



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Clínica Integral

**Evaluación toxicológica de una Lectina
Recombinante de Frijol Tépari (*Phaseolus
acutifolius*) en ratas Sprague Dawley**

TESIS

Como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Nutrición Clínica Integral

Presenta
Misael Rios Ortiz

Dirigido por
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Santiago de Querétaro
Noviembre 2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Clínica Integral

**Evaluación toxicológica de una Lectina Recombinante de Frijol
Tépari (*Phaseolus acutifolius*) en Ratas Sprague Dawley**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Nutrición Clínica Integral

Presenta

L.N. Misael Rios Ortiz

Dirigido por:

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Presidente

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Secretario

Dr. Jorge Luis Chávez Servín
Vocal

Dra. Karina de la Torre Carbot
Suplente

Dr. Roberto Esquivel García
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre, 2022
México

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mi familia, en especial a mis padres, quienes me han apoyado en cada paso que doy, por sus consejos, por su amor y porque a pesar de la distancia siempre los sentí muy cerca de mí, los quiero mucho y los amo.

A mis hermanos, Elvia, Mary, Chay, y Antonio por ser parte de esta aventura, por sus visitas y apoyo incondicional.

Con mucho cariño a mi directora de tesis la Dra. Teresa García Gasca, por confiar en mí y dejarme ser parte de este proyecto. Estoy totalmente agradecido y me siento afortunado de ser parte de sus tesis, mil gracias.

A mis compañeras y amigas de la Maestría en Nutrición Clínica Integral por ser parte de esta aventura y porque gracias a ustedes disfruté mi paso durante este proceso: Cris, Meli, Yazz, Rox, Diana, Dany, Vicky, Yan y Elidé.

Agradezco a Dios por permitirme recorrer este camino, por ponerme con las personas correctas, por enseñarme y darme esta oportunidad de concluir esta maestría.

**“La educación es el arma más poderosa para cambiar el mundo “
-Nelson Mandela-**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Teresa García Gasca por confiar en mí y permitirme pertenecer a su grupo de trabajo. Por cada uno de sus consejos brindados y principalmente por compartir parte de su experiencia, además de contagiar y promover la pasión por la investigación...un gran ser humano.

A la Dra. Dulce Palmerín Carreño por compartir su conocimiento, lo cual fue sumergirme en un mundo nuevo, gracias por su paciencia, por la enseñanza y por generar en mí entusiasmo y nuevo conocimiento. Por cada consejo tanto académico como personal. Mil gracias.

Al Dr. Roberto Esquivel García quien contribuyo de gran manera en esta investigación en todo momento. Gracias por sus enseñanzas; apoyo técnico, manejo de animales y análisis estadístico. Excelente ser humano.

A cada uno de los sinodales, a la Dra. Karina Carbot de la Torre, al Dr. Jorge Luis Chávez Servín y al Dr. Roberto Ferriz Martínez quienes contribuyeron de gran manera con su experiencia, lo cual provocó en mí una mejor preparación. Por sus observaciones brindadas en cada seminario, sin lugar a duda, los lugares en donde más crecí profesionalmente.

A mi amigo de laboratorio cDr. Josué López Martínez por apoyarme con técnicas de laboratorio.

A la MVZ. Verónica Andrade Portillo por sus observaciones y enseñanza en el cuidado y manejo de animales de laboratorio.

A mis compañeros y equipo de bioterio; Sergio Álvarez, Berenice Balderrama y Brandon Araujo con quienes compartí grandes momentos, buena compañía y su gran entusiasmo hicieron ameno las jornadas de trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca brindada durante la maestría.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL BIOTERIO-FCN A CARGO DE LA MVZ. VERÓNICA PATRICIA ANDRADE PORTILLO, EN EL LABORATORIO DE BIOPROCESOS A CARGO DE LA DRA. DULCE MARÍA PALMERÍN CARREÑO Y EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. TERESA GARCÍA GASCA.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1. La toxicología en el desarrollo de fármacos	3
2.2. Cáncer de colon	6
2.3. Lectinas.....	8
2.4. Lectinas de frijol Tépari	11
2.5. Lectina recombinante de frijol Tépari (rTBL-1)	14
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos específicos	18
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1. Diseño del estudio.....	19
6.2. Obtención de la rTBL-1	20
6.3. Animales de experimentación	21
6.4. Estudio de toxicidad intragástrica aguda.....	21
6.5. Estudio de toxicidad intragástrica subcrónica	22
6.6. Análisis macroscópico de órganos.....	24
6.7. Análisis histopatológico de órganos	24

6.8. Análisis estadístico.....	24
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
8.1. Obtención de la rTBL-1	25
8.2. Estudio de toxicidad intragástrica aguda de la rTBL-1	25
8.3. Estudio de toxicidad subcrónica de la rTBL-1	34
VIII. CONCLUSIONES.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Toxicidad de lectinas en diferentes células malignas: estudios <i>in vitro</i>	10
Tabla 2. Toxicidad de lectinas en diferentes células malignas: estudios <i>in vivo</i>	10
Tabla 3. Efectos toxicológicos de la TBL.	13
Tabla 4. Biometría hemática de las ratas del estudio de toxicidad aguda	28
Tabla 5. Bioquímica sanguínea de las ratas del estudio de toxicidad aguda.....	29
Tabla 6. Biometría hemática de las ratas del estudio de toxicidad subcrónica al 9º día.	38
Tabla 7. Biometría hemática de las ratas del estudio de toxicidad subcrónica.	39
Tabla 8. Bioquímica sanguínea de las ratas del estudio de toxicidad subcrónica	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso para el desarrollo de nuevos fármacos	3
Figura 2. Etapas de progresión de cáncer de colon	7
Figura 3. Algunas funciones de lectinas en organismo vivos	8
Figura 4. Estructura Tridimensional de lectina de leguminosas.....	9
Figura 5. Perfil electroforético de rTBL-1.....	15
Figura 6. Estructura tridimensional de la rTBL-1	16
Figura 7. Estrategia metodológica empleada en el presente trabajo.....	19
Figura 8. Proceso de la extracción y purificación de rTBL-1.....	20
Figura 9. Peso corporal de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica aguda.....	26
Figura 10. Consumo de alimento y agua de las ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica aguda.....	27
Figura 11. Peso relativo del intestino delgado, intestino grueso e hígado de las ratas Sprague Dawley tratadas con rTBL-1 del estudio de toxicidad intragástrica aguda..	30
Figura 12. Índice de longitud de intestino delgado e intestino grueso de ratas Sprague Dawley tratadas con rTBL-1 de estudio de toxicidad intragástrica aguda.....	30
Figura 13. Peso relativo del corazón, pulmones y riñones de ratas Sprague Dawley tratadas con rTBL-1 de estudio de toxicidad intragástrica aguda.....	31
Figura 14. Peso relativo del estómago, páncreas y cerebro de ratas Sprague Dawley tratadas con rTBL-1 de estudio de toxicidad intragástrica aguda.....	32
Figura 15. Peso relativo de bazo, timo y ovarios de ratas Sprague Dawley tratadas con rTBL-1 de estudio de toxicidad intragástrica aguda.	32
Figura 16. Peso corporal de ratas Sprague Dawley tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica..	35
Figura 17. Ingesta de alimento por las ratas Sprague Dawley tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica.	36
Figura 18. Consumo de agua por las ratas tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica.....	37

Figura 19. Peso relativo del intestino delgado, intestino grueso e hígado de ratas Sprague Dawley tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica.	42
Figura 20. Índice de longitud de intestino delgado e intestino grueso de ratas Sprague Dawley tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica.....	43
Figura 21. Peso relativo del corazón, pulmones y riñones de ratas Sprague Dawley tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica..	43
Figura 22. Peso relativo del estómago, páncreas y cerebro de ratas Sprague Dawley tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica.	44
Figura 23. Peso relativo de bazo, timo y ovarios de ratas Sprague Dawley tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica.....	44
Figura 24. Micrografías representativas de cortes histológicos de bazo, páncreas e hígado de ratas Sprague Dawley en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica.	46
Figura 25. Micrografías representativas de cortes histológicos de bazo, páncreas e hígado de ratas Sprague Dawley en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica después de un periodo de recuperación de 6 semanas.....	46

RESUMEN

La fracción concentrada de lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) (TBLF, por sus siglas en inglés) ha mostrado efecto citotóxico diferencial sobre células de cáncer de colon y baja toxicidad en roedores, así como efecto inhibitorio de la carcinogénesis de colon temprana. Sin embargo, su obtención, purificación y rendimiento son bajos por lo que no es factible utilizarla como potencial molécula farmacológica. Por lo anterior, se obtuvo una lectina recombinante de frijol Tépari (rTBL-1, por sus siglas en inglés) en la levadura *Pichia pastoris*. La rTBL-1 ha mostrado homología estructural con una lectina citotóxica de la TBLF, así como efecto citotóxico diferencial similar mediante la inducción de apoptosis sobre células de cáncer de colon. Con la finalidad de conocer su perfil toxicológico, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la toxicidad aguda y subcrónica de la rTBL-1 mediante marcadores hepáticos, pancreáticos, renales, nutricionales y hematológicos en ratas Sprague Dawley. El ensayo de toxicidad aguda se realizó en ratas hembra en donde se evaluaron cinco dosis (5, 30, 50, 100 y 300 mg/kg) por vía intragástrica en dosis única. El ensayo de toxicidad subcrónica fue realizado utilizando 30 mg/kg de rTBL-1 por vía oral, diariamente por 28 días. Los resultados de la administración aguda mostraron que ninguna de las dosis probadas mostró signos clásicos de toxicidad por lectinas ni tampoco se observaron alteraciones de la función hepática, renal o biometría hemática. En cuanto a la administración subcrónica, no se observó muerte de los animales, ni diferencias significativas en la ganancia de peso, consumo de agua ni de alimento. No se encontraron datos de toxicidad en cuanto a la evaluación de la función hepática, renal, nutricia, pancreática y hematológica, únicamente se encontraron datos de activación del sistema inmune por incremento de células blancas y efectos sobre el bazo. Por lo anterior, los resultados obtenidos muestran que la rTBL-1 administrada en dosis de 30 mg/kg de peso por vía intragástrica no muestra toxicidad sistémica. Estudios en curso se enfocarán en determinar los daños a nivel histopatológico en tracto digestivo como órganos blanco principales de lectinas de frijol Tépari.

Palabras clave: Frijol Tépari, lectina recombinante, *Pichia pastoris*, toxicidad aguda, toxicidad subcrónica.

ABSTRACT

A Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) lectin fraction (TBLF) has shown differential cytotoxic effect on colon cancer cells and low toxicity in rodents as well as an inhibitory effect on early colon carcinogenesis. However, its obtention, purification and yield are low, so it is not feasible to use it as a potential pharmacological molecule. Therefore, a recombinant Tepary bean lectin (rTBL-1) was obtained in the yeast *Pichia pastoris*. rTBL-1 has shown structural homology to a TBLF cytotoxic lectin as well as a similar differential cytotoxic effect by inducing apoptosis on colon cancer cells. In order to know its toxicological profile, the objective of this study was to evaluate the acute and subchronic toxicity of rTBL-1 through hepatic, pancreatic, renal, nutritional and hematological markers in Sprague Dawley rats. The acute toxicity test was carried out in female rats where five doses (5, 30, 50, 100 and 300 mg/kg) were evaluated intragastric in a single dose. The subchronic toxicity test was performed using 30 mg/kg of rTBL-1 orally, daily for 28 days. The results of acute administration showed that none of the doses tested showed classic signs of lectin toxicity, nor were alterations in hepatic or renal function or blood count observed. Regarding the subchronic administration, no death of the animals was observed, nor significant differences in weight gain, water or food consumption. No toxicity data were found regarding the evaluation of hepatic, renal, nutritional, pancreatic and hematological functions, only data on activation of the immune system due to an increase in white blood cells and effects on the spleen were found. Therefore, the results obtained show that rTBL-1 administered in doses of 30 mg/kg of weight by intragastric way does not show systemic toxicity. Ongoing studies will focus on determining histopathological damage in the digestive tract as the main target organs of Tepary bean lectins.

Keywords: Tepary bean, recombinant lectin, *Pichia pastoris*, acute toxicity, subchronic toxicity.

I. INTRODUCCIÓN

Las lectinas son proteínas bioactivas que se encuentran en la mayoría de los organismos, entre ellos, las plantas. Se definen como proteínas o glicoproteínas que aglutinan los eritrocitos humanos de algunos o todos los grupos sanguíneos (De Mejía y Prisecaru, 2005) con capacidad de unirse de manera específica y reversible a los carbohidratos de membrana (Sharon y Lis, 2004). Hoy en día se desarrollan nuevas opciones terapéuticas contra el cáncer de colon con gran importancia y relevancia en la investigación, en donde destacan las lectinas que exhiben efectos anticancerígenos (Estrada-Martínez y col., 2017; Ferriz-Martinez y col., 2010).

El cáncer es un proceso complejo en el que ocurren alteraciones a nivel genético, ocasionando alteraciones celulares en la transducción de señales, lo que les permite adquirir nuevas funciones, como la replicación autónoma y la evasión de apoptosis (Estrada-Martínez y col., 2017). Los compuestos considerados como candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos, como el caso de las lectinas, deben investigarse exhaustivamente para conocer su seguridad mediante pruebas toxicológicas en modelos *in vitro* e *in vivo*, así como su eficacia por medio del estudio de su acción farmacológica (SSA, 2016).

Nuestro grupo de trabajo ha caracterizado el efecto citotóxico diferencial de una fracción semipura concentrada en lectinas del frijol Tépari (TBLF, Tepary bean lectin fraction, por sus siglas en inglés), la cual es capaz de inducir apoptosis *in vitro* e *in vivo* e inhibir la carcinogénesis temprana en colon en un modelo de cáncer inducido químicamente (Moreno-Celis y col., 2017, 2020). Se ha identificado la baja toxicidad de la TBLF así como su buena tolerabilidad en ratas (Ferriz-Martínez y col., 2015). Entre los efectos adversos que se han descrito se encuentra la atrofia intestinal temporal (Alatorre-Cruz y col., 2018; Pita-López y col., 2020). Sin embargo, la producción de la TBFL resulta ser de un costo elevado, requiere de mucho tiempo y trabajo técnico, y el rendimiento de extracción es bajo obteniéndose una mezcla semipura de lectinas, entre las que se encontraron principalmente dos isoformas, TBL-1 y TBL-2. Derivado de ello, se desarrolló un proceso para la producción de una lectina

recombinante (rTBL-1, recombinant Tepary bean lectin-1, por sus siglas en inglés) basada en la lectina de mayor citotoxicidad, la TBL-1, utilizando la levadura *Pichia pastoris* como sistema de expresión (Martínez-Alarcón y col., 2020; Palmerín-Carreño y col., 2021).

Se sabe que la rTBL-1 ha mostrado alta homología estructural a la TBL-1 y efecto citotóxico similar a la TBLF sobre células de cáncer de colon HT-29 (Dena Beltrán, 2020; Palmerín-Carreño y col., 2021). Para continuar con el estudio sobre sus efectos contra cáncer colon es necesario confirmar primero su seguridad mediante pruebas toxicológicas y su tolerabilidad en modelos animales, utilizando el mismo esquema que se usó en la investigación de la TBLF y conforme a la normativa nacional e internacional.

