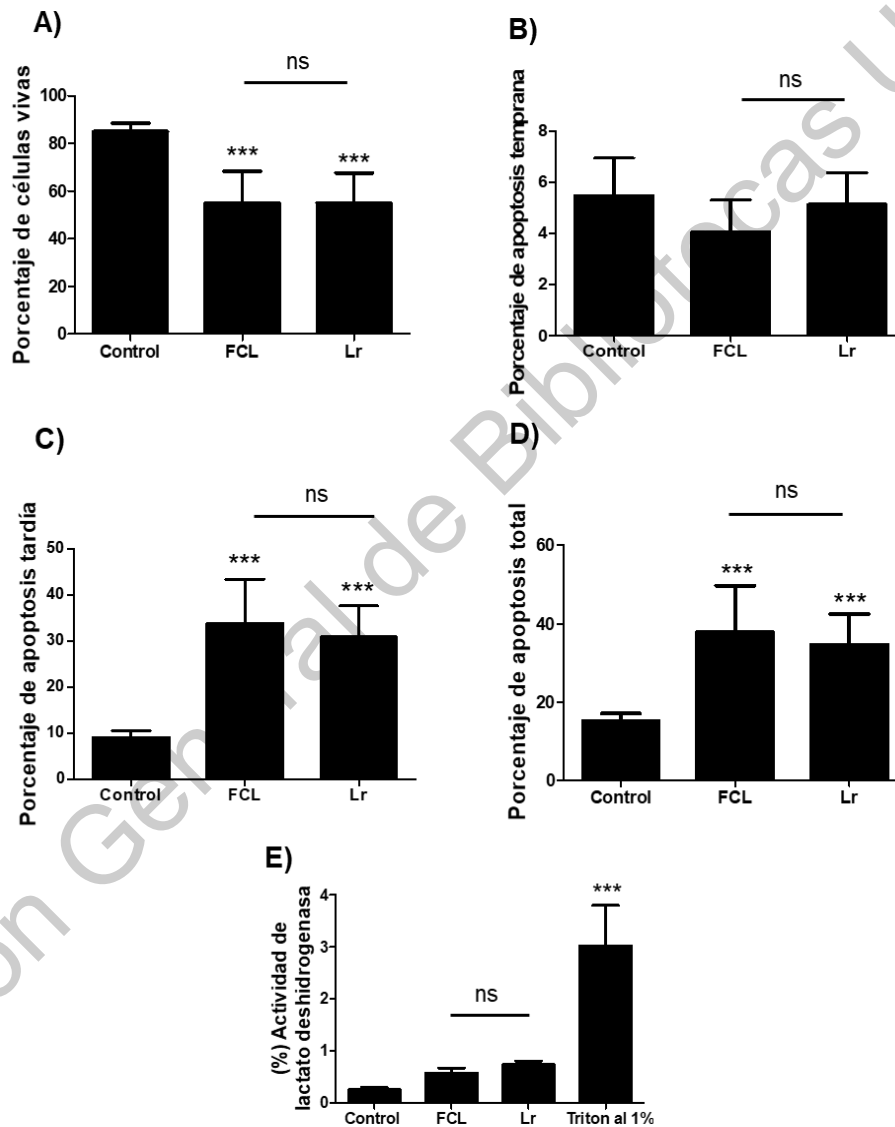
encontró diferencia estadísticamente significativa en el caso de la Lr respecto al control (Figura 4-A). En cuanto a la fase de síntesis de ADN (Figura 4-B), se observó disminución similar y de forma significativa en ambos tratamientos, comparado al grupo control ( $p \leq 0.05$ ), así como para la fase G2/M (Figura 4-C). Sin embargo, en esta última, el efecto observado fue estadísticamente significativo únicamente para el tratamiento con la FCL ( $p \leq 0.05$ ). Los datos previos indican arresto en la fase G1 después de 8 h de tratamiento. Otras lectinas han presentado porcentajes de hasta el 50% en la fase G1, dependiente de la concentración y con medición de los parámetros a 24 h posteriores al tratamiento, como las lectinas de *Phaseolus vulgaris* sobre células MCF-7 (Lamy Ng, 2010). Otro parámetro mostrado durante la determinación del ciclo celular fue el porcentaje de desechos celulares, presuntamente contenido de cuerpos apoptóticos. Las células tratadas con FCL y Lr (Figura 4-D) incrementaron aproximadamente el 80% del detritus comparado al grupo control con 40%. La comparación entre el efecto de la FCL y la Lr no mostraron diferencias de forma significativa para ninguna de las etapas del ciclo celular.



**Figura 4. Evaluación del efecto de la FCL y la Lr sobre el ciclo celular en células de cáncer de colon HT-29.** Se utilizó como control negativo DMEM con 0.5% de ASB, CL<sub>50</sub> de la FCL (0.402 mg/mL), CL<sub>50</sub> Lr (0.228 mg/mL) durante 8 h. A) Porcentaje de células en fase G0/G1; B) Porcentaje de células en fase S; C) Porcentaje de células en fase G2/M; D) Porcentaje de desechos celulares. Se graficaron las medias de 4 experimentos independientes. (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa (Dunnet,  $p \leq 0.05$ ). Se realizó una *t* student para comparar los resultados entre la Lr y la FCL.

Resultados obtenidos por el grupo de trabajo han mostrado efecto apoptótico de la FCL sobre células HT-29 así como activación de caspasa 3 y 9 (Ferriz-Martínez 2015), por lo cual se consideró importante reconocer el tipo de citotoxicidad de la Lr. Los resultados muestran que la Lr induce a apoptosis a partir de determinar la externalización de fosfatidilserina, utilizando Anexina V por citometría de flujo (Figura 5). El resultado fue similar para la FCL y la Lr (Figura 5-A), en donde se observó disminución significativa en el porcentaje de células vivas ( $p \leq 0.05$ ). En efectos apoptóticos de estadio temprano no hubo cambios significativos respecto al control (Figura 5-B), pero si incremento en apoptosis tardía ( $p \leq 0.05$ ) respecto al control (Figura 5-C) y por ende una apoptosis total en ambos tratamientos (Figura

5-D). Para descartar un posible efecto necrótico, se determinó la actividad de lactato deshidrogenasa a partir del medio de cultivo, sin mostrar efecto significativo en ambos tratamientos respecto al control (Figura 5-E). Por lo que se decidió indagar más en el mecanismo de apoptosis.



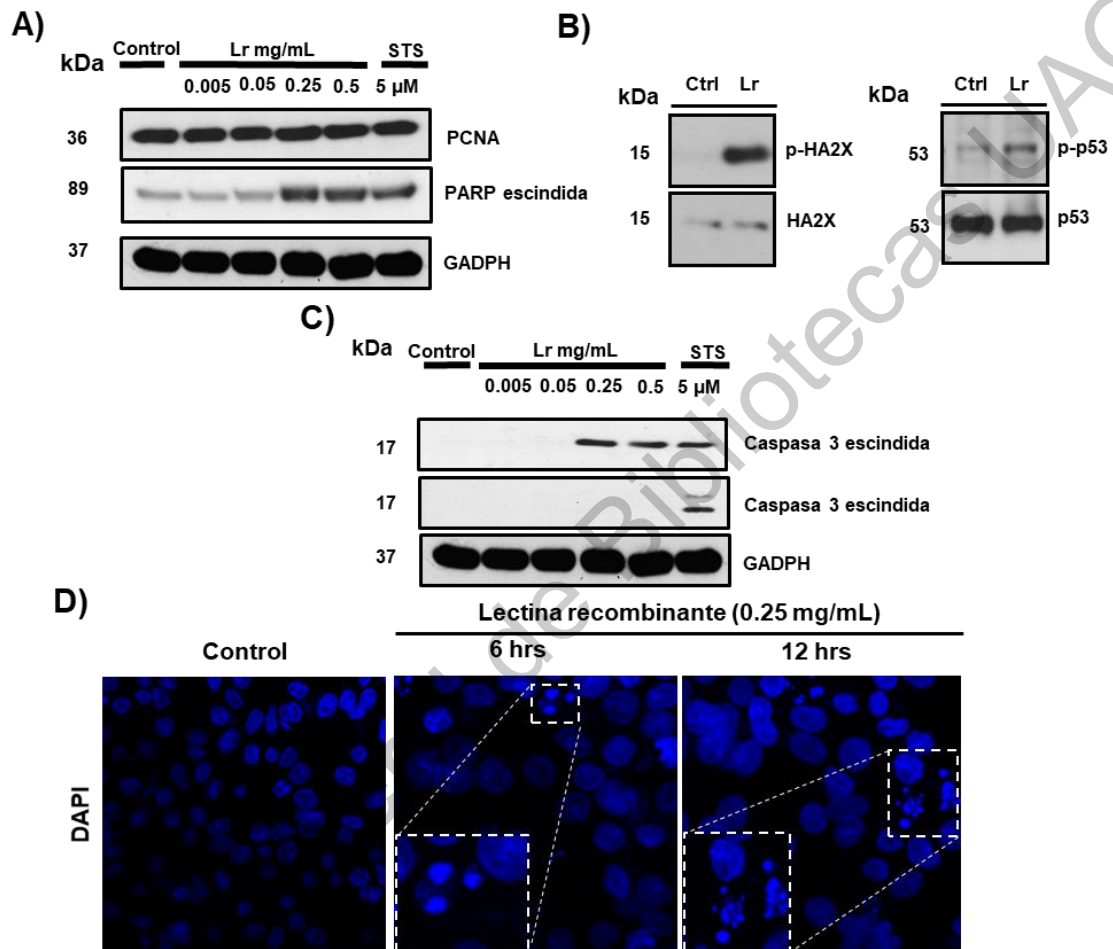
**Figura 5. Inducción de apoptosis por la FCL y la Lr sobre células de cáncer de colon HT-29.** Se utilizó como control negativo DMEM con 0.5% de ASB, CL<sub>50</sub> de la FCL (0.402 mg/mL), CL<sub>50</sub> Lr (0.228 mg/mL) durante 8 h. A) Porcentaje de células vivas. B) Porcentaje de apoptosis temprana. C) Porcentaje de apoptosis tardía. D) Porcentaje de apoptosis total (n=4). E) Efecto necrótico expresado como porcentaje de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) utilizando como control positivo Tritón X-100 al 1% y control sin tratamiento (n=3). (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa (Dunnet, p<0.05).