II. ANTECEDENTES

2.1. La toxicología en el desarrollo de fármacos

En el desarrollo de fármacos se siguen varias estrategias para el descubrimiento de nuevas moléculas en la obtención de un nuevo medicamento (**Figura 1**). Estas estrategias se han diversificado con el avance de la tecnología, pero los productos naturales aun presentan numerosas ventajas para el desarrollo de nuevos fármacos por la amplia diversidad de compuestos que se encuentran en la naturaleza y que pueden actuar frente a diversas dianas farmacológicas (Fabricant y Farnsworth, 2001).

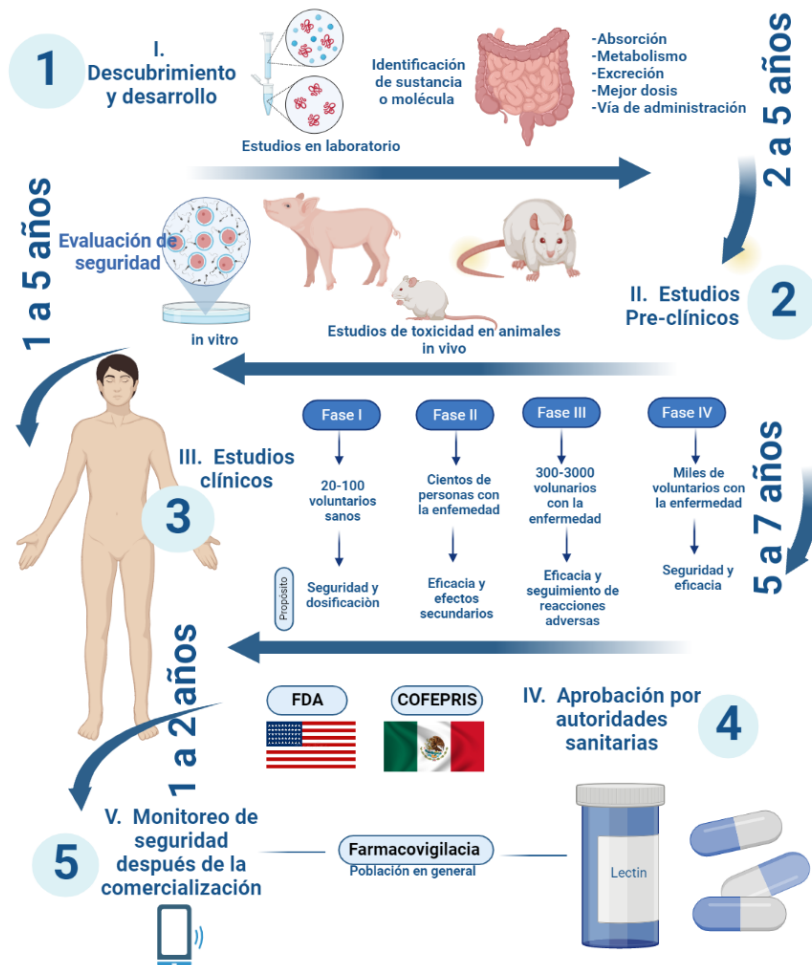


Figura 1. Proceso para el desarrollo de nuevos fármacos (realizado con BioRender.com). Se muestran las diferentes etapas del proceso de desarrollo de fármacos hasta su aprobación por los organismos reguladores.

En el inicio del proceso del desarrollo de un medicamento se seleccionan las moléculas con características esperadas para actuar frente a un blanco farmacológico, y desde ese momento se realizan rigurosas pruebas para contar con la evidencia de seguridad y eficacia requerida para sus uso en una patología determinada (Rivera y Goodman Gilman, 2019).

El fármaco que se considera como candidato terapéutico, antes de que pueda administrarse a sujetos humanos en estudios clínicos, deberá describir los fundamentos y la evidencia preliminar de su seguridad mediante pruebas toxicológicas y lo correspondiente a su eficacia en sistemas experimentales mediante estudios preclínicos en los que se incluyen ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. El conocimiento de la toxicidad de los candidatos terapéuticos se vuelve una evidencia indispensable para identificar efectos indeseables y se debe enriquecer desde las etapas iniciales del desarrollo de fármacos hasta el monitoreo constante del medicamento cuando se encuentra en el mercado y los usuarios tienen acceso a este (Rivera y Goodman, 2019).

Entre los objetivos principales de la experimentación toxicológica se encuentra la contribución al conocimiento de los peligros, o capacidad para producir daño de las sustancias, de los efectos tóxicos provocados y de su reversibilidad, los mecanismos moleculares y de las dianas biológicas sobre las que actúan. Del mismo modo, la toxicología experimental regulatoria estudia la susceptibilidad tóxica de especies, sexos o grupos poblacionales; así como la cinética y el metabolismo del agente tóxico, lo que se traduce en la predicción de las consecuencias de la interacción de los xenobióticos con los seres vivos (Schwenk y col., 2002).

Existen normativas rigurosas que deben seguirse en la experimentación toxicológica con fines reguladores, que exigen la evaluación de las sustancias con diferentes requerimientos aplicando protocolos de ensayos estandarizados. La selección de los diferentes ensayos toxicológicos, especies, tiempo y vía de exposición, así como de los niveles de dosis a emplear en los mismos, dependerán de los objetivos del ensayo

y las características propias de la sustancia a investigar, así como del uso pretendido en seres humanos (Repetto Jiménez y Repetto Khun, 2009).

En este sentido, para conocer la toxicidad de la rTBL-1 se puede recurrir a diversos principios de la toxicología que permitan después modelar su acción en los humanos. La aplicación de dosis altas de tóxicos en animales es un procedimiento útil para descubrir posibles peligros para el ser humano y es posible extrapolar cuantitativamente muchos de los efectos tóxicos observados. Varias de las disposiciones proceden de las directrices de la Comisión de la Unión Europea y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) (OCDE, 2001, 2008).

En dependencia del número de dosis administradas, tiempo de exposición y el objetivo del estudio se puede clasificar a los estudios de toxicidad en: estudios de dosis única, estudios de dosis repetida y estudios de toxicología especial (Diehl y col., 2001). Por lo anterior, se ha propuesto que la rTBL-1 sea estudiada con respecto a su grado de toxicidad en ensayos de dosis única y dosis repetida, para identificar el nivel de seguridad de la proteína e identificar los posibles efectos tóxicos que pudieran presentarse bajo estas condiciones de experimentación. Con apego a las guías y recomendaciones de la OCDE se buscará que los ensayos se realicen con un número reducido de animales y se trabajará con métodos de refinamiento en su manipulación (OCDE, 2001, 2008).

Al realizar los estudios de toxicidad en animales se debe tener en cuenta múltiples variables que atienden a la observación de cambios conductuales en los animales, la muerte prematura, sobre todo cuando se administran dosis elevadas de las sustancias. También deben valorarse, cuando el ensayo llega a término, los cambios en los parámetros hematológicos y bioquímicos que pueden reflejar afectación de algún órgano o sistema, análisis microscópico de órganos y mediante el análisis histopatológico, afectaciones a nivel microscópico en órganos y tejidos (Schwenk y col., 2002). Este último análisis es esencial para identificar el daño celular promovido por el efecto tóxico del xenobiótico.

2.2. Cáncer de colon

Después del cáncer de mama y el cáncer de pulmón, el cáncer de colon es una de las neoplasias que se presenta con gran frecuencia a nivel mundial, particularmente a partir de los 50 años de edad (IARC, 2020). Por lo tanto, representa un problema de salud con mayor énfasis en adultos mayores (Tirado Gómez y Mohar Betancourt, 2008). Actualmente es la tercer neoplasia con mayor diagnóstico y es la segunda con mayor mortalidad a nivel mundial (Hossain y col., 2022). En México durante el 2020, dentro de las defunciones por tumores malignos, el cáncer de colon y recto en hombres de 30 a 59 años ocupó el primer lugar como causa de mortalidad, mientras que en adultos de 60 años y más ocupó el tercer lugar tanto en hombres como en mujeres, con una tasa de defunción del 3.95 y 2.82 por cada 10 mil habitantes, respectivamente (INEGI, 2022). En los Estados Unidos, la tasa de personas diagnosticadas parece ir disminuyendo en adulto mayores sin embargo, en los más jóvenes va en incremento (American Cancer Society, 2020). Además, cerca del 60% de los casos de cáncer colorrectal se diagnostican en una etapa avanzada, lo que se relaciona con la alta morbimortalidad. Cuando se diagnostica en una etapa temprana (estadio I y II) existe una supervivencia mayor al 90% (Reyes y col., 2020).

Algunos factores de riesgo de cáncer colorrectal son la historia familiar, ya que el primer grado de consanguinidad se relaciona a un aumento de casi dos veces el riesgo comparado con la población general; pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus incrementan el riesgo de 30-50% comparado con los no diabéticos; pacientes con obesidad incrementan de 2 a 3 veces el riesgo en comparación con los sujetos con peso normal e incluso bajo y las personas que realizan actividad física regular tienen 50% menos riesgo de desarrollar cáncer colorrectal en relación con los sedentarios (Calva-Arcos y Acevedo-Tirado, 2009). La alimentación también juega un papel importante, las investigaciones recientes revelan que comer carne roja o procesada se asocia positivamente con un alto riesgo de desarrollar cáncer de colon y recto o bien cuando la carne está muy cocida especialmente en personas con predisposición genética, dietas bajas en fibra (frutas y vegetales), además se encuentra una asociación con el porcentaje de grasa corporal (Granados Mora, 2014; Tárraga López

y col., 2014). Por otra parte un buen aporte de calcio y vitamina D en la dieta son agentes preventivos para el cáncer colorrectal (Sawicki y col., 2021), así como el selenio, ya que cada aumento de 10 µg de Se/día en la ingesta alimenticia disminuye la probabilidad de cáncer colorrectal entre un 6 y un 10% dependiendo del número de covariables consideradas, por ejemplo el consumo >1000 mg de calcio (Augustyniak y Galas, 2022).

Una forma en que se adquieren estos rasgos distintivos del cáncer es a través de la acumulación progresiva de mutaciones genéticas y alteraciones epigenéticas. Tarda de 10 a 15 años en ocurrir, pero puede progresar más rápidamente en ciertos entornos, lo que desencadena la activación de oncogenes e inactivan genes supresores de tumores, hecho que ocasiona pérdida de estabilidad genómica y epigenética, patrón observado en la mayoría de las lesiones neoplásicas tempranas en el colon. Comúnmente inicia a partir de un pólipo que comienza con una cripta aberrante, que luego evoluciona a un adenoma temprano (Kuipers y col., 2015). El desarrollo del cáncer de colon consta de 4 etapas: iniciación, promoción, progresión y metástasis (Figura 2).

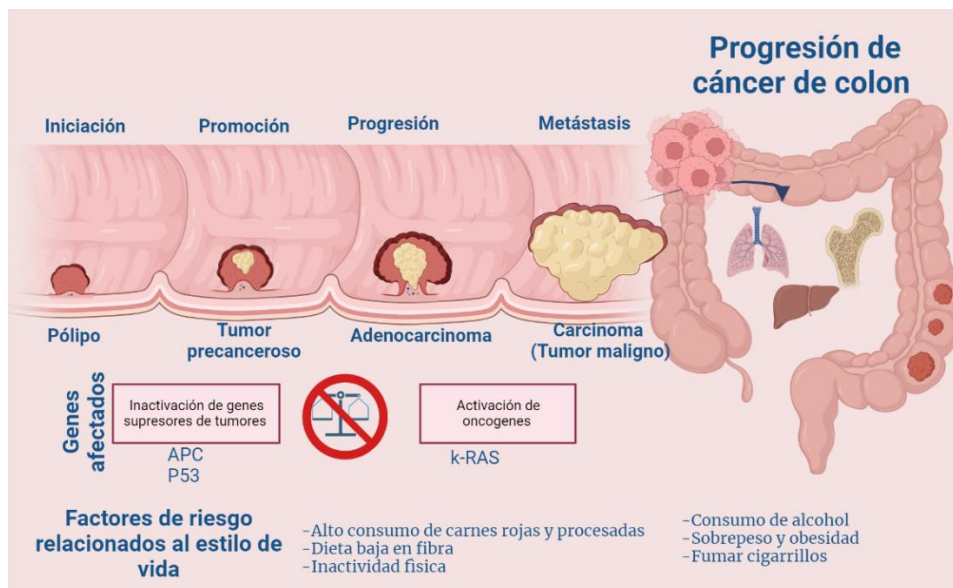


Figura 2. Etapas de progresión de cáncer de colon (realizado con BioRender.com). las etapas del proceso cancerígeno en colon afectan de forma sistemática a genes supresores de tumores en primera instancia y, posteriormente, a oncogenes.

La iniciación está relacionada a daño genético que predispone a un daño de la mucosa intestinal o bien relacionado al constante daño por enfermedades como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. En la promoción, las células iniciadas se empiezan a multiplicar conllevando a un crecimiento anormal. Durante la etapa de progresión las células cancerosas benignas se convierten en células malignas y finalmente adquieren la capacidad de poder invadir otros tejidos, principalmente el hígado, los pulmones o los huesos. Los genes implicados son supresores de tumores APC y p53, sin embargo debido a mutaciones pierden su capacidad y por el contrario se activan oncogenes como k-RAS, dando lugar así a un tumor maligno de colon o carcinoma (Hossain y col., 2022).

2.3. Lectinas

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que aglutinan los eritrocitos humanos de algunos o todos los grupos sanguíneos (De Mejía y Prisecaru, 2005) con capacidad de unirse de manera específica y reversible a los carbohidratos de membrana (Sharon y Lis, 2004). Las lectinas no solo tienen una acción, se les ha relacionado un amplio espectro de funciones (**Figura 3**). Las lectinas vegetales presentan particularmente potente actividad biológica sobre células animales.

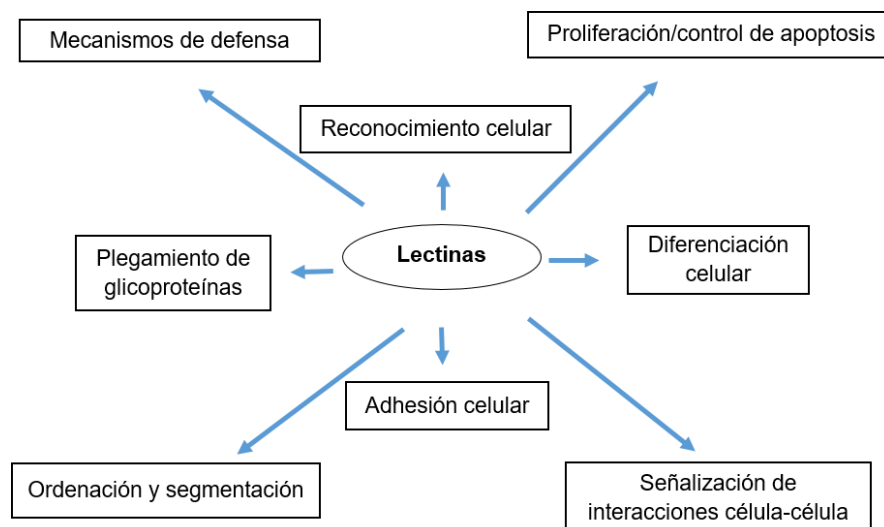


Figura 3. Algunas funciones de lectinas en organismo vivos (Ferriz-Martínez y col., 2015).

Las lectinas de leguminosas constan de dos o cuatro subunidades idénticas o casi idénticas de 25 a 30 kDa, cada una con un único sitio de combinación de carbohidratos pequeños con la misma especificidad, también contienen un Ca^{2+} fuertemente unido y un ion de metal, frecuentemente Mn^{2+} . Las subunidades están compuestas por cadenas polipeptídicas simples de aproximadamente 250 aminoácidos (Lis y Sharon, 1998). En la **Figura 4** se muestra la estructura tridimensional de 3 lectinas de leguminosas: A) representan un monómero de lectina (PSA) de *Pisum sativum* L. (2LTN), B) dímero de PSA (2LTN), C) Tetrámero de concanavalina A Con A (1CVN) (Van Damme, 2022).

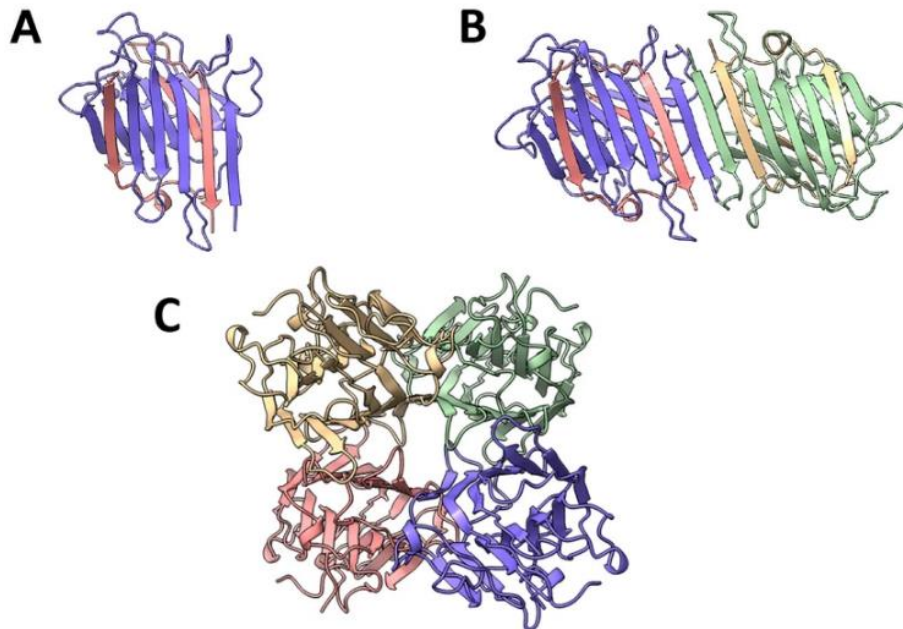


Figura 4. Estructura Tridimensional de lectina de leguminosas. A) representan un monómero de lectina (PSA) de *Pisum sativum* L. (2LTN), B) dímero de PSA (2LTN), C) Tetrámero Con A (1CVN) (modificado de Van Damme, 2022).

Las investigaciones sobre las lectinas de vegetales recobran cada día mayor importancia dado que se le ha atribuido múltiples funciones entre ellas inhibición de la proliferación celular, antitumorogénica, inmunomoduladora, antifúngica y antiviral (Reyes-Rocha y Gallegos-Torres, 2011). Las lectinas de plantas han mostrado tener un efecto inhibitorio en el crecimiento de tumores, tanto en estudios *in vitro* (**Tabla 1**) como en estudios *in vivo* (**Tabla 2**). El efecto depende de la concentración o la dosis,

el tipo de lectina y el tipo de cáncer. Se ha reportado la especificidad de las lectinas y su unión a hidratos de carbono en células de cáncer colorrectal humano Caco-2, HT-29 y HCT-8 (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).

Tabla 1. Toxicidad de lectinas en diferentes células malignas: estudios *in vitro*.

Nombre	Efecto	Línea celular	Referencia
VFA (<i>Vicia faba</i> L.)	Inhibición de la proliferación no asociada a citotoxicidad, interacción con la molécula de adhesión epCAM	Células de cáncer humano HT-29, LS174T y SW1222	(Jordinson y col., 1999)
Lectina de la semilla de <i>Bauhinia variegata</i> L.	Inhibe proliferación de células cancerígenas y la actividad de la transcriptasa inversa del VIH-1	Células cancerígenas de mama (MCF-7) y de hepatoma (HepG2)	(Lin y Tzi, 2008)
Lectina Concanavalina A (Con A)	Citotoxicidad autofágica e inmunomodulación	Modelo de hepatoma <i>in situ</i> murino	(Huan-Yao y Chih-Peng, 2009)
Lectina de semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Efecto antiproliferativo	Líneas celulares de cáncer de hígado (HepG2), y de mama (MCF-7)	(Lam y Ng, 2010)
Lectina de <i>Polygonatum adorum</i> (Mill.) Druce	Antiproliferativo y apoptótico mediante la muerte de receptores y apoptosis a través de la vía mitocondrial y apoptosis inducida por TNF- α	Células de fibrosarcoma L929 murino	(Liu y col., 2009)

Tabla 2. Toxicidad de lectinas en diferentes células malignas: estudios *in vivo*

Lectina	Mecanismo de acción	Tipo
PHA (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Inhibición de crecimiento de tumores	Murina linfomas ascíticos
SBA (<i>Glycine max</i> (L.) Merr)	Fortalecimiento del sistema inmune del huésped	Murino linfoma ascítico
TMA I y II (<i>Thicholoma mongolicum</i>)	Inhibición del tumor y prolongación de la vida de los animales	Ratón con células de sarcoma 180
GS-1 (<i>Griffonia simplicifolia</i> (Vahl ex DC.) Baill.)	Inhibición del crecimiento de tumor	Ratón con células ascíticas Ehrlich
VCA (<i>Viscum album</i> var. <i>coloratum</i> Ohwi)	Inhibición del crecimiento de tumores y metástasis por el crecimiento de la apoptosis y la inhibición de la angiogénesis	Ratón inoculado con células de melanoma B16-BL6
KML-C (Korean mistletoe: <i>Viscum album</i> var. <i>coloratum</i> Ohwi)	Actividad inmunomoduladora para fortalecer el sistema de defensa del huésped, efecto en metástasis asociado a muerte natural y macrófagos.	Murino melanoma, carcinoma de colon y linfoma
MI-I (<i>Viscum album</i> L.)	Efecto antitumoral con reducción del crecimiento del linfoma trasplantado	Ratón con tumores de linfoma no-Hodgkin

(Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).

2.4. Lectinas de frijol Tépari

El frijol Tépari, cuyo nombre científico es *Phaseolus acutifolius* A. Gray, es una leguminosa que se cultiva en varias regiones del mundo, entre ellos América del Norte. Es una leguminosa resistente a altas temperaturas y a la sequía; al igual que otros frijoles, si se consume en crudo es muy tóxico tanto para el hombre como para los animales debido a lectinas similares a fitohemaglutinina (PHA) (De Mejia y col., 1990). Se utiliza principalmente como alimento tanto para los humanos como para los animales debido a su alto valor de proteínas, no obstante, es poco consumido y conocido. Se ha reportado toxicidad por el consumo crudo de frijol Tépari, ocasionando problemas como pérdida de peso, mala digestión de proteínas y, por último, la muerte de ratas y ratones en un periodo de 10 días (Osman y col., 2003).

En un estudio de toxicidad aguda se administró una fracción de lectinas (fracción PLA-E) a dosis únicas por vía intraperitoneal de 20, 40, 60, 200, 400, 600, 700, 800 y 1200 mg/kg de peso corporal a diez grupos de animales ratones macho y hembra destetados de la cepa CD-1, con un peso aproximado de 18 a 22 g. Se observaron durante 15 días y se examinaron órganos como timo, riñones, pulmones, hígado, bazo e intestino delgado. En los ratones no se observó ningún efecto adverso a dosis bajas (20, 40 y 50 mg/kg de lectina), no obstante, a dosis altas de 200, 400, 600 mg/kg a los 4 días de tratamiento en ambos sexos se presentó la disminución del peso corporal e inflamación intensa del abdomen con crecimiento hiperplásico del intestino. Con 700 mg/kg se observó diarrea, a 800 mg/kg una mortalidad de 12.5% en los machos y a dosis de 1000, 1200 mg/kg se observó una mortalidad del 33% y 83.6% para los machos, respectivamente. Para los ratones machos y hembras, la mortalidad fue del 100% después de 1,280 y 1,570 mg/kg de lectina, los órganos diana afectados fueron el intestino delgado, el bazo y el timo (Reynoso-Camacho y col., 2003).

La fracción concentrada en lectinas (TBLF) de frijol Tépari (*P. acutifolius*), obtenida por cromatografía de exclusión de peso molecular, ha mostrado efecto citotóxico diferencial en líneas celulares cancerígenas, así como entre células cancerígenas y no cancerígenas, principalmente las del cáncer de colon (García-Gasca y col., 2012). La

TBLF induce apoptosis en células de cáncer de colon humano HT-29 y arresto en fase G₀/G₁ del ciclo celular. La apoptosis se desencadena por la activación de caspasa 3 y la fosforilación de p53 (Moreno-Celis y col., 2020). Por su parte, los estudios toxicológicos de la TBLF se muestran en la **Tabla 3**.

Se han realizado distintos estudios de toxicidad *in vivo* usando la TBLF. En un estudio de toxicidad aguda se utilizaron dosis establecidas por la guía 423 de la OCDE (OCDE, 2001) en ratas Sprague Dawley en el que se probaron dosis de 5, 50, 300 y 2000 mg/kg de peso mediante vía intragástrica. Se observaron durante 14 días, haciendo énfasis en las primeras 24 horas y crucial en las primeras 4 h. Se observaron signos clásicos de toxicidad por lectinas, como aletargamiento, piloerección y diarrea durante las primeras 48 h con las dosis más altas probadas (300 y 2000 mg/kg), y se recuperaron totalmente a partir de las 48 h. Se presentaron signos de toxicidad a nivel gastrointestinal pero no se observó falta de crecimiento ni la muerte de los animales en estudio, lo que sugiere baja toxicidad de la TBLF. Además, no se observaron alteraciones macroscópicas en los órganos estudiados y tampoco se observaron diferencias en el peso de los órganos, excepto en riñones, en los que se observó una disminución (López-Sánchez y col., 2010).

En el estudio de toxicidad oral subcrónica se usó la dosis máxima obtenida en el estudio de toxicidad aguda que no ocasionó efectos tóxicos y dos dosis inferiores (5, 10 y 50 mg/kg de peso). La lectina se administró diariamente por 28 días vía oral. No se observaron alteraciones macroscópicas evidentes en ninguno de los órganos estudiados en las ratas de ambos sexos. El peso del intestino delgado presentó una disminución en el grupo de 5 mg/kg con respecto a los diferentes tratamientos, tanto en ratas hembra como en ratas macho. Con respecto al peso del hígado y de los riñones no se reportaron cambios en las ratas hembra, pero sí en la disminución del peso de los riñones del grupo de ratas macho con la dosis de 5 mg/kg. No se observaron efectos en el peso del timo, bazo, corazón y estómago de los animales tratados con respecto al grupo control. Los análisis histopatológicos no mostraron alteraciones en ninguno de los órganos estudiados usando la TBLF (López-Sánchez y col., 2010).

Tabla 3. Efectos toxicológicos de TBL

Estudio	Efectos	Autor
Agudo	<ul style="list-style-type: none"> -Aletargamiento, piloerección y diarrea durante las primeras 48 h con las dosis de 300 y 2000 mg/kg. -Disminución del peso de los riñones con la dosis de 50 y 300 mg/kg respecto al grupo control. 	(López-Sánchez y col., 2010)
Subcrónico	<ul style="list-style-type: none"> -Disminución del consumo de alimento al séptimo día, en el caso de los machos (5 mg/kg). -El peso del intestino delgado presentó una disminución en el grupo de 5 mg/kg en hembras y machos. -El peso los riñones presento una disminución en el grupo de machos con la dosis de 5 mg/kg. -El valor de albumina presento una disminución comparada con el grupo control usando 50 mg/kg. 	(López-Sánchez y col., 2010)
Tolerabilidad	<ul style="list-style-type: none"> -Reducción transitoria en la ingesta de alimento (semana 1 a la semana 4) y pérdida de ganancia de peso corporal del 10% usando 50 mg/kg c/3er día durante 6 semanas. -Incremento de 3.86 veces en el recuento de granulocitos en animales tratados a las 24 h. -En frotis sanguíneo los linfocitos disminuyeron el 20% y un incremento de 2.4 los neutrófilos y 20 veces los eosinófilos. 	(Ferriz-Martínez y col., 2015)
Efectos adversos	<ul style="list-style-type: none"> -En ratas de 15 semanas con dosis de 50 mg/kg cada 3er día se observó disminución del 10% de la ganancia de peso. -Incremento significativo en % de linfocitos al día 9. -Incremento de CD4+ y disminución de CD8+ al día 9. -Cambio significativo en la relación linfocito y granulocito al día 9 (relación 90:10 en grupo control y 70:30 en grupo tratado). -Incremento significativo para IL-6 al día 43. -Activación del sistema inmunológico. -Al día 43 se observó una disminución para valores de albumina y glucosa en suero -Después de 2 semanas de recuperación se observó una disminución para albúmina y urea en suero. -Cambios significativos para el peso del intestino delgado y colon después de 6 semanas de administración. El intestino de las ratas tratadas fue 14% mayor que el grupo control; mientras el peso del colon de las ratas tratadas fue 20% más bajo comparado con el grupo control. -En intestino delgado se observó; atrofia en las vellosidades y adelgazamiento (aparición translúcida), aumento de IL-6 y Nfk-B, aumento del número de folículos linfoides de las playas de Peyer. -Atrofia en las criptas del colon. -Hiperplasia pancreática (aumento del tamaño de acinos), presencia de vacuolas en las células exocrinas y cambio en su morfología (células acinares redondas en vez de alveolar). 	(Alatorre-Cruz y col., 2018)
Efectos adversos	<ul style="list-style-type: none"> -Aumento de la producción de moco intestinal; grupo control 0.9 ±0.14 g y 1.46±0.32 g para el grupo tratado, con una consistencia viscosa al tacto, de color amarillo fuerte y marrón comparado con un ligero color amarillo. -Atrofia de las vellosidades del intestino delgado, adelgazamiento e hiperplasia críptica. Disminución en la altura de las vellosidades del duodeno y aumento del ancho para duodeno, yeyuno e íleon. -Disminución de la profundidad de las criptas del colon, daño al epitelio prismático simple y cambios en la microbiota. -Aumento de la permeabilidad y disminución de la aparente digestibilidad ileal de las proteínas. 	(Pita-López y col., 2020)

Se han realizado estudios de tolerabilidad usando la TBLF vía intragástrica en ratas Sprague Dawley, en una dosis de 50 mg/kg de peso, tres veces por semana durante seis semanas. Entre los efectos adversos se observó la reducción transitoria en la ingesta de alimentos y la pérdida de ganancia de peso corporal del 10% con respecto al grupo control al final del estudio. El análisis histopatológico y los marcadores sanguíneos para el estado nutricional y función hepática, pancreática y renal no se vieron afectados en los animales tratados con respecto al grupo control. Los resultados sugieren que 50 mg/kg de TBLF administrados por vía oral no presenta toxicidad en ratas (Ferriz-Martínez y col., 2015).