Resultados relacionados al proceso de apoptosis son mostrados por Martínez-Alarcón en el 2017, a partir de la técnica de TUNEL, que la Lr induce apoptosis a partir de 4 h de exposición en células HT-29. Pero la apoptosis es considerada un mecanismo complejo y es necesario la evaluación de más de un marcador que permita considerar un proceso apoptótico (Kepp, Galluzzi y col., 2011).

Investigaciones previas han mostrado que la inducción de apoptosis de la FCL está relacionada con la activación de caspasas y con la vía de señalización PI3K/Akt (Moreno-Celis y col., 2017). La cinasa Akt actúa en una gran variedad de sustratos de proteínas que regulan procesos de supervivencia, proliferación, metabolismo, síntesis de proteínas, entre otros y cuya activación está relacionada río abajo de la vía del EGFR (Wee y Wang., 2017). Con la finalidad de determinar si el efecto de la Lr está relacionado con la interacción con el EGFR, se utilizaron células SW-480 ya que sobre-expresan dicho receptor y células de ovario de hámster chino (CHO-K1), las cuales no expresan EGFR (Figura 6). El efecto de la Lr sobre la proliferación celular se determinó mediante la identificación del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) a través de Western blot, mientras que su efecto apoptótico fue evaluado mediante la determinación de la activación de caspasa 3 y de la Poli ADP ribosa polimerasa (PARP), la fosforilación de p-53 y de la histona HA2X.

La Lr no muestra un efecto mitógeno sobre célula SW-480 a partir del marcador PCNA (Figura 6-A), ya que los resultados no indican diferencias significativas. En cambio, algunas lectinas son reconocidas por sus efectos como mitógenos como la lectina de cacahuete (PNA), la cual incrementa el número de células dependiente de la concentración, asimismo aumenta la incorporación de timidina en células HT-29, por lo que se refleja como una respuesta de proliferación celular, favoreciendo posiblemente la carcinogénesis (Ryder y col., 1994). En este caso, los resultados obtenidos sugieren que la Lr no ejerce efecto mitogénico sobre células de cáncer de colon.

PARP es una enzima relacionada con la reparación del ADN pero que en procesos apoptóticos se activa para intentar reparar el daño al ADN. Su fosforilación está relacionada con la activación de apoptosis independiente de caspasas (Yu y col., 2006). (Rogakou y col., 1998).



**Figura 6. Marcadores de proliferación celular y apoptosis en células de cáncer de colon tratadas con la lectina recombinante.** Células SW-480 o CHO-K1 fueron tratadas con diferentes concentraciones de la Lr durante 24 h. A) Inmunoblot para PCNA y PARP escindida en células SW-480; B) Inmunoblot para p-HA2X y p-p-53 en células SW-480; C) Inmunoblot para caspasa 3 excindida en células SW-480 (sobrexpresan EGFR) y CHO-K1 (no expresan EGFR); D) Fragmentación nuclear en células SW-480 tratadas con 0.25 mg/mL de LR durante 6 y 12 h. Las células se observaron en un microscopio confocal (Leica TCS SP) a 40x y se aprecia la fragmentación nuclear por DAPI (5 μg/mL).

De forma similar, la fosforilación de la histona HA2X está relacionada con eventos de reparación de ruptura de doble cadena, lo que indica la activación de procesos apoptóticos. La activación de ambas moléculas es indicativo de que la Lr induce apoptosis en células de cáncer de colon SW-480 (Figura 6, A-B). Lo anterior se confirma con la fosforilación de p-53 (Figura 6-B), ya que se han descrito nueve



fosforilaciones de esta proteína (serina 20, 33, 46, 366, y 392 y treonina 81, 304, 377, y 387) relacionadas con la activación de apoptosis (Satomi y Kiyotsugu, 2018).

Con respecto al efecto sobre la inducción de apoptosis, se observó activación de caspasa 3 a partir de 0.25 mg/mL de Lr durante 24 h, utilizando como control positivo estaurosporina (STS) 5  $\mu$ M (Figura 6-C). En este sentido, se determinó el efecto sobre células CHO-K1, las cuales no expresan el EGFR en donde no se presentó efecto apoptótico (Figura 6-C). Este resultado sugiere que la inducción de apoptosis por parte de la Lr está relacionada con su posible interacción con el EGFR. Además, se observó fragmentación nuclear por inmunofluorescencia a una concentración de 0.25 mg/mL a partir de las 6 y 12 h de exposición (Figura 6-D).

La activación de caspasas se ha reportado con el empleo de otras lectinas como las del muérdago Koreano sobre células de cáncer A253 (células de carcinoma epidermoide) y en células HL-60 (células de leucemia promielocítica) (Khil y col., 2007; Lyu y col., 2001). Otro tipo de muerte celular como la autofagia, se ha reportado con otras lectinas como en el caso de *Polygonatum odoratum* sobre células de cáncer de mama MCF-7 y su mecanismo de acción sobre células de fibrosarcoma murino L929, el cual involucra la activación de caspasa 8, 9 y 3 y aumento en los niveles de expresión de receptores de muerte FasL y FADD (Ouyang y col., 2014). Concanavalina A también ha mostrado un efecto de autofagia en células de cáncer hepático (Chang y col., 2007).

El mecanismo de acción de cada lectina es diferente, la abrina y la ricina contienen dos cadenas unidas por enlaces disulfuro, y se conoce que cada cadena cumple una función en específico en la inhibición en la síntesis de proteínas. La cadena B permite la unión a carbohidratos de la membrana celular y su internalización, posteriormente la cadena A es la que se une a los ribosomas e inhibe la síntesis de proteínas (Olsnes y col., 1974). En otros casos, las lectinas son capaces de interactuar con receptores de membrana, afectando sus funciones. Investigaciones se han enfocado en dilucidar los mecanismos moleculares de

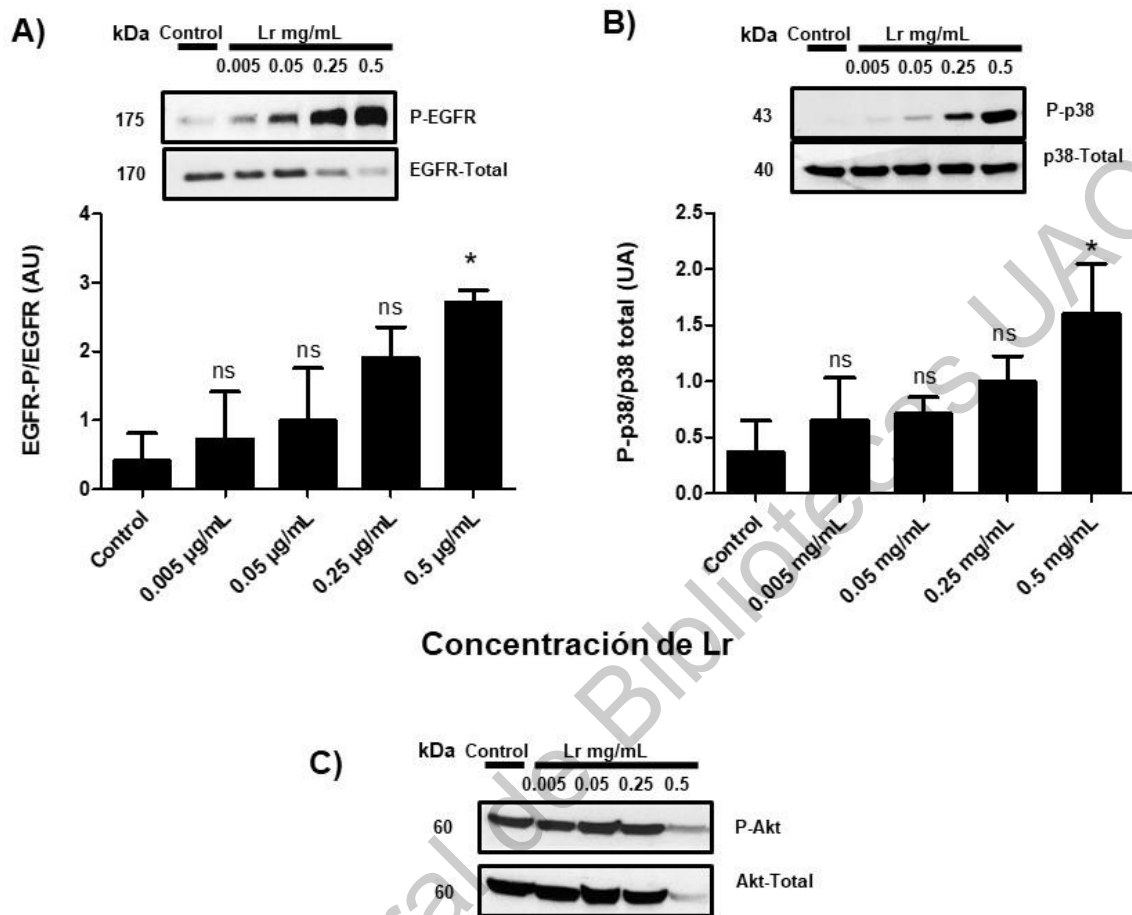
lectinas de plantas a partir de estudios *in silico* y confirmados *in vitro*. Dentro de los receptores candidatos se encuentran el EGFR, TNFR1, HSP70 y HSP90 (Shi y col., 2013).