Con el objetivo de conocer más sobre los posibles efectos adversos, otro estudio evaluó la administración de la TBLF en órganos del aparato digestivo e inmunológico. Se utilizó la dosis de TBLF de 50 mg/kg cada tercer día durante 43 días (6 semanas) en 62 ratas Sprague Dawley por vía oral y se observaron por 14 días posteriores sin tratamiento (periodo de recuperación). Se reportó activación del sistema inmunológico (aumento de la relación linfocitos-granulocitos), aumento del número de folículos linfoides en placas de Peyer intestinales y una ligera expansión de la pulpa blanca esplénica, atrofia en las vellosidades del intestino delgado y de criptas del colon, sin normalización después del periodo de recuperación de dos semanas. La hiperplasia pancreática se revirtió parcialmente después de 14 días de reposo del tratamiento (Alatorre-Cruz y col., 2018). Por lo anterior, se incrementó el periodo de recuperación a seis semanas en un segundo experimento (Pita-López y col., 2020). Se observó pérdida del aumento de peso corporal, atrofia del intestino delgado, atrofia de las vellosidades, e hiperplasia críptica, además aumento de la producción de moco intestinal, aumento de la permeabilidad y disminución de la aparente digestibilidad ileal de las proteínas, sin embargo, estos efectos se revertieron casi por completo después de las seis semanas de recuperación postratamiento.

2.5. Lectina recombinante de frijol Tépari (rTBL-1)

La obtención de TBLF mediante cromatografía de exclusión de peso molecular (García-Gasca y col., 2012) presentó varias dificultades como su lento proceso de

purificación a partir de las semillas de frijol Tépari, se obtienen bajos rendimientos y es muy costosa. Además para que un agente sea candidato a fármaco se requiere una mayor pureza, por lo que se tendría que añadir al menos un paso adicional mediante cromatografía de intercambio iónico y HPLC (Martínez-Alarcón y col., 2020), lo que daría como resultado un menor rendimiento y sería casi imposible obtener cantidades necesarias para poder realizar las pruebas *in vivo*. Por lo tanto se desarrolló el método para la obtención de la lectina recombinante, rTBL-1, de frijol Tépari mediante la modificación genética de la levadura *Pichia pastoris* (Martínez-Alarcón y col., 2020) y posteriormente el proceso de producción fue optimizado usando glicerol crudo en un sistema Fed-Batch (Palmerín-Carreño y col., 2021) obteniendo así un rendimiento de 265 ± 13 mg de proteína por litro de cultivo.

Para su identificación se realizó un perfil electroforético (**Figura 5**) mediante SDS-PAGE que mostró la presencia de una banda de ~30 kDa que fue identificada por Western blot. La rTBL-1 es un homotetrámero estable de 120 kDa, es decir, está conformada por cuatro monómeros o subunidades (**Figura 6**) plegadas como una lectina de leguminosa tipo canónica con dos cationes divalentes de Ca^{2+} (esferas color rojo) o de Mn^{2+} (esferas de color gris) unidos a cada subunidad (Martínez-Alarcón y col., 2020).

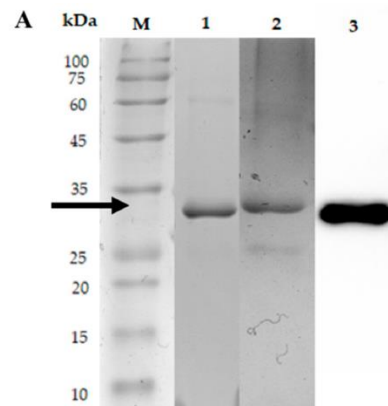


Figura 5. Perfil electroforético de rTBL-1. M: Marcador de peso molecular. Carril 1 SDS-PAGE; carril 2 Tinción de Schiff-PAS para la detección de glicoproteínas, carril 3 Western blot (Palmerín-Carreño y col., 2021)

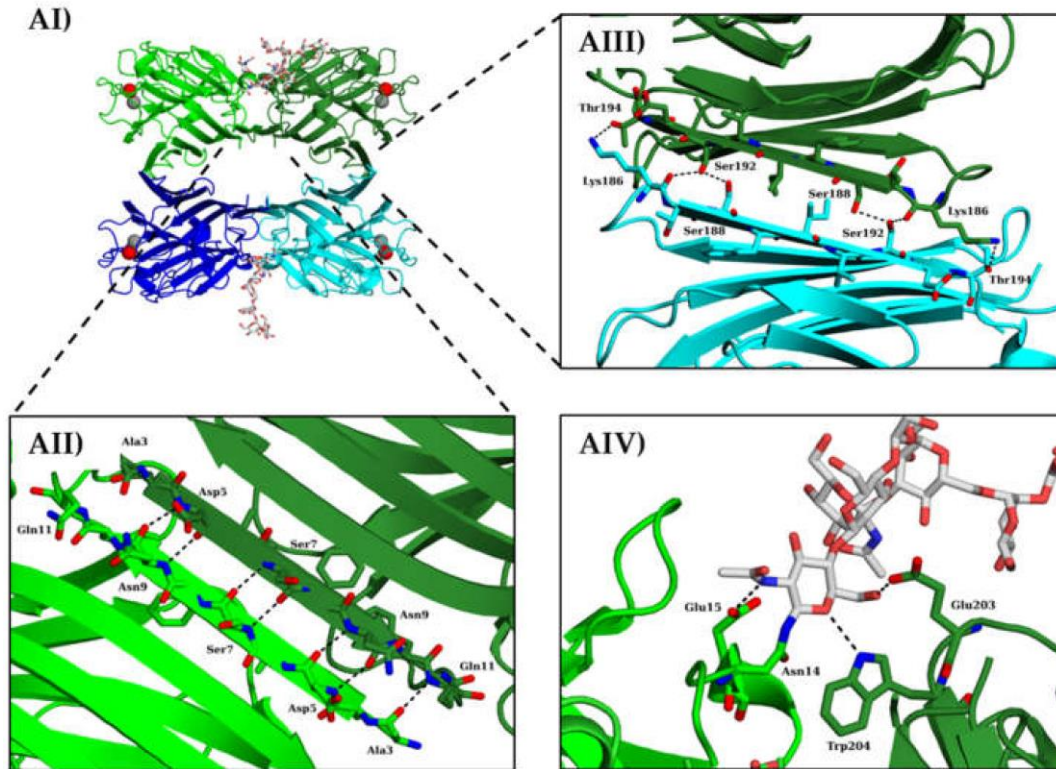


Figura 6. Estructura tridimensional de la rTBL-1. AI) Tetrámero con sus cuatro subunidades (A, B, C y D) y cationes divalentes de Ca²⁺ o de Mn²⁺. **AII)** Interacciones estabilizadoras de la interfase entre la cadena A y B. **AIII)** Interacciones estabilizadoras de la interfase entre la cadena B y D. **AIV)** Interacciones de GlcNAc en la interfaz de dos cadenas adyacentes (Martínez-Alarcón y col., 2020).

El efecto citotóxico de la rTBL-1 se probó sobre células humanas de cáncer de colon HT-29, del cual se obtuvo la concentración letal media (LC₅₀) (Palmerín-Carreño y col., 2021). Este efecto está relacionado con la inducción de apoptosis, similar a los observado con la TBLF (Moreno-Celis y col., 2020), es decir, conserva la actividad biológica de las lectinas contenidas en la TBLF. La rTBL-1 induce arresto del ciclo celular en la fase G₀/G₁ y disminución de la fase S sobre células de cáncer de colon HT-29, Los efectos apoptóticos se corroboraron al determinar la activación de caspasa 3 y de la Poli ADP ribosa polimerasa (PARP), la fosforilación de histona HA2X y p-53. El mecanismo de acción está relacionado con la interacción con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mediante su fosforilación y eventual degradación, efecto que desencadena la activación de proteínas pro-apoptóticas como p38 y la disminución de Akt (Dena Beltrán, 2020).

III. JUSTIFICACIÓN

La TBLF ha mostrado efecto apoptótico sobre células de cáncer de colon en estudios *in vitro* e *in vivo*. El efecto ha sido diferencial al afectar principalmente a las células cancerígenas, además que la TBLF presenta baja toxicidad y buena tolerabilidad en roedores. Se ha determinado también el efecto inhibitorio de la tumorigénesis temprana de la TBLF mediante la inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular. Sin embargo, su purificación convencional implica periodos largos y costosos, además de bajos porcentajes de rendimiento y de pureza. Para atender esta problemática, se generó la lectina recombinante rTBL-1 utilizando la levadura *Pichia pastoris*, que presenta una alta similitud con una de las lectinas nativas de frijol Tépari (TBL-1). Ahora, ante la necesidad de evaluar el potencial de la rTBL-1 como agente terapéutico contra el cáncer de colon, es necesario realizar primero pruebas de toxicidad para conocer la seguridad de la molécula. Los recientes ensayos de citotoxicidad *in vitro* de la rTBL-1 permitieron encontrar un efecto similar al descrito para la TBLF y motivaron la realización de pruebas de toxicidad en modelos *in vivo*.

Dado lo anterior, y debido a que la rTBL-1 es una nueva molécula por su método de obtención, es necesario realizar los estudios de toxicidad intragástrica aguda y subcrónica en ratas. Este trabajo permitirá conocer los rangos de seguridad de la lectina recombinante, atender la regulación sanitaria respecto al desarrollo de fármacos, y contar con la evidencia que permita la realización de pruebas preclínicas y clínicas para que se considere a la rTBL-1 como un candidato terapéutico contra el cáncer de colon.

IV. HIPÓTESIS

La administración de la rTBL-1 por vía intragástrica de dosis única y de dosis repetida presenta baja toxicidad en ratas Sprague Dawley.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la toxicidad intragástrica aguda y subcrónica que presenta la rTBL-1 de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) mediante la presencia de signos y síntomas de toxicidad, marcadores hepáticos, pancreáticos, renales, nutricionales y hematológicos en ratas Sprague Dawley.

5.2. Objetivos específicos

- Extraer y purificar la cantidad suficiente de la rTBL-1 para los ensayos *in vivo*.
- Evaluar la toxicidad aguda de la rTBL-1 vía intragástrica en ratas Sprague Dawley mediante las recomendaciones de la guía 423 de la OCDE.
- Realizar el ensayo de toxicidad subcrónica de la rTBL-1 1 administrada vía intragástrica en ratas Sprague Dawley conforme las recomendaciones de la guía 407 de la OCDE.
- Evaluar los efectos adversos de la rTBL-1 en páncreas, bazo e hígado mediante histopatología después de la exposición subcrónica y a seis semanas de recuperación.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño del estudio

Se trató de un estudio longitudinal y experimental empleando la estrategia metodológica que se muestra en la **Figura 7**. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética (54FCN2021) de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (FCN-UAQ) con número de registro 13251.

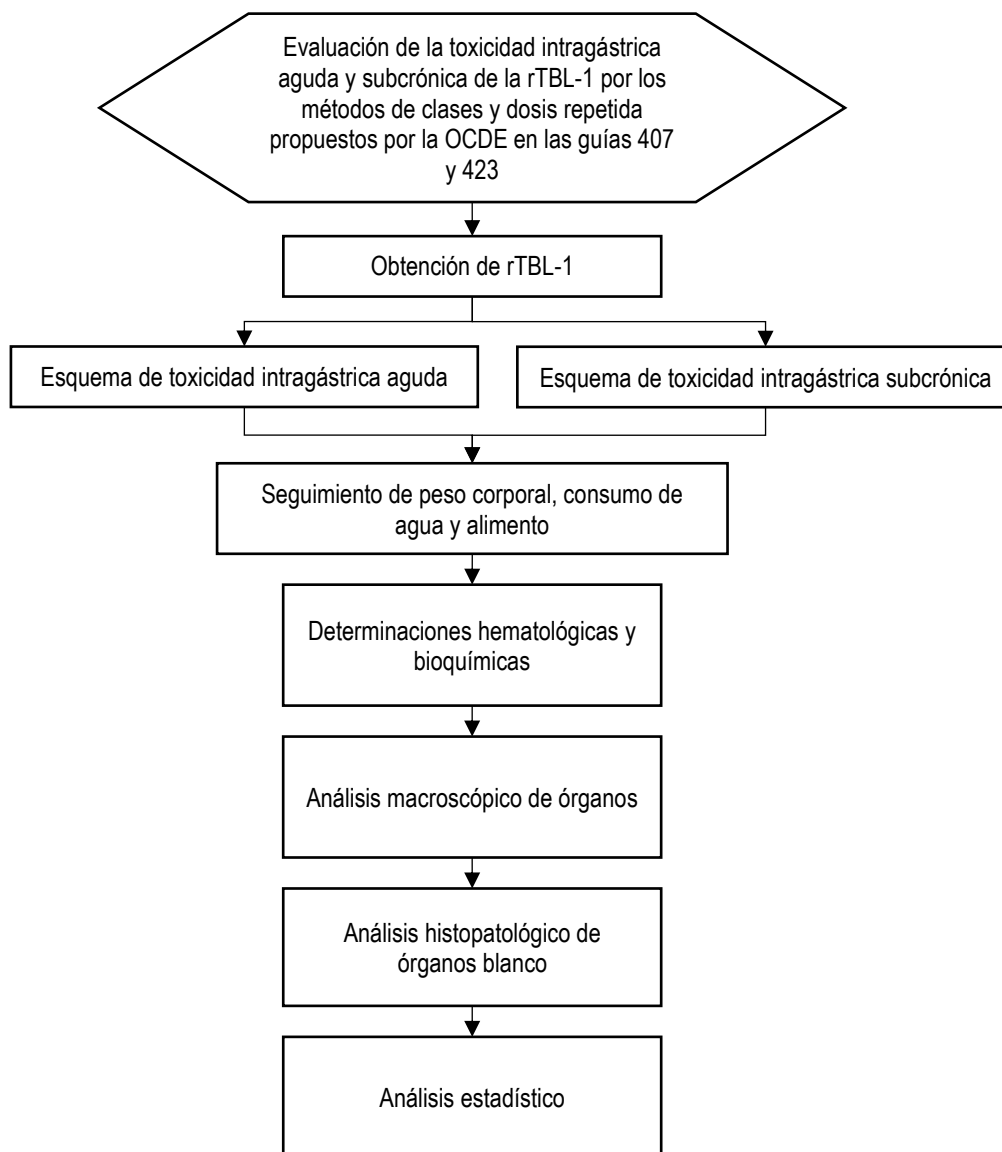


Figura 7. Estrategia metodológica empleada en el presente trabajo.