El presente trabajo se enfocó en determinar si el efecto apoptótico de la Lr está relacionado con su interacción con el EGFR. El cual es un receptor tirosina cinasa que juega una función primordial en la proliferación celular, supervivencia y migración, su hiperactivación está vinculada con la tumorigenesis en cáncer de colon (Wee y Wang., 2017). La actividad del EGFR ha sido clave en la carcinogénesis y actualmente es un blanco terapéutico en algunos tipos de cáncer, principalmente a través del uso de anticuerpos monoclonales como cetuximab. Sin embargo, también se ha mostrado resistencia, por lo que la búsqueda de alternativas terapéuticas es importante. El efecto de lectinas sobre el EGFR ha ido estudiado en algunas líneas celulares de cáncer humano como la A431. Dentro de los acontecimientos reportados, la lectina nativa de *Artocarpus integrifolia* y su lectina recombinante a partir de la producción en *Escherichia coli*, reflejan disminución en los niveles de fosforilación del EGFR a partir de los 25 min de exposición (Sahasrabuddhe y col., 2006). Otra lectina que además de inducir apoptosis, induce autofagia de forma dependiente del EGFR es la lectina extraída de *Polygonatum odoratum*, en donde Ouyang y col. (2014) mostraron la disminución en los niveles de fosforilación del receptor, y eventualmente degradación del EGFR total. Patrón similar ocurre con proteínas río abajo del receptor y la activación de proteínas características de apoptosis. En el mismo estudio se utilizaron siRNAs contra EGFR y la apoptosis disminuyó drásticamente, lo que confirma que EGFR tiene una importante función en la inducción de apoptosis en el mismo modelo biológico.

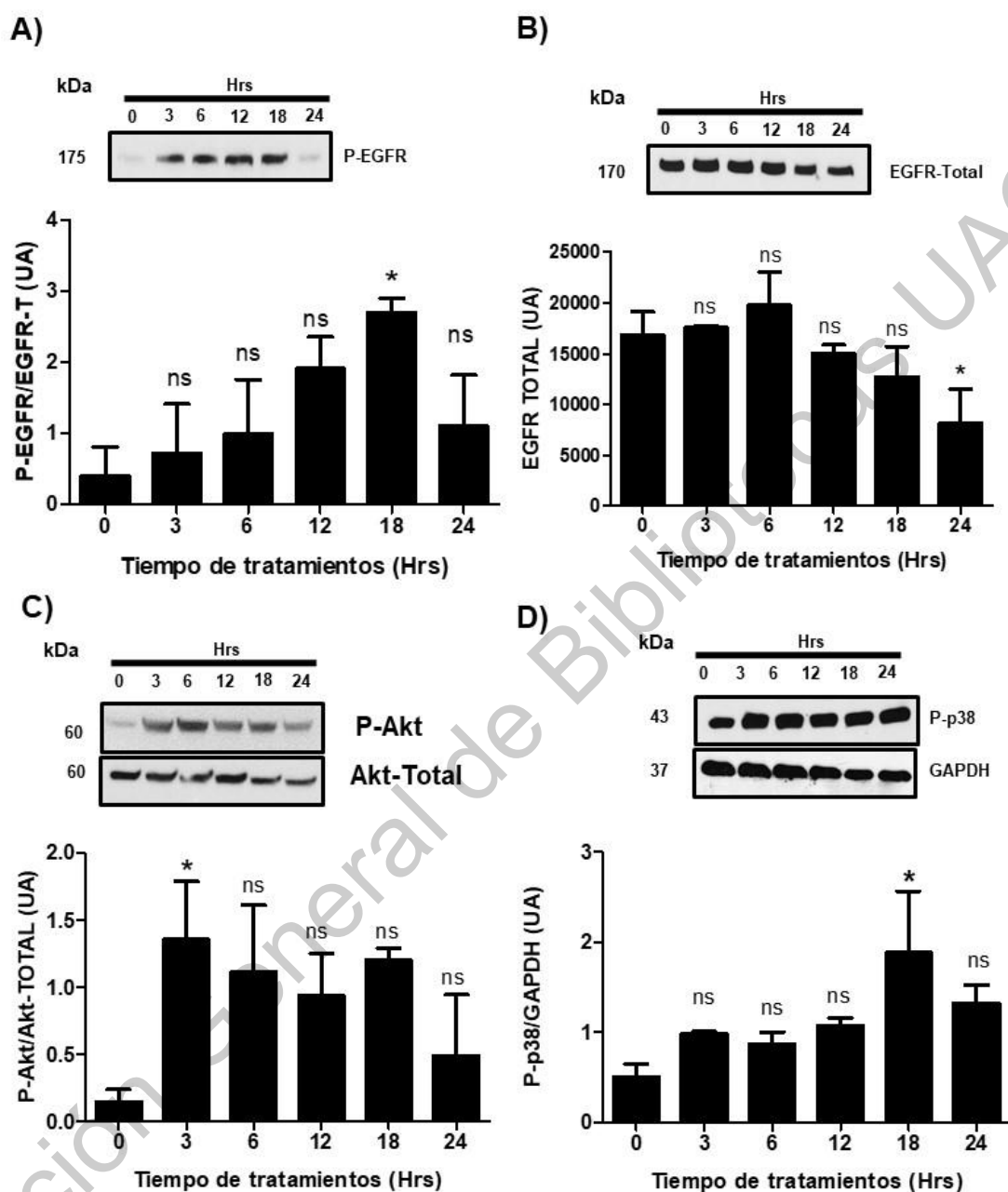
Para elucidar el mecanismo por el cual la Lr induce apoptosis, se marcó la proteína y se utilizó un microarreglo de glicanos donde se determinó que la Lr reconoce específicamente N-glicanos con ramificaciones  $\beta$  1-6 (datos no publicados), las cuales son anormalmente abundante en el EGFR de células cancerosas debido a

la desregulación de la enzima MGAT5 (alfa-1-6 manosilglicoproteína 6 beta-N-acetilglucosaminiltransferasa A).

Con la intención de corroborar una posible interacción entre Lr-EGFR, se evaluaron los niveles de fosforilación del receptor en células SW-480 tratadas con la lectina recombinante en un ensayo dosis-respuesta durante 24 h (Figura 7-A). Se muestra que la Lr induce la fosforilación del EGFR, así como la disminución de EGFR total. El efecto de esta fosforilación desencadena la modificación de cinasas río abajo de vías canónicas del EGFR como la disminución de p-Akt y de Akt-total (Figura 7-C) y aumento en los niveles de P-p38, sin afectar p-38 total (Figura 7-B). Esta última proteína es considerada señal proapoptótica, principalmente por estímulos de estrés celular (Sahasrabudde y col., 2006). Estudios en líneas celulares de cáncer han mostrado que la hiperfosforilación del EGFR, aún con su ligando principal, puede inducir a una respuesta de tipo apoptótica como se muestra en el presente trabajo (Figura 7-A). Por otra parte, la desfosforilación y degradación de Akt también se ha observado con otras lectinas como las del muérdago, dicha inhibición en la fosforilación y degradación de Akt en el presente trabajo (Figura 7-C) permite explicar la activación de proteínas río abajo, entre ellas caspasa 9 y la desfosforilación del regulador negativo de p53, MDM2 y así favorecer la expresión de genes apoptóticos (Chang y col., 2003). La interacción entre lectinas de leguminosas y el EGFR ha sido confirmado a partir del uso del EGF marcado con  $I^{125}$ , donde se muestra que hay disminución de la interacción ligando-receptor (Carpenter y Cohen, 1977; Zeng y col., 1995). A partir de esto, se consideró importante conocer la cinética de la fosforilación y degradación del EGFR, así como de proteínas río abajo, a partir de la concentración de 0.25 mg/mL de Lr en la cual se observó apoptosis previamente (Figura 6-C). Los tiempos establecidos fueron 0, 3, 6, 12, 18 y 24 h (Figura 8).



**Figura 7. Efecto de la lectina recombinante sobre la fosforilación de EGFR, p38 y Akt en células de cáncer de colon SW-480.** Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de lectina recombinante durante 24 h. A) Efecto sobre la fosforilación de EGFR; B) Efecto sobre la fosforilación de p38; C) Efecto sobre la fosforilación de Akt. (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa (Dunnet,  $p \leq 0.05$ ).

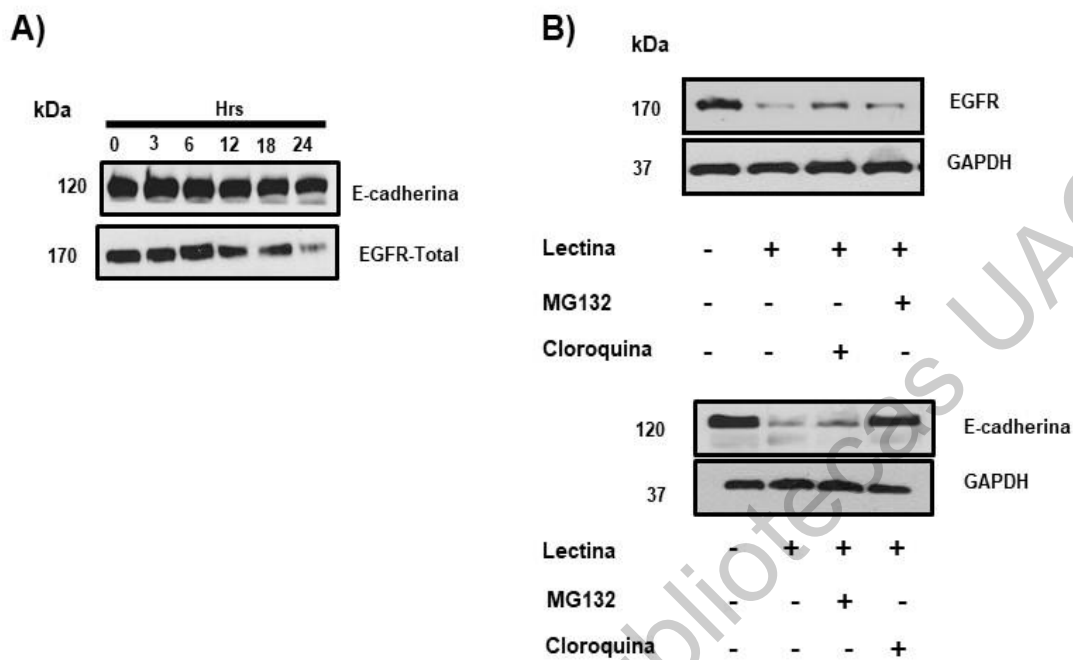


**Figura 8. Efecto de la lectina recombinante sobre la activación y degradación de vías canónicas del EGFR en células de cáncer de colon SW-480.** Las células fueron tratadas con 0.25 mg/mL de lectina recombinante a diferentes tiempos durante 24 h. A) Efecto sobre la fosforilación y degradación de p-EGFR en función del tiempo; B) Efecto sobre la fosforilación y degradación de EGFR-TOTAL en función del tiempo; C) Efecto sobre la fosforilación y degradación de p-Akt y Akt-TOTAL; D) Efecto sobre la fosforilación y degradación de p-p38 en función del tiempo. (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa (Dunnet,  $p < 0.05$ ).

La fosforilación del EGFR incrementó de forma significativa a las 18 h, pero disminuyó a las 24 (Figura 8-A), mientras que el EGFR total se observa con una

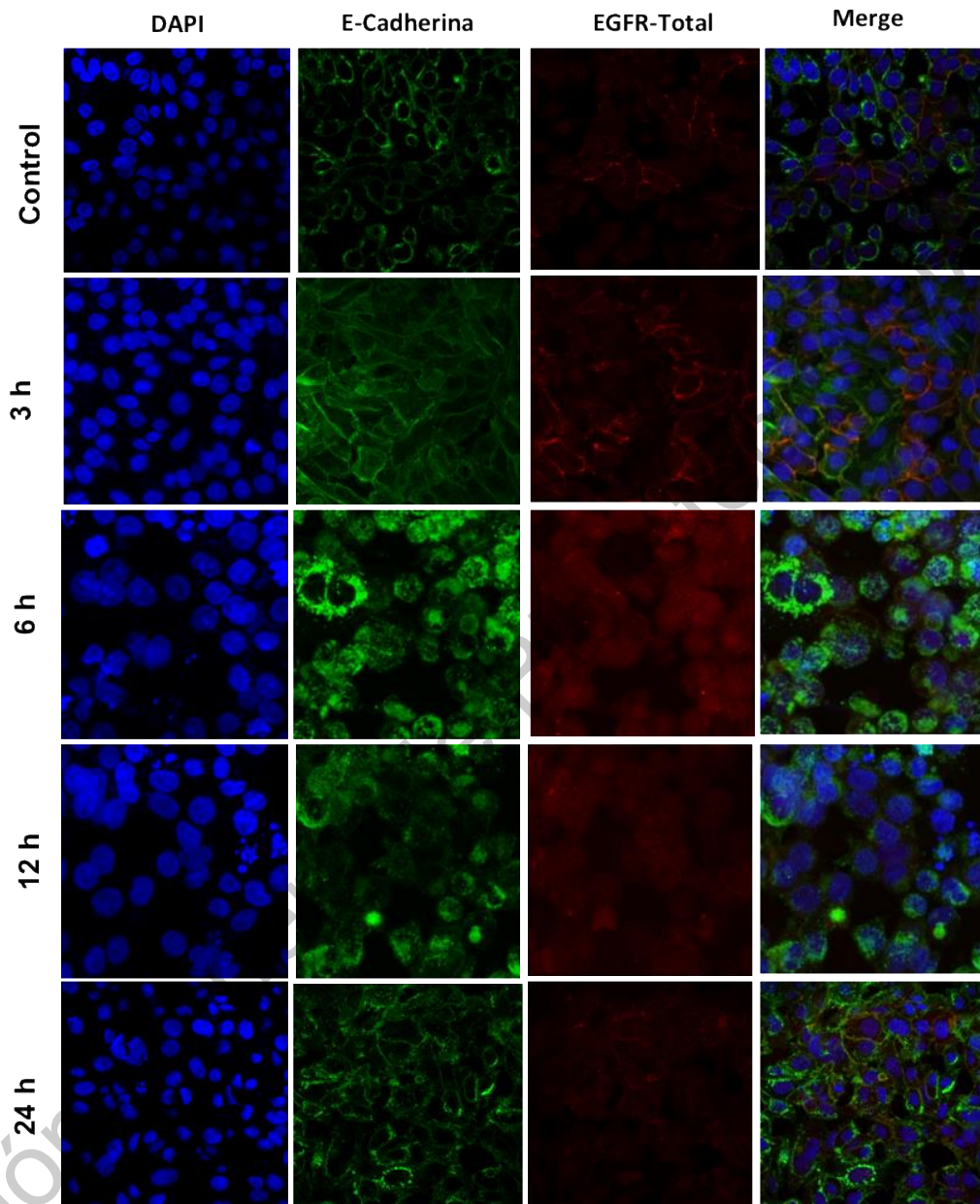
tendencia descendiente en función del tiempo (Figura 8-B), lo cual sugiere degradación. Asimismo, se evaluó Akt demostrando aumento en la fosforilación a las 3 h (Figura 8-C), pero disminuyó conforme el tiempo, mientras que Akt total disminuyó en función del tiempo (Figura 8-C). p38 también fue evaluada por su efecto proapoptótico y su fosforilación incremento de forma significativa a las 18 h y disminuida a las 24.

Para determinar la vía por la cual se degrada el EGFR se utilizaron dos inhibidores; MG132 (10 nM) el cual inhibe la degradación por vía proteasomal y cloroquina (250  $\mu$ M) para la inhibición de la vía lisosomal (Figura 9). De acuerdo con los resultados obtenidos en el curso temporal (Figura 8), se consideró el tiempo en el cual comienza la degradación del EGFR total, que fue a las 18 h. Los inhibidores se administraron 6 h antes de cumplir 24 h de tratamiento con la Lr (0.25 mg/mL) y evitar así una degradación de forma significativa del EGFR. Los resultados sugieren que la degradación de EGFR es por vía lisosomal ya que, al inhibir esta vía, aumentó la recuperación del EGFR total en comparación al grupo tratado con la Lr o Lr-MG132 (Figura 9-B). Este resultado es fundamental si se considera que la vía de degradación por proteasoma está relacionada al reciclado de receptores, y representaría un efecto temporal, tal como se ha reconocido con la exposición a radioterapia (Kawaguchi y col., 2012).



**Figura 9. Efecto de la Lr sobre la degradación de EGFR en células de cáncer de colon SW-480.** Las células fueron tratadas con 0.25 mg/mL A) Inmunoblots los tratamientos a diferentes tiempos, efecto sobre E-Cadherina y EGFR; B) Inmunoblots de los tratamientos utilizando los inhibidores MG132 (10 nM) y Cloroquina (250  $\mu$ M).

Para complementar esta información y descartar la internalización y degradación temporal del EGFR, se realizó un análisis de microscopía confocal a 3, 6, 12 y 24 horas después del tratamiento de las células con Lr (0.25 mg/mL). Esto permitió observar la desaparición del receptor a partir de 6 h de tratamiento (Figura 10).