6.2. Obtención de la rTBL-1

La producción y purificación de la rTBL-1 utilizó la metodología descrita por Palmerín-Carreño y col. (2021) en el laboratorio de extracción y purificación de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Brevemente, se utilizó un biorreactor (applikon Biotechnology) con capacidad de 3 L (**Figura 8**), y se controlaron factores de pH, oxígeno, temperatura y agitación. El medio de cultivo fue centrifugado a 4000 rpm por 20 min en una centrifuga a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y clarificado por medio de filtración para posteriormente ser purificado en columnas para filtración en gel con Sephadex con afinidad a níquel y con apoyo de una bomba peristáltica bidireccional (Bomba ECONO PUMP de BioRad). Posteriormente las columnas fueron lavadas con un gradiente ascendiente de imidazol 200 mM con el objetivo de recuperar la rTBL-1. Por último, la muestra se dializó por osmosis con agua destilada hasta eliminar las sales presentes y tener una conductividad menor a 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Palmerín-Carreño y col., 2021). Finalmente, la muestra obtenida se liofilizó y se mantuvo en congelación a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

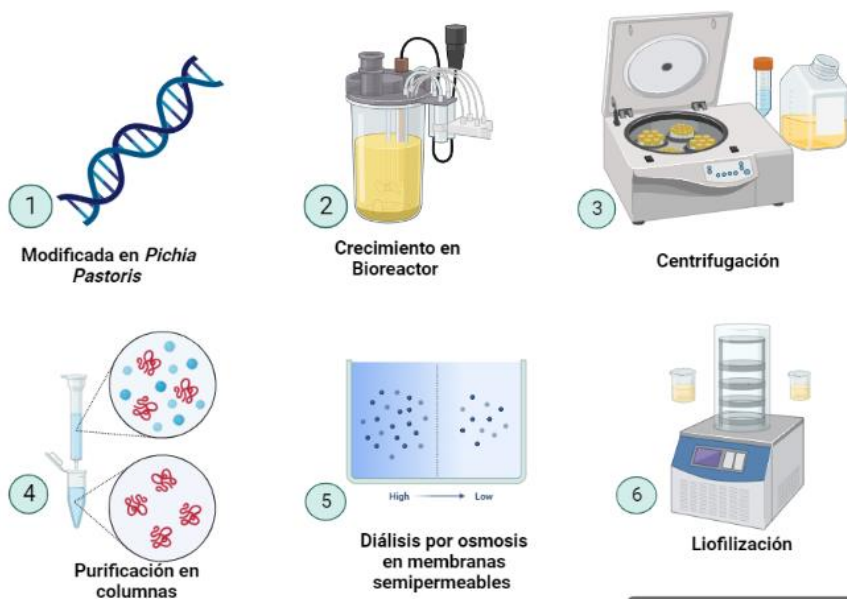


Figura 8. Proceso de la extracción y purificación de rTBL-1. 1) Región tomada del frijol Tépari e insertada en *Pichia pastoris*, 2) crecimiento en biorreactor de 3 L, 3) Centrifugación y filtración 4) Purificación en columnas con afinidad a níquel, 5) Díálisis por ósmosis en membranas semipermeables y 6) Liofilización por 7 días (realizado con BioRender.com).

La proteína se identificó utilizando el método de Bradford (1976) en geles de poliacrilamida al 13%. Las fracciones de rTBL-1 se analizaron mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970) cargando 25 µg de proteína. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie durante 12 h. Posterior a ello, el exceso de colorante fue retirado lavando los geles en solución de metanol/ácido acético 4:3 hasta observar las bandas marcadas.

6.3. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Sprague Dawley de cinco semanas de edad adquiridas del bioterio del Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla-Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales se colocaron en cajas individuales con agua y alimento *ad libitum* (Nutricubos® Agribands Purina México, S.A. de C.V.). El alimento fue tratado térmicamente en autoclave a 105 °C por 15 min y 6 psi con la finalidad de inactivar las lectinas presentes y finalmente secado en horno con flujo de aire (Shel Lab) a 60 °C por 24 h. Las ratas se mantuvieron en el bioterio de la FCN-UAQ donde se realizaron los procedimientos experimentales a una temperatura de 22±2 °C, humedad relativa de 45 a 60%, ciclos de 12 h luz y 12 h oscuridad. Los animales tuvieron una semana de aclimatación a las condiciones del bioterio antes de comenzar los experimentos. En todo momento se atendieron las recomendaciones de la reglamentación interna del bioterio de la FCN-UAQ (García-Gasca y Andrade-Portillo, 2021), de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (SAGARPA, 2001), y de las guías 407 y 423 de la OCDE que se siguieron para la realización de los protocolos experimentales (OCDE, 2001, 2008).

6.4. Estudio de toxicidad intragástrica aguda

Para este ensayo se utilizaron 30 ratas hembra Sprague Dawley y se siguieron las recomendaciones de la guía 423 de la OCDE (OCDE, 2001). Después de su semana de aclimatación, a las 6 semanas de edad, las ratas se dividieron en 6 grupos de 5 roedores cada uno: a 5 grupos se les administró la rTBL-1 por vía oral con uso de una cánula intragástrica en las dosis únicas de 5, 30, 50, 100 y 300 mg/kg, mientras que a

un grupo control se administró solamente solución salina, siempre respetando el no exceder un volumen de 10 ml/kg y que las ratas tuvieran 2 horas de ayuno por las recomendaciones de buenas prácticas de laboratorio (Diehl y col., 2001; OCDE, 2001).

Los grupos experimentales se mantuvieron en observación después de ser administrados los tratamientos de manera constante la primera media hora, periódicamente durante las siguientes 24 horas y 2 veces al día durante los próximos 13 días para presenciar signos y síntomas de toxicidad, tales como: aspecto físico (posiciones extrañas, piloerección, posición de la cola, lagrimeo, excretas, pérdida de peso), comportamiento (consumo de agua y alimentos, actividad/inactividad, comportamiento exploratorio, agresividad, sedación); otras alteraciones (temblores musculares, convulsiones, parálisis, alteración de los reflejos, tamaño de pupila, opacidad corneal).

En el día catorce después de la administración de los tratamientos de la rTBL-1 se procedió a la eutanasia de las ratas con CO₂ (SAGARPA, 2001). Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca para las determinaciones hematológicas (biometría hemática completa) en tubos con EDTA-K₂ como anticoagulante y para las determinaciones bioquímicas (marcadores hepáticos: alanina-aminotransferasa (TGP) y aspartato-aminotransferasa (TGO); y marcadores renales: urea y creatinina) en tubos con gel separador que fueron centrifugados a 3,000 rpm durante 5 minutos. Las muestras sanguíneas fueron analizadas el mismo día de su obtención por Unidad de Servicios Clínicos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Los órganos de las ratas fueron analizados como se describe en la sección 6.6. Análisis macroscópico de órganos.

6.5. Estudio de toxicidad intragástrica subcrónica

Al concluir el estudio de toxicidad oral aguda y obtener como resultado que la rTBL-1 tiene de baja toxicidad en dosis elevadas se procedió a iniciar el ensayo de toxicidad oral subcrónica utilizando una dosis baja. En este ensayo se utilizaron 10 ratas hembra y 20 ratas macho Sprague Dawley. Las ratas hembra se dividieron en los grupos de tratamiento y de control con 5 animales cada uno. Por otro lado, las ratas macho se

dividieron en 4 grupos de 5 roedores cada uno: 2 grupos que recibieron el tratamiento con la rTBL-1, a un grupo se realizó la eutanasia al completar los 28 días de tratamiento y al otro se continuó observando durante un periodo de recuperación de 6 semanas; a los 2 grupos restantes se les consideró como control de los grupos que fueron tratados, respectivamente. Los roedores tenían un ayuno de 2 h previo a ser tratados como sigue: los grupos tratados recibieron una dosis oral diaria durante 28 días de 30 mg/kg de la rTBL-1 disuelta en un volumen de 10 ml/kg de solución salina, mientras que los grupos control se les administró solamente el vehículo.

Los grupos experimentales se observaron diariamente desde la administración de tratamientos hasta 2 h posteriores cuando se les colocó el agua y el alimento, y también por una hora antes de que se iniciara el ciclo de oscuridad en el bioterio, para presenciar signos y síntomas de toxicidad, tales como: aspecto físico (posiciones extrañas, piloerección, posición de la cola, lagrimeo, excretas, pérdida de peso), comportamiento (consumo de agua y alimentos, actividad/inactividad, comportamiento exploratorio, agresividad, sedación); otras alteraciones (temblores musculares, convulsiones, parálisis, alteración de los reflejos, tamaño de pupila, opacidad corneal). Al noveno día de tratamiento, se seleccionaron aleatoriamente 3 animales del grupo de ratas macho con tratamiento de rTBL-1 y 3 ratas de su respectivo grupo control para tomar una muestra de sangre periférica y realizar el análisis de biometría hemática de la misma.

La eutanasia de los roedores se realizó al completarse los periodos de tratamiento o de recuperación. Se recolectaron muestras sanguíneas para su análisis como se describió previamente en la sección 6.4 así como el análisis de marcadores bioquímicos como colesterol, triglicéridos, colesterol HDL, fosfatasa alcalina, proteínas totales, albumina y amilasa. Los órganos de las ratas fueron analizados macroscópicamente y mediante histopatología.

6.6. Análisis macroscópico de órganos

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

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

Mientras que para el índice de longitud de los intestinos se determinó como:

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

6.7. Análisis histopatológico de órganos

Los órganos, posteriormente a ser pesados, se colocaron en un recipiente sobre hielo con formol al 10% en solución amortiguadora de fosfatos con pH de 7.2. Las muestras fueron mantenidas en refrigeración hasta que fueron entregadas al Laboratorio de Histopatología de la FCN-UAQ donde siguieron un proceso de deshidratación y aclaramiento para ser incluidos en parafina. Al finalizar la inclusión y montaje de las muestras se procedió a realizar cortes del tejido en serie de un grosor de 6 μm que se tiñeron con hematoxilina-eosina y se analizaron mediante microscopía óptica a 10x, 40x y 100x (López-Sánchez y col., 2010).

6.8. Análisis estadístico

Los resultados experimentales fueron expresados como media \pm desviación estándar (DE), el tamaño de muestra se describe en las figuras y tablas de la sección de resultados de cada uno de los ensayos realizados. Las comparaciones entre medias de grupos se realizaron por la prueba “t” de Student o por un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Dunnett según correspondió ($p < 0.05$). Las bases de datos se realizaron en Microsoft 365® Excel. El análisis estadístico se efectuó en el programa JMP 6 y los gráficos fueron desarrollados en GraphPad Prism 8.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Obtención de la rTBL-1

En el presente estudio, el rendimiento en la obtención de rTBL-1 fue similar al reportado por Palmerín-Carreño y col. (2021), 265 ± 13 mg/L. Al tener la cantidad suficiente de rTBL-1 se iniciaron las pruebas de toxicidad *in vivo* necesarias para conocer su seguridad (Schwenk y col., 2002). Los resultados y discusión de los estudios de toxicidad se muestran en dos bloques atendiendo los dos esquemas que fueron implementados.

8.2. Estudio de toxicidad intragástrica aguda de la rTBL-1

La administración oral única de la rTBL-1 a las ratas en las diferentes dosis probadas (5-300 mg/kg) no generó ningún signo o síntoma de toxicidad al comparar con respecto al grupo control. Ningún animal mostró aletargamiento, piloerección, diarrea, vómito, o alteraciones en la postura y marcha, tampoco se observaron cambios en el comportamiento conductual o diferencia en las expresiones faciales. Todas las ratas sobrevivieron al ensayo en los distintos niveles de dosis administradas. La rTBL-1 en la dosis de 300 mg/kg mostró mayor seguridad en los parámetros evaluados del comportamiento animal que la dosis de 300 mg/kg de la TBLF, la cual provocó aletargamiento, piloerección y diarrea durante las primeras 48 h posteriores al tratamiento oral agudo (López-Sánchez y col., 2010). Este efecto coincide con otro estudio cuando se administró lectina extraída de frijol Tépari vía intraperitoneal en dosis de 700 mg/kg (Reynoso-Camacho y col., 2003) ocasionando diarrea. Sin embargo, la rTBL-1 no mostró estos cambios, lo que sugiere una mayor seguridad y tolerabilidad de la proteína.

El peso corporal y la ingesta de alimento y agua son parámetros críticos para la evaluación toxicológica, porque mediante estas medidas puede detectarse de forma temprana la presencia de toxicidad de los compuestos administrados (Repetto Jiménez y Repetto Khun, 2009). Algunas lectinas como *Phaseolus vulgaris* y lectina del rizoma de *Microgramma vacciniifolia* han causado pérdida de peso corporal en

animales tratados con estas e incluso su muerte. (Cavalcante da Silva et al., 2020; Hamid and Masood, 2009; McPherson, 1990) Las ratas tratadas con la rTBL-1 mantuvieron, conforme su crecimiento, la ganancia de peso de manera similar a los animales del grupo control (**Figura 9**). En el ensayo de toxicidad aguda de la TBLF, la administración de lectinas tampoco afectó el peso corporal de animales tratados con respecto a los grupos control (López-Sánchez y col., 2010). Por el contrario, la administración de lectinas obtenidas de frijol Tépari en ratones (ambos sexos) en dosis de 200, 400 y 600 mg/kg vía intraperitoneal mostraron disminución del peso corporal al cuarto día, no obstante al final del estudio agudo solo los machos alcanzaron el mismo peso que los controles, sin embargo esto no sucedió con las hembras (Reynoso-Camacho y col., 2003). En este sentido la administración de rTBL-1 vía intragástrica en la dosis máxima probada (300 mg/kg) no ocasionó disminución de peso, lo que sugiere presentar un menor grado de toxicidad, lo cual está relacionado también a la vía de administración. Se ha observado que otras lectinas como la lectina del extracto salino de los cuerpos fructíferos del hongo shiitake, *Lentinula edodes* (Berk) no provocan pérdida significativa en el peso con la administración intraperitoneal de hasta 10,000 mg/kg (Eghianruwa y col., 2011).

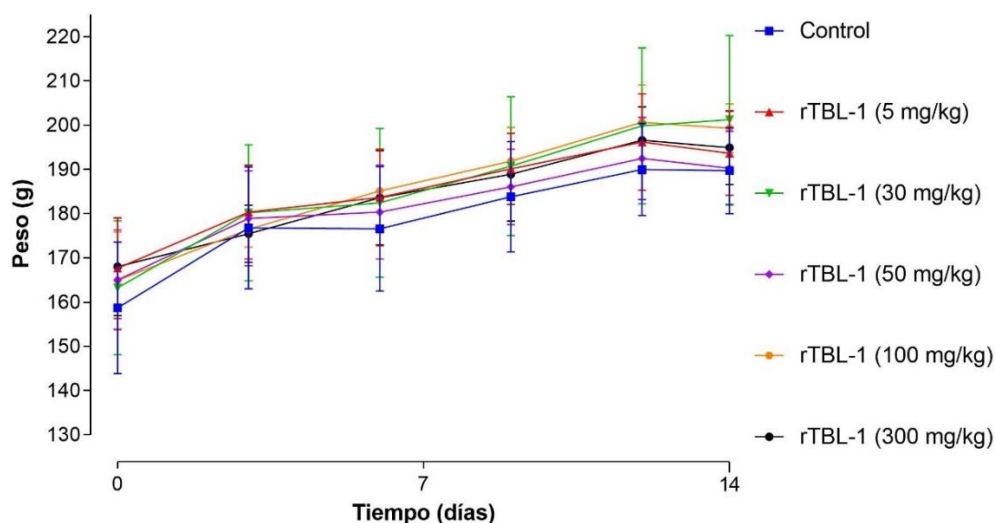


Figura 9. Peso corporal de ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica aguda. El peso de los animales fue registrado cada 72 horas. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratas por grupo. Grupos que son diferentes significativamente con respecto al grupo control se señalan con un asterisco (*). ANOVA una vía, seguida de la prueba Dunnett para comparación de medias, $p < 0.05$.