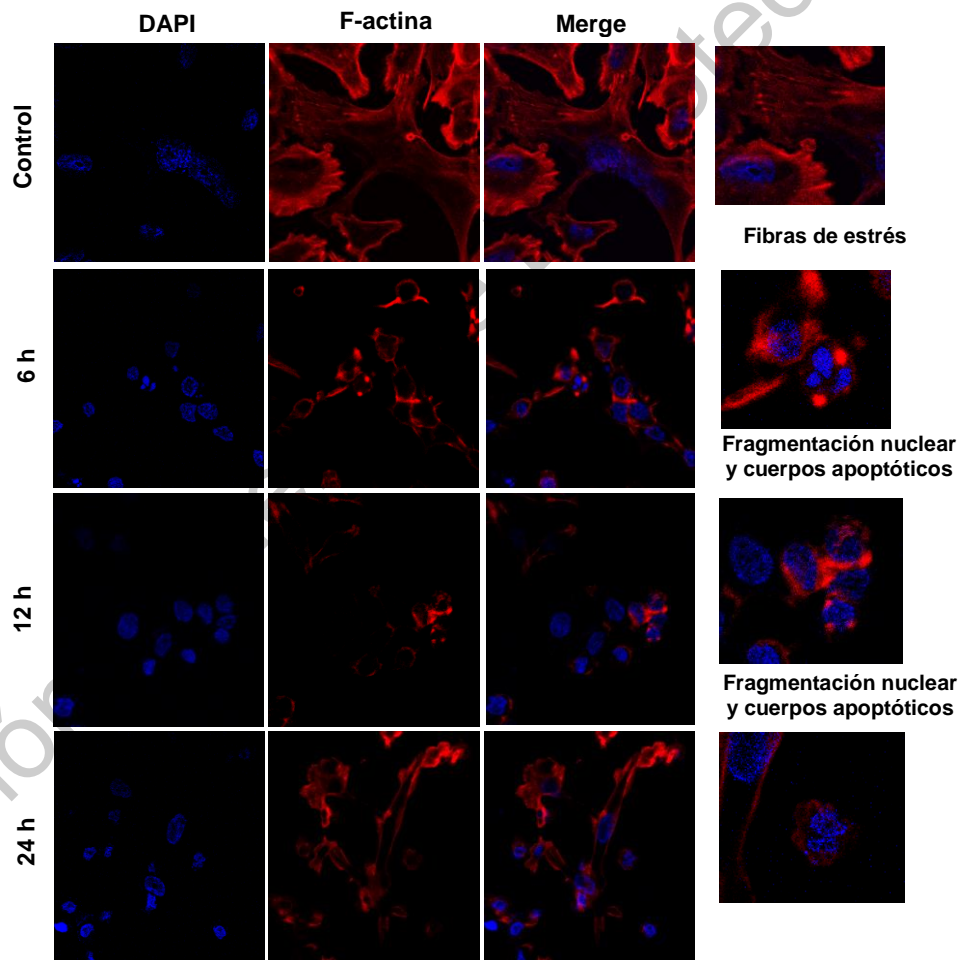


**Figura 10. Internalización y degradación del EGFR en células de cáncer de colon SW-480 tratadas con la Lr.** Las células fueron tratadas con 0.25 mg/mL de lectina recombinante a diferentes tiempos durante 24 h. Se muestra el inmunoblot para E-Cadherina y para EGFR-Total. Las células se observaron en un microscopio confocal (Leica TCS SP) a 40x

Se observa que la degradación del EGFR es dependiente del tiempo y puede ser considerada como una saturación del sistema. Investigaciones realizadas con el cisplatino muestran que en células de cáncer de colon SW-480 y DLD-1, la exposición a UV-C permite la internalización y reciclado del EGFR, pero cuando se



expone posteriormente a cisplatino hay una degradación (Kawaguchi y col., 2012). Asimismo, el presente trabajo muestra que la lectina de forma individual es capaz de inducir la degradación del receptor. Se consideró evaluar a E-Cadherina (proteína de adhesión célula-célula) por su relación en eventos de mecanotransducción con el EGFR y que desencadenan modificaciones en la polaridad y por ende en la citoarquitectura (Rubsam y col, 2017). No se encontró relación entre ambas proteínas membranales, pero si una modificación en la morfología celular la cual se muestra a partir de la detección de F-actina (Figura 11).

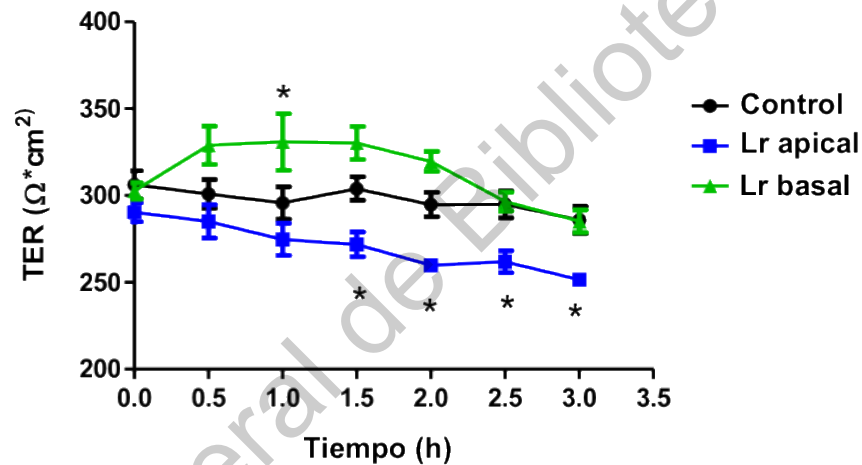


**Figura 11. Cambios en la morfología de células de cáncer de colon SW-480 tratadas con la Lr.** Las células fueron tratadas con 0.25 mg/mL de lectina recombinante a diferentes tiempos 0, 6, 12 y 24 h. Se muestra modificación en F-actina la cual fue observada con faloidina, los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las imágenes se observaron en un microscopio confocal LSM 510+ Laser Multifotónico con un aumento 100x.

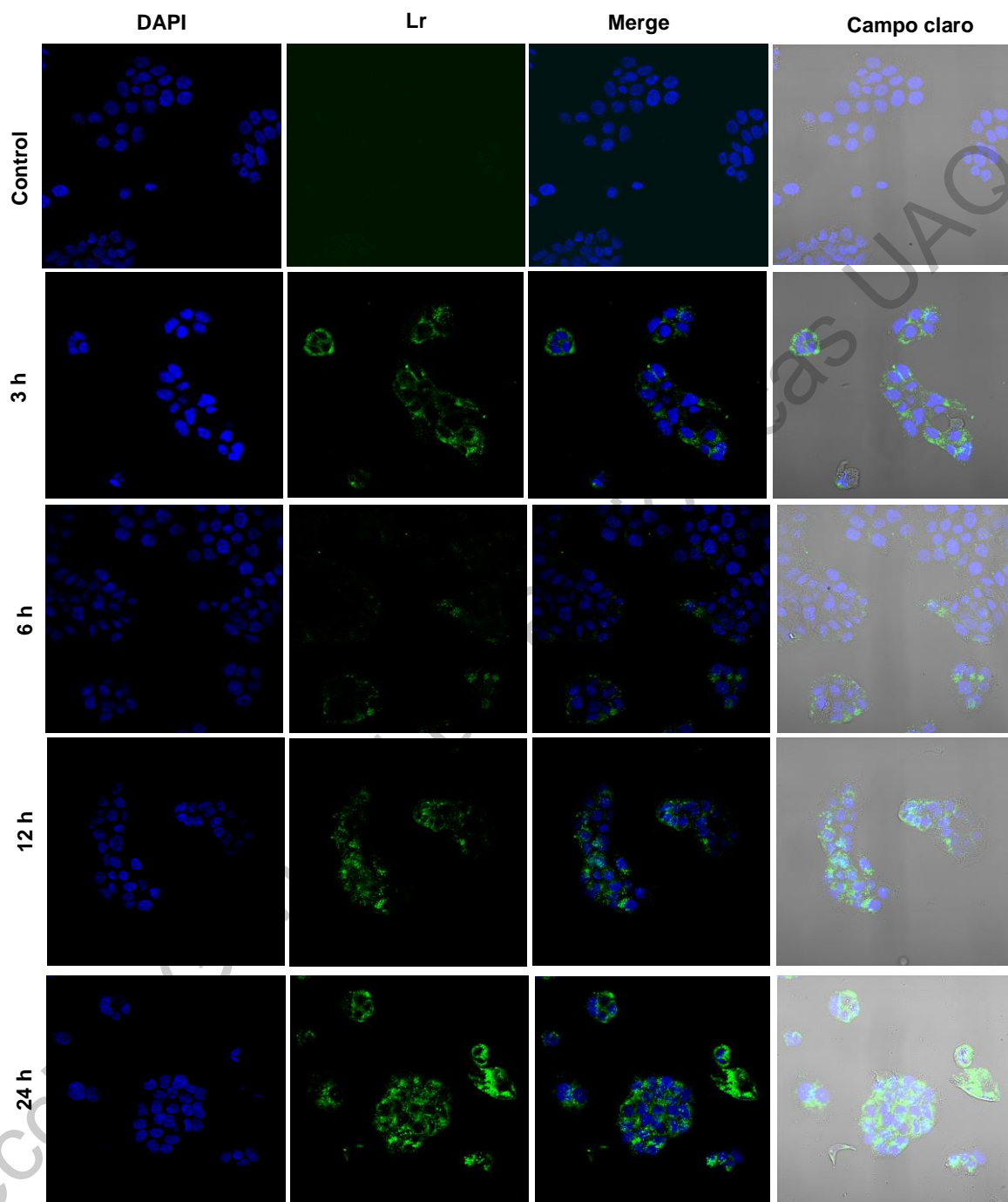
En el grupo control las células SW-480 se muestran de forma mesenquimal y se logran apreciar fibras de estrés que son características de células cancerosas, mientras que en las células tratadas con Lr a diferentes tiempos se reconoció fragmentación nuclear y cúmulos de F-actina que puede hacer referencia a la contracción de actina que ocurre dentro de los cuerpos apoptóticos y es derivada de la activación de proteínas como ROCK durante la apoptosis (Taylor y col, 2008).

Dado que la Lr puede ser considerada una alternativa terapéutica, fue importante realizar como parte de análisis citómico, su localización por microscopia confocal y efecto sobre la permeabilidad intestinal mediante resistencia eléctrica transepitelial (TER) en células CaCo2, las cuales exhiben morfología y funciones similares a enterocitos intestinales como microvellosidades, uniones estrechas y enzimas que en conjunto dan un parámetro de la permeabilidad celular. En algunos casos se han utilizado a las lectinas para incrementar la permeabilidad intestinal y facilitar el transporte paracelular de otros compuestos con baja absorción, como ha sido el uso de las lectinas WGA y CGA, que incrementaron el transporte de isoflavonas y glicósidos de quercetina, por ello han sido consideradas como suministradores de fármacos (Ohno y col., 2006). En la Figura 12 se observa que la Lr presentó disminución de la TER a partir de 1.5 h de forma significativa hasta las 3 h en la parte apical, lo que significa un aumento de la permeabilidad paracelular. Sin embargo, un efecto contrario se observó a partir de la exposición de la Lr en la zona basolateral donde en los primeros tiempos hubo resistencia de forma significativa en la primera hora y eventualmente descendió de forma no significativa. La monocapa celular permite tener información preliminar de la absorción de nutrientes y fármacos, principalmente en la mucosa intestinal. Posiblemente la disminución de la TER en la zona apical esté dada por la capacidad de interacción con receptores de membrana o interacción con glicocompuestos que favorezcan la desestabilización de las uniones estrechas y, por ende, aumento en la permeabilidad, efecto contrario al tratar las células de manera basolateral, donde la TER aumentó. El efecto sobre las uniones estrechas y aumento en la permeabilidad

intestinal puede ser por una posible interacción de la Lr con las propias uniones estrechas o por la unión a receptores que modifican el ensamblaje entre proteínas célula-célula como puede ser la cinasa Src, la cual se encuentra río abajo del EGFR y su activación favorece la desestabilización de uniones celulares (Basuroy y col., 2003). Dicho resultado se complementa con la localización de la Lr en células HT-29 (Figura 13), en el cual se logra observar en la membrana celular con aumentos de fluorescencia en regiones de célula-célula, sin embargo, no se debe descartar una internalización por vacuolas por la posible unión con el EGFR.



**Figura 12. Disminución en la resistencia transepitelial en células CaCo2 tratadas con lectina recombinante.** Las células fueron tratadas en la zona apical y basolateral con 0.014 mg/mL y 0.0093 mg/mL de Lr, respectivamente. Las lecturas se realizaron cada 30 min durante 3 h. (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa (Bonferroni  $p \leq 0.05$ ).

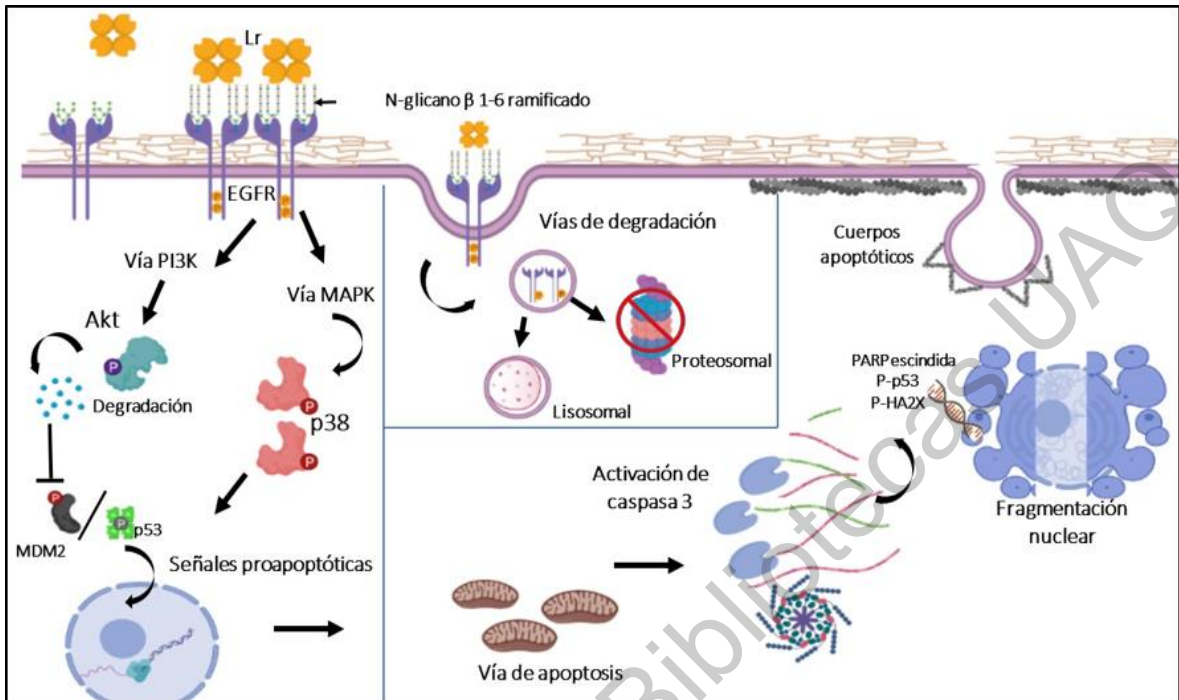


**Figura 13. Localización de la Lr sobre HT-29.** Los núcleos fueron teñidos con DAPI, la lectina usando anticuerpo primario anti-his y secundario Alexa 488. Las fotos fueron observadas a 40x en un microscopio confocal LSM 510+ Laser Multifotónico.

La integración de los resultados permitió proponer el siguiente mecanismo de acción, a partir de moléculas centrales en las vías canónicas del EGFR: PI3K y MAPK. Relacionando los estudios previos con la FCL (Ferriz-Martínez y col., 2015) y parte de los presentes con la Lr, se reconoce que los efectos biológicos son a partir de una exposición Lr-zona apical de células intestinales. Es fundamental para la descripción del dicho mecanismo, mencionar que las células intestinales mantienen una polaridad y una alta inmunidad que al presentar un xenobiótico como son la FCL o Lr, haya respuesta por parte del sistema inmune que puede derivar en inflamación (Klunder y col., 2016).

La polaridad celular permite la compartalización apico-basolateral de receptores como el EGFR, el cual se encuentra en su mayoría distribuido en la zona basolateral de las células intestinales (Gray y col., 1989). Sin embargo, como los hallazgos de TER muestran y la localización de la Lr por inmunodetección; existe aumento en la permeabilidad intestinal y presencia de la Lr en zonas célula-célula, que compromete por ende la polaridad y así una interacción de la Lr con el receptor. Asimismo y para complementar la interacción Lr-receptor, se ha comprobado que los complejos proteicos que convergen para mantener la polaridad, tienen menor expresión en células cancerosas, en las cuales también se ha reconocido movilización de algunos receptores como el EGFR hacia la zona apical o en el frente de migración celular (Tanos y Rodríguez-Boulan, 2008). En nuestro modelo *in vitro* a partir de las líneas celulares HT-29 y SW-480, la movilización del receptor hacia la zona apical favorece la interacción Lr-EGFR, que se realiza de forma específica por la unión con glicanos como N-glicano  $\beta$  1-6, ramificado presentes en el dominio extracelular del receptor.

La interacción de la Lr-EGFR modula proteínas como Akt y p38. La recopilación de resultados muestran que hay fosforilación del receptor y eventualmente degradación por vía lisosomal. La transducción de señales a partir de receptores membranales involucran un constante apagado/encendido de proteínas río abajo.



**Figura 14. Mecanismo de acción propuesto de la Lr sobre células de cáncer de colon.** La Lr induce apoptosis dependiente de caspasas mediante la interacción y eventual degradación del EGFR presente en células de cáncer de colon.

Las cuales Akt considerada como una cinasa maestra, se encuentra activa a diferentes horas del inicio del tratamiento con la Lr, pero que termina en su degradación. Efecto contrario ocurrió con p38, que su activación aumenta dependiente del tiempo de exposición con la Lr y su expresión no se ve afectada.