El consumo de alimento y la ingesta de agua de los animales tratados con la rTBL-1 no mostraron diferencia estadísticamente significativa al comparar con los registros de consumo de los animales control (**Figura 10**). La administración oral agua de la TBLF no afectó la ingesta de agua y alimento, pese a la diarrea presentada durante las primeras 48 h posteriores al tratamiento, y tampoco repercutió en cambios del peso corporal como se describió previamente con respecto a los grupos control (López-Sánchez y col., 2010). Por lo anterior, los resultados sugieren que la administración oral de la rTBL-1 es segura al no afectar de forma temprana los parámetros de peso corporal e ingesta de agua y alimento. Este mismo patrón se ha observado con la administración intraperitoneal de la lectina de granada PgTel en única dosis de 100 mg/kg en ratones, al no mostrar diferencias en el consumo de alimento, agua, ni en la ganancia de peso (Rodrigues da Silva y col., 2022).

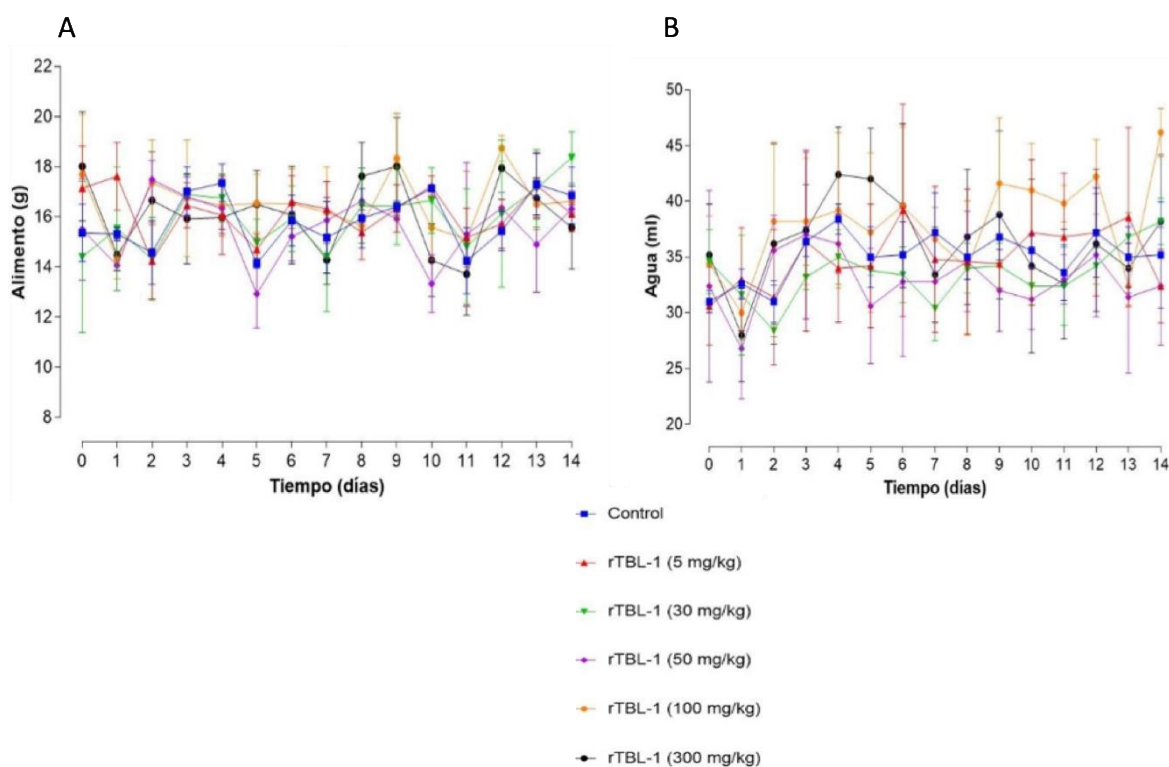


Figura 10. Consumo de alimento y agua de las ratas Sprague Dawley tratadas con diferentes dosis de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica aguda. A) Ingesta de alimento. B) Consumo de agua. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratas por grupo. Grupos que son diferentes significativamente con respecto al grupo control se señalan con un asterisco (*). ANOVA una vía, seguida de la prueba Dunnett para comparación de medias, $p < 0.05$.

La cuantificación de células sanguíneas y otros parámetros hematológicos se muestran en la **Tabla 4**. Se observó que en los grupos administrados con la rTBL-1, la cantidad de leucocitos y plaquetas fue similar a la del grupo control, pero la cantidad de eritrocitos del grupo al que se administraron 100 mg/kg de rTBL-1 fue ligeramente menor a la del grupo control. Lo anterior no representa un signo grave, ya que la concentración de eritrocitos en sangre ($7.7 \pm 0.4 \times 10^6/\mu\text{L}$) se encuentra dentro del rango normal para ratas (Delwatta y col., 2018).

Tabla 4. Biometría hemática de las ratas del estudio de toxicidad aguda

Parámetro	Grupo					
	Control	rTBL-1 (5 mg/kg)	rTBL-1 (30 mg/kg)	rTBL-1 (50 mg/kg)	rTBL-1 (100 mg/kg)	rTBL-1 (300 mg/kg)
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10.4 \pm 1.8	8.8 \pm 2.1	9.9 \pm 3.0	11.9 \pm 3.1	8.5 \pm 1.3	9.0 \pm 2.1
Eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.5 \pm 0.6	7.9 \pm 0.1	7.9 \pm 0.3	7.8 \pm 0.4	7.7 \pm 0.4*	7.9 \pm 0.4
Hemoglobina (g/dL)	17.1 \pm 1.1	15.9 \pm 0.6	15.9 \pm 0.5	16.1 \pm 0.6	16.0 \pm 0.7	15.7 \pm 0.8
Hematocrito (%)	54.5 \pm 4.0	49.6 \pm 1.8	49.6 \pm 1.4	49.9 \pm 2.6	50.1 \pm 2.4	50.0 \pm 3.3
MCV (fL)	63.8 \pm 1.2	63.0 \pm 2.1	63.1 \pm 1.3	63.8 \pm 0.4	65.4 \pm 2.3	63.5 \pm 0.9
MCH (pg)	20.1 \pm 0.9	20.2 \pm 0.8	20.2 \pm 0.6	20.6 \pm 0.5	20.9 \pm 0.9	20.0 \pm 0.5
MCHC (g/dL)	31.4 \pm 0.9	32.1 \pm 0.2	32.0 \pm 0.5	32.4 \pm 0.7	32.1 \pm 0.4	31.5 \pm 1.1
RDW (%)	11.7 \pm 0.6	10.9 \pm 0.6	11.3 \pm 0.7	10.8 \pm 0.7	10.8 \pm 0.4	10.7 \pm 0.7
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	660.0 \pm 59.4	773.3 \pm 188.2	961.8 \pm 152.8	900.0 \pm 77.8	792.3 \pm 186.1	744.0 \pm 8.5
MPV (fL)	6.9 \pm 0.2	7.0 \pm 0.5	7.5 \pm 0.5	6.8 \pm 0.7	6.9 \pm 0.1	6.9 \pm 0.2

Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de cinco ratas por grupo. Grupos que son diferentes significativamente con respecto al grupo control se señalan con un asterisco (*). ANOVA una vía, seguida de la prueba Dunnett para comparación de medias, $p < 0.05$. MCV: volumen globular medio; MCH: hemoglobina corpuscular media; MCHC: concentración media de hemoglobina corpuscular; RDW: ancho de distribución de glóbulos rojos; MPV: volumen plaquetario medio.

Los parámetros bioquímicos que fueron evaluados se muestran en la **Tabla 5**. La urea y creatinina como marcadores de la función renal se mostraron sin cambios distintos a lo determinado en el grupo control. En cuanto a las mediciones de transaminasas encaminadas a evaluar la función hepática, la concentración de alanina-aminotransferasa (TGP) no presentó diferencia significativa entre los grupos tratados

con rTBL-1 y el grupo control. Por otro lado, la aspartato-aminotransferasa (TGO) disminuyó de manera significativa en el grupo tratado con 300 mg/kg de rTBL-1 con respecto al grupo control, no obstante, el valor se encuentra dentro del rango normal de este parámetro (Delwatta y col., 2018). La administración de otras lectinas en estudios agudos, incluso por vía intraperitoneal, como PgTel no genera cambios en parámetros hematológicos, de función renal y hepática (Rodrigues da Silva y col., 2022). Los resultados obtenidos de los animales tratados con la rTBL-1, sobre las células sanguíneas y determinaciones bioquímicas realizadas, son elementos que respaldan que la lectina recombinante muestra un perfil de seguridad adecuado.

Tabla 5. Bioquímica sanguínea de las ratas del estudio de toxicidad aguda.

Parámetro	Grupo					
	Control	rTBL-1 (5 mg/kg)	rTBL-1 (30 mg/kg)	rTBL-1 (50 mg/kg)	rTBL-1 (100 mg/kg)	rTBL-1 (300 mg/kg)
Urea (mg/dL)	40.5±4.0	42.0±2.4	42.8±5.8	39.4±3.1	36.6±1.1	46.6±4.2
Creatinina (mg/dL)	0.6±0.1	0.6±0.2	0.5±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1	0.7±0.1
TGO (UI/L)	256.3±43.9	185.3±22.5	182.4±41.5	199±47.6	197.3±50.5	172.5±40.7*
TGP (UI/L)	59.0±2.4	60.0±4.5	69.2±5.2	59.6±11.8	68.2±11.0	72.4±4.6

Se muestran los valores promedio ± desviación estándar de 5 ratas por grupo. Grupos que son diferentes significativamente con respecto al grupo control se señalan con un asterisco (*). ANOVA una vía, seguida de la prueba Dunnett para comparación de medias, $p < 0.05$. TGP: alanina-aminotransferasa; TGO: la aspartato-aminotransferasa.

En el análisis macroscópico de los órganos no se observaron cambios morfológicos visibles en cuanto al color y la posición de los órganos de las ratas tratadas con la rTBL-1 respecto de los animales en el grupo control. El peso relativo del intestino delgado fue menor en las ratas que recibieron una dosis de 50 mg/kg con respecto al grupo control (**Figura 11**). Para ajustar los datos, se analizó el índice de longitud del intestino delgado considerando el peso del órgano entre en peso del animal y no se encontraron diferencias entre los grupos (**Figura 12**). Parte de la diferencia en peso puede ser dada por las características individuales y también al hecho de que a pesar de estar en ayuno los animales, queda contenido intestinal residual. El intestino grueso y el hígado no mostraron diferencias entre animales tratados con la rTBL-1 con

respecto al grupo control y tampoco en el índice de longitud del intestino grueso al realizar las comparaciones respectivas. Estos resultados son similares a los que se obtuvieron en el estudio de toxicidad aguda de la TBLF donde se reportó que no hubo afección en el peso de estos órganos (intestino delgado, intestino grueso e hígado) aun cuando se probó una dosis mayor (2,000 mg/kg) (López-Sánchez y col., 2010).

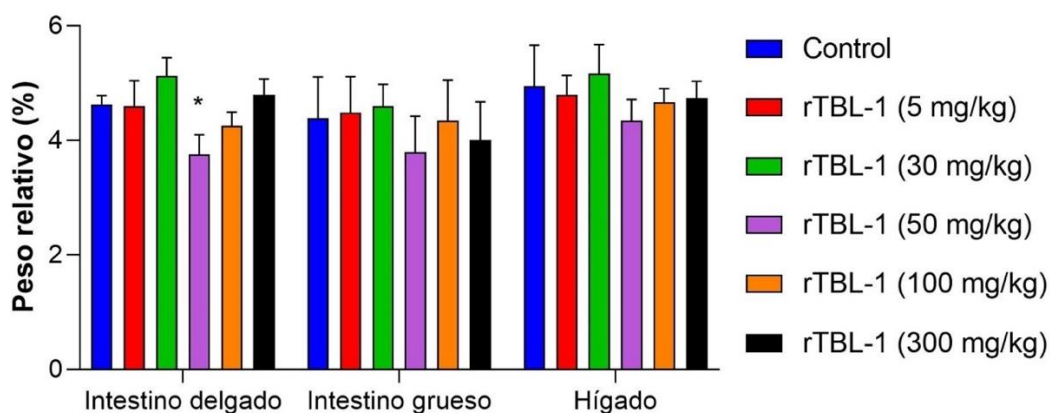


Figura 11. Peso relativo del intestino delgado, intestino grueso e hígado de las ratas Sprague Dawley tratadas con rTBL-1 del estudio de toxicidad intragástrica aguda. Los órganos se pesaron y posterior se fijaron en formol. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratas por grupo. Grupos que son diferentes significativamente con respecto al grupo control se señalan con un asterisco (*). ANOVA una vía, seguida de la prueba Dunnett para comparación de medias, $p < 0.05$.

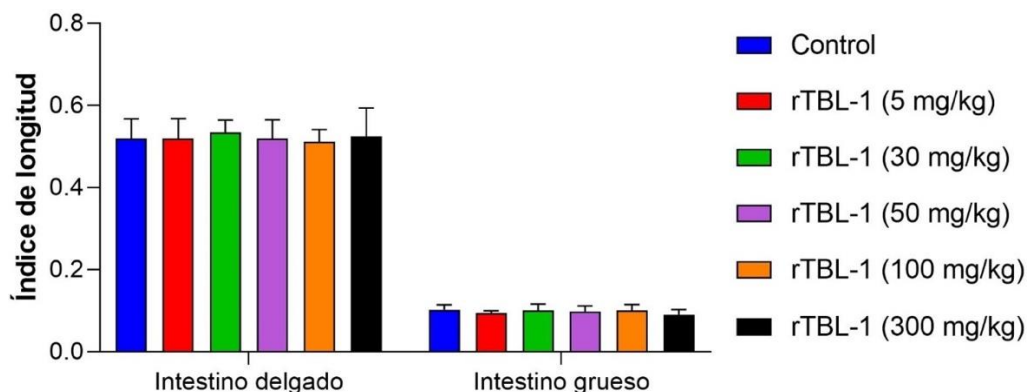


Figura 12. Índice de longitud de intestino delgado e intestino grueso de ratas Sprague Dawley tratadas con rTBL-1 de estudio de toxicidad intragástrica aguda. Los intestinos se midieron y posteriormente se fijaron en formol. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratas por grupo. Grupos que son diferentes significativamente con respecto al grupo control se señalan con un asterisco (*). ANOVA una vía, seguida de la prueba Dunnett para comparación de medias, $p < 0.05$.

El corazón, los pulmones y los riñones de las ratas tratadas con la rTBL-1 no mostraron diferencia significativa en su peso relativo al compararse con los órganos de animales

del grupo control (**Figura 13**). En el estudio de toxicidad oral aguda de la TBLF se visualizó una disminución en el peso de los riñones en los grupos que recibieron una dosis de 50 y 300 mg/kg (López-Sánchez y col., 2010), esto no fue observado con la rTBL-1.