La disminución EGFR/Akt, desencadena la activación de proteínas que dan lugar al mecanismo de apoptosis como p53 y p38. Una de las caspasas que inician la apoptosis es la 9, que estudios previos con la FCL muestran aumento en su expresión. La caspasa 9 forma parte de la vía intrínseca y permite la activación de caspasas ejecutoras como se comprobó con la caspasa 3. El mecanismo de apoptosis inducido por la Lr, es dependiente de caspasas y se muestra a partir de los diferentes sustratos moleculares de caspasa 3; considerados marcadores apoptóticos como fue la fragmentación nuclear, cuerpos apoptóticos y exposición de fosfatidilserina.

## VIII. CONCLUSIONES

La Lr induce arresto de ciclo celular en la fase G0/G1 y disminución de fase S sobre células de cáncer de colon HT-29 e induce apoptosis de manera similar a la fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari, por lo que se considera que la Lr conserva la actividad biológica de las lectinas contenidas en la FCL.

Fue posible determinar que uno de los mecanismos de acción de la Lr está relacionado con su interacción con el EGFR, lo que provoca su degradación por vía lisosomal en células de cáncer de colon. La participación del EGFR fue corroborada a partir de la determinación del efecto sobre células CHO-K1 carentes de dicho receptor.

Mediante el ensayo de TER fue posible determinar que la Lr aumenta la permeabilidad intestinal por la zona apical, posiblemente por la interacción con proteínas presentes en uniones célula-célula.

Los resultados obtenidos muestran evidencia del efecto apoptótico de Lr mediante la interacción con el EGFR y la vía de señalización Akt en células de cáncer de colon. Futuros estudios abordarán el efecto *in vivo* sobre cáncer de colon.

## IX. LITERATURA CITADA

- Anastácio, G. S., Santos, K. O., Suarez, P. A., Torres, F. A., De Marco, J. L., Parachin, N. S. (2014). Utilization of glycerin byproduct derived from soybean oil biodiesel as a carbon source for heterologous protein production in *Pichia pastoris*. *Bioresource Technology*, 152, 505-510.
- Ang, A. S., Fai, R. C., Dan, X., Chan, Y., Pan, W., Ng, T. (2014). Purification and characterization of a glucosamine-binding antifungal lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. Chinese Pinto Beans with antiproliferative activity towards nasopharyngeal carcinoma cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(2), 672-686.
- Ángeles Zaragoza MV. (2010). Caracterización del efecto citotóxico de un concentrado de lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células de cáncer de colon (HT-29). Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Araújo, L.C.C., Aguiar, J.S., Napoleão, T.H., Mota, F.V.B., Barros, A.L.S., Moura, M.C., Coriolano, M.C., Coelho, L.C., Barroso, B., Silva, T. (2013). Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. *PLoS ONE*, 8(12), 1-15.
- Ardekani, A. M., Jabbari, S. (2009). Nutrigenomics and Cancer. *Journal of Medical Biotechnology*, 1(1),9-17.
- Basuroy, S., Sheth, P., Kuppuswamy, D., Balasubramanian, S., Ray, R., Rao, R. (2003). Expression of Kinase-inactive c-Src Delays Oxidative Stress-induced Disassembly and Accelerates Calcium-mediated Reassembly of Tight Junctions in the Caco-2 Cell Monolayer. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 11916-11924.
- Bradford MA. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 7 (72), 248-54.
- Bray, F., Ferlay, Jacques, Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and



- Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Cancer Journal for Clinicians*, 68, 394-424.
- Bustamante, L. M., Marín, S. J., Cardona, D. (2002). Mortalidad por cáncer: segunda causa de muerte del adulto mayor en Medellín, 2002-2006. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 30(1), 17-25.
- Carpenter, G., Cohen, S. (1977). Influence of lectins on the binding of 125I labeled EGF to human fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 79(2), 545-552.
- Chang, C.P., Yang, M.C., 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.
- Chang, T., Lee, J., Navolanic, P., Steelman, L., Shelton, J., Blalock, W., McCubrey, J. (2003). Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Molecular Targets for Therapy (MTT)*, 17, 590-603.
- Devi, P. (2004). Basics of Carcinogenesis. *Health Administrator*, 1, 16-24.
- Díaz, P. H., Pablos Vélez, O. M., y Ganem Báez, C. F. (1999). Aplicaciones de las lectinas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 15(2), 91-95.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *National Institutes of Health*, 35(4), 495-516.
- Fabregat, I., y Gil, J. (2009). Desregulación de la apoptosis en tumores colorrectales y hepáticos. *Gastroenterología y Hepatología Continuada*, 8(1), 28-31.
- Ferriz-Martínez, R.A. 2015. Caracterización del efecto citotóxico de un concentrado de lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre cáncer de colon. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Ferriz-Martínez, R., García-García, K., Torres-Arteaga, I., Rodríguez-Mendez, A., Guerrero-Carillo, M., Moreno-Celis, U., Ángeles-Zaragoza, Marco Vinicio., Blanco-Labra, Alejandro., Gallegos-Corona, Marco Alonso., Robles-Álvarez, Juan Pablo., Mendiola-Olaya, Elizabeth., Andrade-Montemayor, Héctor

- Mario., García, Olga Patricia.,García-Gasca, T. (2015). Tolerability assessment of a lectin fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats. *Toxicology Reports*, 2, 63-69.
- Ferriz-Martinez, R., Torres, I., Blanco, A., y Garcia, T. (2010). The role of plant lectins in cancer treatment. Mejia C. Navarro S, Nova Sci Publisher, Inc. *In: New Approaches in the Treatment of Cancer* (71-89). New York.
- Franco Vera, L. (2014). Las Bases Moleculares Del Cáncer. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 107(2), 161-176.
- García-Gasca, T., García-Cruz, M., Hernandez-Rivera, E., López-Matínez, J., Castañeda-Cuevas, Ana L., Rodríguez-Méndez, A., Blanco-Labra, A. (2012). Effects of Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) protease inhibitor and semipure lectin fractions on cancer cells. *Nutrition and cancer*, 64(8), 1269-78.
- Gondim, A.C.S., Romero-Canelón, I., Sousa, E.H.S., Blindauer, C.A; Butler, J.S., Romero, M.J., Sanchez-Cano, C., Sousa, B.L., Chaves, R.P., Nagano, C.S., Cavada, B.S., Sadler, P.J. (2017). The potent anti-cancer activity of Dioclea lasiocarpa lectin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 175, 179-189.
- González Contreras, Q. y Bahena Aporte (2010). Cáncer de colon. *Gastroenterología de México*, 75(1), 65-68.
- Gray, G., Nguyen, T., Shiurba, R., & Scheving, L. (1989). Epidermal Growth Factor Receptor of the Intestinal Enterocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(3), 1735-1741.
- Hamelryck, T., Dao-Thi, M.-H., Poortmans, F., Chrispeels, M., Wyns, L., Remy, L. (1996). The crystallographic Structure of Phytohemagglutinin-L. *The journal of Biological Chemistry*, 271(34), 20479-20485.
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hernández Cruz, P., Pérez Campos, E., Martínez Martínez, L., Ortiz, B., y Martínez, G. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Educación Bioquímica*, 24(1), 21-27.

- INSP. (2015). Instituto Nacional de Salud Pública. Disponible en: <https://www.insp.mx/infografias/cancer-colon-recto.html>
- Jaffe, W. (1980). Hemmagglutinins. In I. Liener (Ed.), *Toxic constituents of plant foodstuffs* (pp. 77–102). New York: academic press inc.
- Kawaguchi, J., Adachi, S., Yasuda, I., Yamauchi, T., Nakashima, M., Ohno, T., Moriwaki, H. (2012). Cisplatin and ultra-violet-c synergistically down-regulate receptor tyrosine kinases in human colorectal cancer cells. *Molecular Cancer*, 11(45).
- Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J., y Kroemer, G. (2011). Cell death assays for drug discovery. *nature reviews Drug Discovery*, 10, 221-237.
- Khil, L.-Y., Kim, W., Lyu, S., Park, W., Yoon, J.-W., Jun, H.-S. (2007). Mechanisms involved in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis of cancer cells. *World J Gastroenterol*, 13(20), 2811-2818.
- Klunder, L. J., Faber, K. N., Dijkstra, G., Ijzendoorn, S. C. (2016). Mechanisms of Cell Polarity-Controlled Epithelial Homeostasis and Immunity in the Intestine. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., Aster, J. (2010). *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional* (259-330) (Octava ed.). Elsevier. Barcelona, España.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227,680-685.
- Lagarda-Díaz, I., Guzman-Partida, A. M., Vazquez-Moreno, L. (2017). Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1242.
- Lam, Z. K., Ng, T. B. (2010). First report of a haemagglutinin-induced apoptotic pathway in breast cancer cells. *Bioscience Reports*, 30(5), 307-317.
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., y Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168(4), 670-691.

- Lannoo, N., Vervecken, W., Proost, P., Rougé, P., Damme, E. (2007). Expression of the nucleocytoplasmic tobacco lectin in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 53(2), 275-282.
- Liu, B., He-Jiao, B., & Jin-Ku, B. (2010). Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters*, 287, 1-12.
- Luo, S., Zhangsun, D., Tang, K. (2005). Functional GNA expressed in *Escherichia coli* with high efficiency and its effect on *Ceratovacuna lanigera* zehntner. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(2), 184-191.
- Lyu, S. Y., Park, W. B., Choi, K. H., Kim, W. H. (2001). Involvement of Caspase-3 in Apoptosis Induced by *Viscum album* var. *coloratum* Agglutinin in HL-60 Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(3), 534-541.
- Madureira de Freitas Junior, J. C., Morgado-Díaz, J. A., 2015. The role of N-glycans in colorectal cancer progression: potential biomarkers and therapeutic applications. *Oncotarget*, 7(15), pp. 19395-19413.
- Martínez-Alarcón, D. (2017). Producción de una lectina recombinante de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) con efecto citotóxico sobre células de cáncer de colon. Tesis, CINVESTAV-Irapuato.
- Martínez-Alarcón, D., Blanco-Labra, A., y García-Gasca, T. (2018). Expression of lectins in heterologous systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 600-616.
- Marzo, F., Milagro, F., Urdaneta, E., Barrenetxe, J., Ibañez, F. (2011). Extrusion decreases the negative effects of kidney bean on enzyme and transport activities of the rat small intestine. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95, 591-598.
- Micucci, H. A., Camps, E. (1987). Lectinas: Obtención, estructura Química, Propiedades y Aplicaciones Diagnóstica y Farmacológicas. *Acta Farmacognosia*, 6(1), 35-54.
- Moreno Celis, U., López Martínez, J., Blanco Labra, A., Cervantes Jiménez, R., Estrada-Martínez, L.-E., García-Pascalín, A., De Jesús Guerrero-Carrillo, María., Rodríguez-Méndez, Adriana Jheny; Mejía, Carmen., Ferríz-Martínez, Roberto Augusto., 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, 1670.
- Morin, P. J., Weeraratna, A. T. (2003). The APC tumor suppressor pathway. *Methods in molecular biology*, 222(9), 21-40.
- Moshiri, M., Hamid, F., Etemad, L. (2016). Ricin Toxicity: Clinical and Molecular Aspects. *Reports of biochemistry & molecular biology*, 4(2), 60-5.
- Nakata, S., Kimura, T. (1985). Effect of Ingested Toxic Bean Lectins on the Gastrointestinal Trac in the Rat. *Journal of Nutrition*, 115, 1621-1629.
- Naselli, F., Belshaw, N. J., Gentile, C., Tutone, M., Tesoriere, L., Livrea, M. A., Caradonna, F. (2015). Phytochemical Indicaxanthin Inhibits Colon Cancer Cell Growth and Affects the DNA Methylation Status by Influencing Epigenetically Modifying Enzyme Expression and Activity. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 8(3), 114-127.
- Ohno, Y., Naganuma, T., Ogawa, T., Muramoto, K. (2006). Effect of Lectins on the Transport of Food Factors in Caco-2 Cell Monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 548-553.
- OMS. (2017). Organización Mundial de la Salud. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Oliveira, C., Nicolau, J., Domingues, L. (2011). Cytotoxic effects of Native and Recombinant Frutalin, a plant Galactose-Binding Lectin, on Hela Cervical Cancer Cells. *Journal of Biomedicine Biotechnology*, 2011, 1-9.
- Oliveira, C., Teixeira, J., Domingues, L. (2014). Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application the frutalin case study. *Frontiers in Plant Science*, 1-6.
- Olsnes, S., Refsns, K., y Pihl, A. (1974). Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. *Nature*, 249, 627-631.
- Ouyang, L., Chen, Y., Xiao-yan, W., Rui-Feng, L., Shou-yeu, Z., Mao, T., Gu, H. (2014). Polygonatum odoratum lectin induces apoptosis and autophagy

viatargeting EGFR-mediated Ras-Raf-MEK-ERK pathway in human MCF-7 breast cancer cells. *Phytomedicine*, 21, 1658-1665.

Patel, A., Hafez, E., Elsaid, F., y Amanuallah, M. (2014). Anti-cancer action of a new recombinant lectin produced from *Acacia* species. *Journal of Medicine and Medical Sciences*, 5(1), 1-11.

Pereira-da-Silva, G., Carvalho, C. F., y Roque-Barreira, M. C. (2012). Neutrophil Activation Induced by Plant Lectins: Modulation of Inflammatory Processes. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 11(6), 433-441.

Raemaekers, R., Muro, L., Gatehouse, J., Skelton, A. (1999). Functional phytohemagglutinin (PHA) and Galanthus nivalisagglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris* Correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. *European Journal of Biochemistry*, 265, 394-403.

Raya Pérez, J. C. (2006). Las Bases Moleculares del Cáncer. *Acta Universitaria* , 16(1), 40-49.

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273(10): 5858–68.

Ryder, S., Smith, J., Rhodes, E., Parker, N., y Rhodes, J. (1994). Proliferation Responses of HT29 and Caco2 Human Colorectal Cancer Cells to a Panel of Lectins. *Gastroenterology*, 106(1), 85-93.

Rubsam, M., Mertz, A., Kubo, A., Marg; S., Jungst, C., Goranci-Buzhala, G., Schauss, A., Horsley, V., Dufresne, E., Moser, M., Ziegler, W., Amagai, M., Wickstrom, S., Niessen, C. (2017). E-cadherin integrates mechanotransduction and EGFR signaling to control junctional tissue polarization and tighy junction positioning. *Nature Communications*, 8, 1250.

Sahasrabuddhe, A. A., Ahmed, N., Krishnasastry, M. (2006). Stress-induced phosphorylation of caveolin-1 and p38, and down-regulation of EGFr and ERK by the dietary lectin jacalin in two human carcinoma cell lines. *Cell Stress & Chaperones*, 11(2), 135-147.

- Sandvig, K., y Van Deurs, B. (2002). Transport of protein toxins into cells: Pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Letters*, 529(1), 49-53.
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., y Longacre, M. (2013). Cancer development, progression, and therapy: An epigenetic overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 21087-21113.
- Satomi, Y., Kiyotsugu Y. (2018). Tumor suppressive role for kinases phosphorylating p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Science*, 109(11):3376-3382
- Serrano-Rivero, Y., Fando-calzada, K., Marrero-Domínguez, R. (2016). Pichia pastoris: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *CENIC. Ciencias Biológicas*, 47(2), 67-77.
- Sharon, N. (2008). Lectins: past, present and future. *Biochemical Society Transactions*, 36(6), 1457-1460.
- Sharon, N., y Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11), 53-62.
- Shi, Z., An, N., Zhao, S., Li, X., Bao, J., Yue, B. (2013). In silico analysis of molecular mechanisms of legume lectin-induced apoptosis in cancer cells. *Cell Proliferation*, 46, 86-96.
- Siu-Fun Wong, P. (2005). Cetuximab: An epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody for the treatment of colorectal cancer. *Clinical Therapeutics*, 27(6), 684-694.
- Sigismund, S., Avanzato, D., Lanzetti, L. (2017). Emerging functions of the EGFR in cancer. *Molecular Oncology*, 12, 3-20.
- Tanos, B., Rodriguez-Boulan, E. (2008). The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer. *Oncogene*, 27, 6939-6957.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J. (2008). Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 231-241.

- Thompson, H. J., McGinley, J. N., Neil, E. S., Brick, M. A. (2017). Beneficial effects of common bean on adiposity and lipid metabolism. *Nutrients*, 9(9), 1-12.
- Turner R, Liener I. 1975. The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. *Analytical Biochemistry*. 68:651-653.
- Valadez Vega, C., Alvarez Manilla, G., Riverón Negrete, L., Garcia Carrancá, A., Morales González, J., Zuñiga Pérez, C., Villagómez Ibarra, R. (2011). Detection of cytotoxic activity of lectina on human colon adenocarcinoma (SW480) and epithelial cervical carcinoma (C33-A). *Molecules*, 16.
- Vervecken, W., Kleff, S., Pfüller, U., Büssing, A. (2000). Induction of apoptosis by mistletoe lectin I and its subunits. No evidence for cytotoxic effects caused by isolated A- and B-chains. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 32(3), 317-326.
- Very, N., Lefebvre, T., El Yazidi-Belkoura, I. (2018). Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(1), 1380-1402.
- Walsh, G. (2010). Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discovery Today*, 15(17), 773-780.
- Watson, A. J. (2004). Apoptosis and colorectal cancer. *Gut*, 53, 1701-1709.
- Wee, P., y Wang, Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *cancers*, 9(52).
- Xiao-Lan, L., Jianbiao, Z., Zhi-Rong, C., Wee-Joo, C. (2015). p53 mutations in colorectal cancer-molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World Journal of Gastroenterology*, 21(1), 84-93.
- Yau, T., Dan, X., Ng, W. N., Bun Ng, T. (2015). Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules*, 20(3), 3791-3810.
- Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2006). Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 103(48): 18314–9.



Zeng, F.-Y., Bengurìa, A., Kafert, S., André, S., Gabius, H.-J., Villalobo, A. (1995). Differential response of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinas activity to several plant and mammalian lectins. *Molecular and Celllar Biochemistry*, 142, 117-124.

Zhang, L., Yu, J. (2013). Role of apoptosis in colon cancer biology, therapy, and prevention. *Current Colorectal Cancer Reports*, 9(4), 1-14.

Dirección General de Bibliotecas UAO