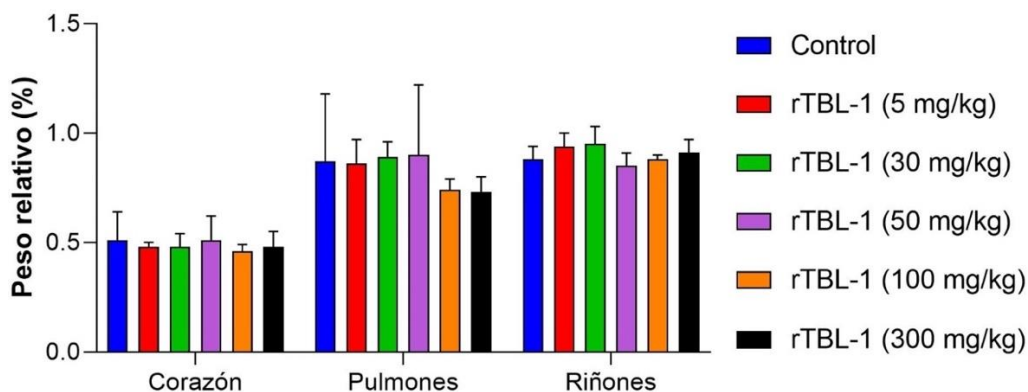


Figura 13. Peso relativo del corazón, pulmones y riñones de ratas Sprague Dawley tratadas con rTBL-1 de estudio de toxicidad intragástrica aguda. Los órganos se pesaron y posterior se fijaron en formol. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratas por grupo. Grupos que son diferentes significativamente con respecto al grupo control se señalan con un asterisco (*). ANOVA una vía, seguida de la prueba Dunnett para comparación de medias, $p < 0.05$.

El estómago de animales tratados con rTBL-1 con las dosis de 30 y 300 mg/kg mostró un mayor peso relativo al momento de compararse con el grupo control (**Figura 14**), así como se describió en el caso de los intestinos delgados donde se propuso que las diferencias en el peso relativo, pese a estar en ayuno los animales, se debe a que hay distinto contenido gástrico que puede afectar el resultado sin embargo, será importante registrar dicho efecto en futuros experimentos. El páncreas mostró un aumento en el peso relativo en las ratas que recibieron una dosis de 100 mg/kg de rTBL-1 que fue estadísticamente diferente al peso de este órgano en los animales del grupo control, pero no así con la dosis de 300 mg/kg de rTBL1, este resultado podría estar relacionado con algún efecto adverso en páncreas como la hiperplasia que observó Pita-López y col (2020). En el caso del cerebro, no se encontró diferencia entre animales tratados con la rTBL-1 con respecto al grupo control. El efecto de aumento en el peso relativo del páncreas es distinto al descrito en el estudio de toxicidad oral aguda de la TBLF donde el grupo que recibió una dosis de 50 mg/kg tuvo una disminución en el peso de este órgano (López-Sánchez y col., 2010).

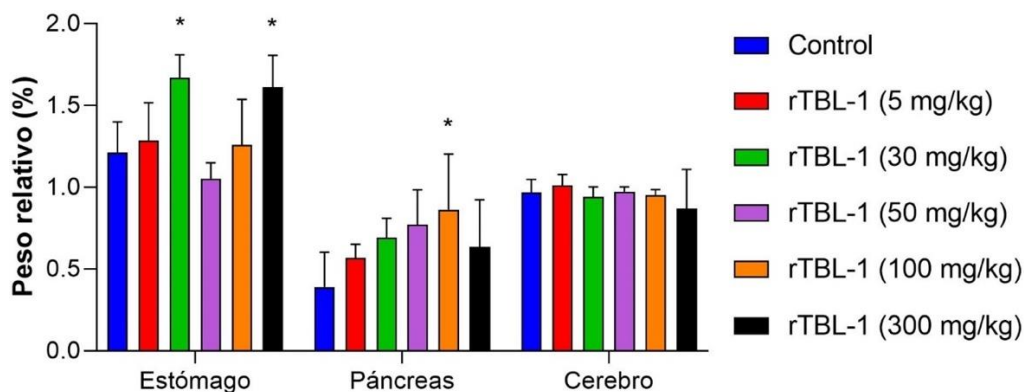


Figura 14. Peso relativo del estómago, páncreas y cerebro de ratas Sprague Dawley tratadas con rTBL-1 de estudio de toxicidad intragástrica aguda. Los órganos se pesaron y posterior se fijaron en formol. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratas por grupo. Grupos que son diferentes significativamente con respecto al grupo control se señalan con un asterisco (*). ANOVA una vía, seguida de la prueba Dunnett para comparación de medias, $p < 0.05$.

El bazo, el timo y los ovarios de las ratas tratadas con la rTBL-1 no mostraron diferencia significativa al compararse con los animales del grupo control (**Figura 15**). En el estudio de toxicidad oral aguda de la TBLF no se describieron cambios en estos órganos para animales de los grupos tratados (López-Sánchez y col., 2010).

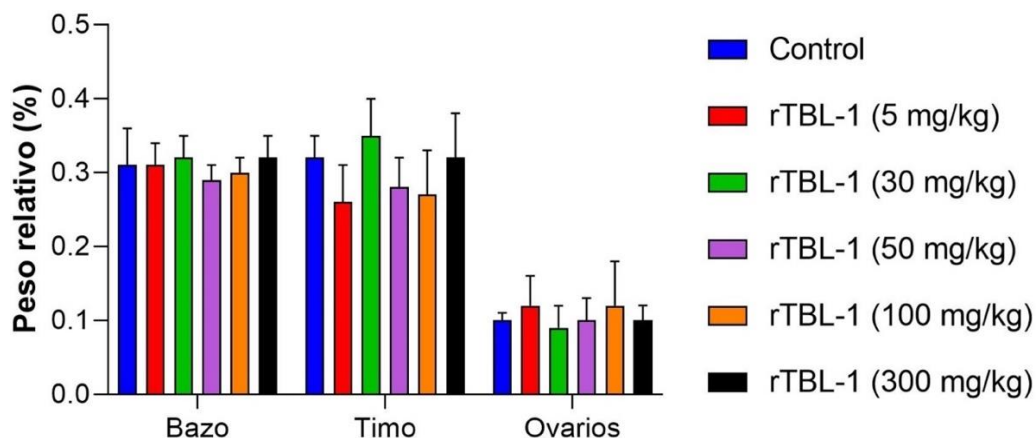


Figura 15. Peso relativo de bazo, timo y ovarios de ratas Sprague Dawley tratadas con rTBL-1 de estudio de toxicidad intragástrica aguda. Los órganos se pesaron y posterior se fijaron en formol. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratas por grupo. Grupos que son diferentes significativamente con respecto al grupo control se señalan con un asterisco (*). ANOVA una vía, seguida de la prueba Dunnett para comparación de medias, $p < 0.05$.

Estos resultados concuerdan con Rodrigues da Silva y col. (2022) donde no hubo diferencia en el peso relativo de órganos (riñón, bazo, pulmón, corazón e hígado)

después de administrar por única vez 100 mg/kg de PgTel a ratones; y con Eghianruwa y col. (2011) después de una única administración intraperitoneal de una lectina del extracto salino de los cuerpos fructíferos del hongo shiitake, *Lentinula edodes*, donde no se observó cambio de peso de riñones, hígado, pulmones y el corazón.

Por el contrario, la administración intraperitoneal de extracto de lectina de frijol tépari en ratones tanto hembras como machos tratados con diferentes concentraciones presentaron un aumento significativo del bazo. Además, en machos con dosis de 400 µg/g se observó disminución del timo, disminución del peso del riñón, y en pulmón en dosis de 1200 µg/g se presentó un incremento, mientras en las hembras hubo una disminución del peso del timo y riñón en dosis a partir de 800 µg/g, en los pulmones se presentó un incremento en su peso corporal y en el hígado una disminución en la dosis de 400 µg/g (Reynoso-Camacho y col., 2003). Si bien en este estudio no se administraron dosis mayores a 300 mg/kg por vía intragástrica, no se observaron cambios en estos órganos, lo que sugiere que la rTBL-1 no presenta toxicidad, relacionado además con la vía de administración (Ning y col., 2015).

Bajo el mismo esquema de toxicidad oral agua (OCDE, 2001), en el rango de dosis de 5 a 300 mg/kg, la rTBL-1 presentó un menor número de efectos adversos en las ratas tratadas con respecto a los resultados descritos para animales que recibieron la TBLF (López-Sánchez y col., 2010). Ante la sobrevivencia de todos los animales y a que no llegaron a observarse signos o síntomas de toxicidad no fue posible determinar la DL₅₀ aún con el uso de la dosis más alta de la rTBL-1 que fue evaluada (300 mg/kg). Es importante mencionar que, además, la TBLF contiene varias lectinas, lo que puede provocar un efecto sinérgico entre ellas. Con la evidencia mostrada se puede considerar que la rTBL-1 pertenece a una sustancia de categoría 3 con baja toxicidad que pudiera clasificarse en categorías de mayor seguridad siempre y cuando se hagan los ensayos pertinentes (OCDE, 2001). Lo anterior da lugar a que la realización de los ensayos de toxicidad a dosis más bajas en administraciones repetidas sea factible y por lo tanto se continuó con el estudio de toxicidad oral subcrónica.

8.3. Estudio de toxicidad subcrónica de la rTBL-1

En los ensayos de toxicidad oral subcrónica y de tolerabilidad de la TBLF (Ferriz-Martínez y col., 2015; López-Sánchez y col., 2010), la dosis de 50 mg/kg mostró ser segura y bien tolerada en las ratas. En curvas dosis respuesta sobre células de cáncer de colon HT-29, la rTBL-1 mostró un efecto citotóxico similar a la TBLF ($LC_{50}= 56 \mu\text{g/mL}$) (Palmerín-Carreño y col., 2021) y $402 \mu\text{g/mL}$ para la lectina nativa (Moreno-Celis y col., 2020). La TBLF corresponde a un 30% aproximadamente del total de la lectina liofilizada, mientras rTBL-1 corresponde al 80% de la proteína total en el producto liofilizado, lo que representa el 63% de equivalencia respecto a la TBLF (Palmerín-Carreño y col., 2021), por lo tanto se optó por realizar el estudio de toxicidad subcrónica de la lectina recombinante con una dosis repetida de 30 mg/kg.

La administración oral en dosis repetida de 30 mg/kg de la rTBL-1 a las ratas durante 28 días no generó ningún signo o síntoma de toxicidad al comparar con respecto al grupo control, excepto que algunos animales presentaron diarrea ocasionalmente. Ningún animal presentó aletargamiento, piloerección, vómito, o alteraciones en la postura y marcha de las ratas, tampoco se observaron cambios en el comportamiento conductual o diferencia en las expresiones faciales. Todas las ratas sobrevivieron al ensayo y completaron el esquema de tratamiento. La rTBL-1 en la dosis de 30 mg/kg mostró una seguridad similar en los parámetros evaluados del comportamiento animal que la dosis de 50 mg/kg de la TBLF bajo los esquemas de dosis repetida durante 28 días (López-Sánchez y col., 2010).

En este estudio de toxicidad subcrónica, las ratas hembra y macho tratadas con la rTBL-1 mantuvieron, conforme su crecimiento, la ganancia de peso al igual que los animales del grupo control (**Figura 16**). La rTBL-1 no provocó la pérdida de peso en las ratas macho como lo reportado bajo el esquema de la TBLF (López-Sánchez y col., 2010) o como lo reportado durante el periodo de tratamiento de tres veces por semana de 50 mg/kg de la TBLF en ratas casi adultas en el estudio de tolerabilidad, donde la pérdida de ganancia de peso fue del 10% (Ferriz-Martínez y col., 2015). No obstante, en ratas jóvenes, bajo el mismo esquema, no se observó disminución de ganancia de

peso (Alatorre-Cruz y col., 2018). En el presente estudio, durante el periodo de recuperación de 6 semanas, las ratas macho ganaron peso de manera similar.

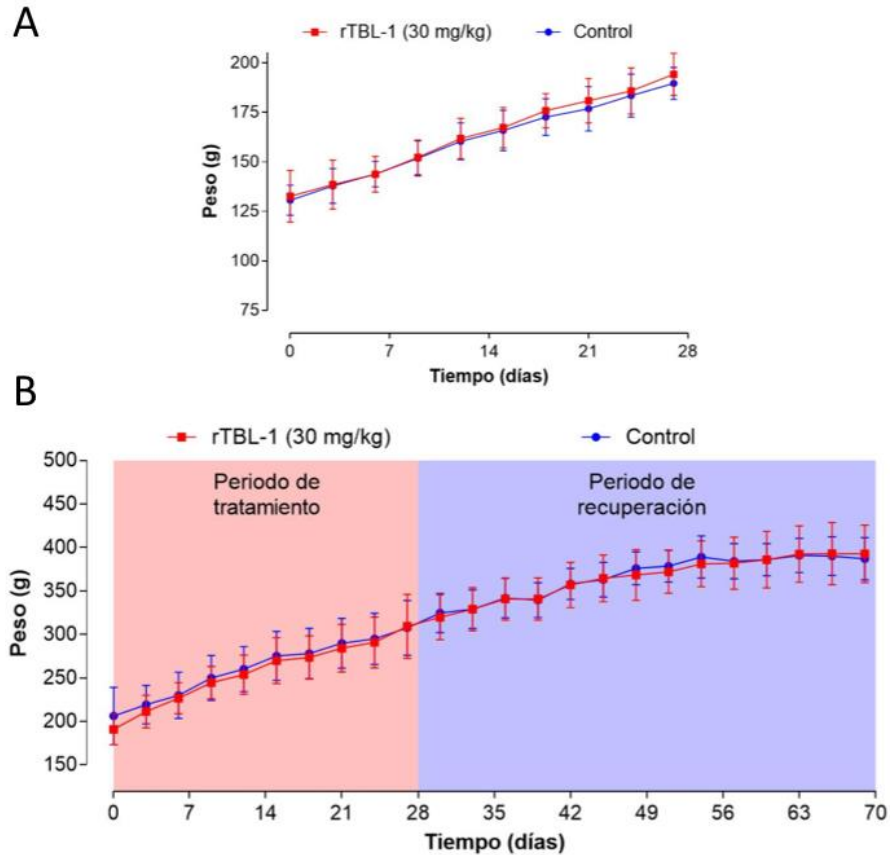


Figura 16. Peso corporal de ratas Sprague Dawley tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica. A) Ratras hembra; B) ratas macho a las que se monitoreó durante la administración y en un periodo de recuperación. El peso fue monitoreado cada 72 horas desde la administración de tratamientos, se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratas por grupo. (*) Grupos estadísticamente diferentes, prueba “t” de Student, $p < 0.05$.

Los consumos de alimento y de agua por las ratas hembra y macho tratadas con la rTBL-1 no mostraron diferencia estadísticamente significativa con los registros de consumo de los animales control (**Figura 17** y **Figura 18**). En los estudios de toxicidad subcrónica, la administración diaria de 5 mg/kg de la TBLF en las ratas macho sí produjo disminución en la ingesta de alimento durante la primera semana de tratamiento (López Sánchez, 2008), así como la dosis repetida de 50 mg/kg en la tercera semana de tratamiento (López-Sánchez y col., 2010). Este efecto fue más pronunciado en el estudio de tolerabilidad, donde la disminución en la ingesta de

alimento se prolongó durante las primeras tres semanas durante el periodo de tratamiento de 50 mg/kg de TBLF en las ratas macho (Ferriz-Martínez y col., 2015). Nuevamente, se observó una mayor seguridad de la rTBL-1 con respecto a la TBLF en las ratas hembra y machos al no afectar, durante el periodo de tratamiento y el tiempo de recuperación, los parámetros de peso corporal e ingesta de agua y alimento.

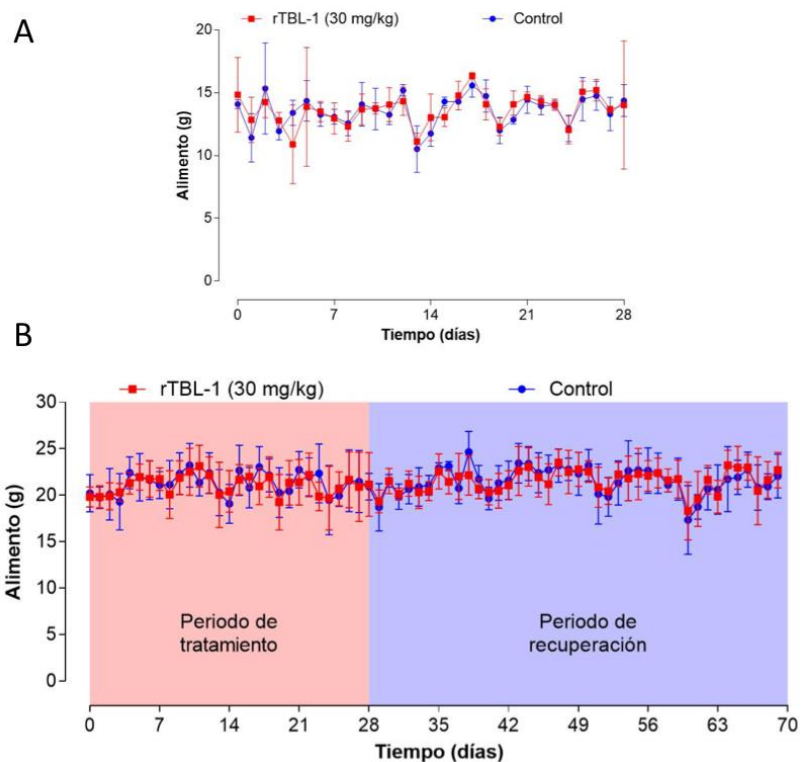


Figura 17. Ingesta de alimento por las ratas Sprague Dawley tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica. A) Ratas hembra; B) ratas macho a las que se monitoreó durante la administración y en un periodo de recuperación. La ingesta de alimento se registró diariamente desde la administración de tratamientos, se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratas por grupo. (*) Grupos estadísticamente diferentes, prueba "t" de Student, $p < 0.05$.

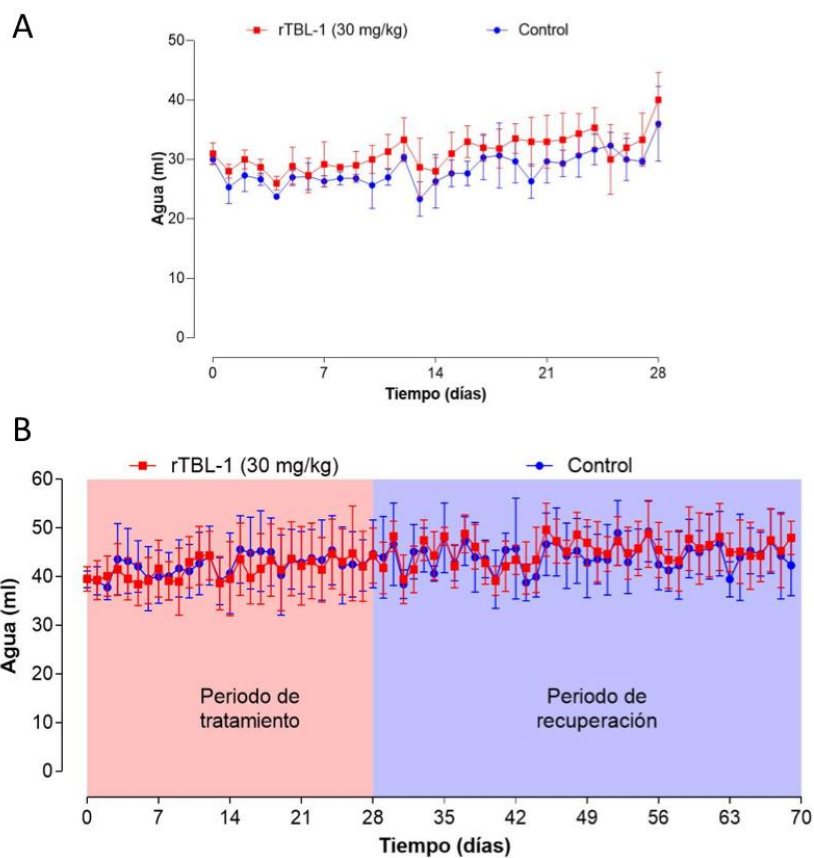


Figura 18. Consumo de agua por las ratas tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica. A) Ratas hembra; B) ratas macho a las que se monitoreó durante la administración y en un periodo de recuperación. El consumo de agua se registró diariamente desde la administración de tratamientos, se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratas por grupo. (*) Grupos estadísticamente diferentes, prueba “t” de Student, $p < 0.05$.

En un estudio de tolerabilidad con la TBLF, 24 h después de la aplicación de una dosis única de 50 mg/kg se encontró que la relación linfocitos/granulocitos fue diferente al comparar con el control (70:30 grupo tratado vs. 90:10 grupo control) (Ferriz-Martínez y col., 2015). Este efecto pudo observarse también al día 9 de administración (aplicación de tercera dosis de 50 mg/kg de TBLF) (Alatorre-Cruz y col, 2018). Por lo anterior, al día 9 de administración de la rTBL-1 se colectó una muestra sanguínea periférica para su análisis (**Tabla 6**). Los resultados no mostraron cambios en leucocitos totales ni por tipo celular para el caso de ratas hembra, pero para el caso de las ratas macho, sí se observaron cambios no estadísticamente significativos y, dados los antecedentes obtenidos con la TBLF, resultan de importancia. Si bien, la cuenta de leucocitos totales no cambió, el porcentaje de linfocitos disminuyó 9.7%, el

de monocitos aumentó 17.2% y el de granulocitos incrementó en 20.3%. Lo anterior sugiere activación del sistema inmune, tal como se ha observado anteriormente para la TBLF (Alatorre-Cruz y col, 2018; Ferriz-Martínez y col., 2015).

Tabla 6. Biometría hemática del estudio de toxicidad subcrónica al noveno día.

Parámetro	Grupo			
	Hembras		Machos	
	rTBL-1 (30 mg/kg)	Control	rTBL-1 (30 mg/kg)	Control
LEUCOCITOS (x10 ³ /μL)	9.7±2.5	9.8±2.6	13.1±3.0	13.1±1.5
Linfocitos (%)	92.1±1.8	92.0±1.1	86.1±2.6	88.3±1.4
Monocitos (%)	4.4±0.4	4.4±1.0	6.8±1.2	5.8±0.6
Granulocitos (%)	3.5±1.5	3.6±0.8	7.1±1.6	5.9±1.0
ERITROCITOS (x10 ⁶ /μL)	8.6±0.2	8.3±0.2	8.1±0.1	8.0±0.1
Hemoglobina (g/dL)	19.8±0.5	19.3±2.3	16.9±0.4	16.8±0.2
Hematocrito (%)	54.0±1.4	51.3±2.0	47.4±1.7	46.7±1.0
MCV (fL)	62.8±1.1	61.8±1.1	58.3±1.9	58.0±0.9
MCH (pg)	22.9±0.2	23.3±2.5	20.7±0.6	20.9±0.5
MCHC (g/dL)	36.6±0.4	37.7±3.8	35.6±0.7	36.1±1.0
RDW (%)	16.6±0.2	15.9±2.0	13.6±0.6	12.7±0.2
PLAQUETAS (x10 ³ /μL)	246.0±89.1	258.5±115.3	196.0±73.5	138.0±12.7
MPV (fL)	7.0±0.2	6.9±0.5	7.0±0.6	6.5±0.1

Se muestran los valores promedio ± desviación estándar de tres ratas por grupo. Grupos que son diferentes significativamente con respecto al grupo control se señalan con un asterisco (*); prueba “t” de Student, p<0.05. MCV: volumen globular medio; MCH: hemoglobina corpuscular media; MCHC: concentración media de hemoglobina corpuscular; RDW: ancho de distribución de glóbulos rojos; MPV: volumen plaquetario medio.

Al término del experimento, se recolectaron de nuevo muestras de sangre por vía intracardiaca, y fueron analizadas (**Tabla 7**). La cuantificación de células sanguíneas y otros parámetros hematológicos permitió identificar que en los grupos administrados con la rTBL-1 la cantidad de leucocitos, eritrocitos y plaquetas fue similar a la del grupo

control tanto en las ratas hembras como en las ratas macho y se encuentran dentro de los valores de referencia para esta especie (Delwatta y col., 2018). De igual forma, los parámetros hematológicos evaluados en los animales que tuvieron un periodo de recuperación fueron similares entre el grupo tratado y el control. Sin embargo, resalta nuevamente que el total de leucocitos fue mayor para los animales tratados con la rTBL-1, 19.2% en el caso de ratas hembra y 23.2% en el caso de ratas macho. Después del reposo, la cantidad de leucocitos fue la misma para el caso de ratas macho.

Tabla 7. Biometría hemática de las ratas al final estudio de toxicidad subcrónica.

Parámetro	Grupo					
	Hembras		Machos		Machos recuperación*	
	rTBL-1 (30 mg/kg)	Control	rTBL-1 (30 mg/kg)	Control	rTBL-1 (30 mg/kg)	Control
LEUCOCITOS (x10 ³ /μL)	9.9±2.5	8.3±4.6	10.6±3.6	8.6±2.5	11.8±2.3	11.9±2.2
ERITROCITOS (x10 ⁶ /μL)	8.5±0.2	8.3±0.3	10.1±1.3	9.5±0.5	8.9±1.3	8.8±1.2
Hemoglobina (g/dL)	16.7±0.5	16.2±0.5	18.7±1.7	18.0±0.8	17.3±0.6	17.0±0.5
Hematocrito (%)	52.5±1.4	51.0±1.7	61.2±6.9	57.9±3.0	51.6±6.1	50.8±6.2
MCV (fL)	62.1±1.1	61.8±1.6	61.0±1.5	61.1±1.1	58.8±0.6	58.1±0.2
MCH (pg)	19.7±0.2	19.7±0.4	18.6±0.7	18.9±0.4	19.8±1.6	19.5±2.0
MCHC (g/dL)	31.7±0.4	31.8±0.5	30.6±0.7	31.0±0.5	33.7±2.6	33.8±3.0
RDW (%)	11.0±0.2	10.8±0.6	13.3±4.2	12.7±2.8	13.9±1.1	13.7±1.8
PLAQUETAS (x10 ³ /μL)	739.8±175.0	796.0±115.9	675.5±43.1	584.7±129.6	648.3±182.4	549.7±86.0
MPV (fL)	7.1±0.3	6.9±0.3	7.2±0.3	6.9±0.1	7.8±1.0	5.6±0.5

Ratas hembra, ratas macho y ratas macho con periodo de recuperación (♦). Se muestran los valores promedio ± desviación estándar de 5 ratas por grupo. Grupos que son diferentes significativamente con respecto al grupo control se señalan con un asterisco (*); prueba “t” de Student, p<0.05. MCV: volumen globular medio; MCH: hemoglobina corpuscular media; MCHC: concentración media de hemoglobina corpuscular; RDW: ancho de distribución de glóbulos rojos; MPV: volumen plaquetario medio.

Estos resultados son similares a los reportados tanto en los estudios de toxicidad subcrónica como de tolerabilidad de la TBLF donde se describe que el efecto presentado en etapas tempranas del tratamiento sobre la relación de linfocitos y leucocitos no es un efecto de largo plazo que se observe en las etapas finales de tratamiento o durante el periodo de recuperación de los animales experimentales (Alatorre-Cruz y col., 2018).

Los parámetros bioquímicos evaluados se muestran en la **Tabla 8**. En las ratas hembra no se observaron cambios significativos en la comparación de las medias de los parámetros determinados con respecto al grupo tratado con rTBL-1 y el grupo control. En el caso de las ratas macho administradas con rTBL-1, se observó un incremento en los niveles séricos de creatinina y albumina que no salieron de los límites establecidos por los valores de referencia (Delwatta y col., 2018), y que no se observó cuando las ratas macho completaron el periodo de recuperación. Llama la atención el alto nivel de triglicérido en ratas macho tratadas con rTBL-1 y controles, incluso fue el doble que el registrado en las hembras. En los estudios de toxicidad oral subcrónica y de tolerabilidad de la TBLF se había descrito una disminución de los niveles séricos de albumina en los animales tratados con respecto al control, un efecto contrario al observado con la administración de la rTBL-1, que se pudo relacionar con la disminución de peso corporal y la disminución en la ingesta de alimento de las ratas del grupo tratado (Alatorre-Cruz y col., 2018).

El resto de marcadores bioquímicos que fueron analizados en los ensayos de la TBLF se reportaron sin cambios significativos al comparar entre grupos tratados y control (Alatorre-Cruz y col., 2018; Ferriz-Martínez y col., 2015; López-Sánchez y col., 2010), de manera similar a los resultados obtenidos para estas determinaciones en el presente estudio cuando se administró la rTBL-1. Para tener un panorama más amplio de la función de los órganos sobre los que se analizaron los marcadores bioquímicos y visualizar la presencia o no presencia de daño tisular se llevó a cabo el análisis macroscópico y microscópico de los mismos.

Tabla 8. Bioquímica sanguínea de las ratas del estudio de toxicidad subcrónica

Parámetro	Grupo					
	Hembras		Machos		Machos recuperación [♦]	
	rTBL-1 (30 mg/kg)	Control	rTBL-1 (30 mg/kg)	Control	rTBL-1 (30 mg/kg) [♦]	Control [♦]
Urea (mg/dL)	53.0±9.3	44.3±4.5	48.0±5.1	46.2±2.8	42.7±4.9	39.7±2.5
Creatinina (mg/dL)	0.6±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1*	0.5±0.04	0.6±0.06	0.5±0.1
Colesterol (mg/dL)	55.2±3.8	49.0±7.2	50.0±5.6	58.6±7.9	ND	ND
Triglicéridos (mg/dL)	87.6±20.8	95.5±16.8	192.6±19.9	197.2±75.3	ND	ND
Colesterol HDL (mg/dL)	20.6±1.0	17.9±3.0	19.7±3.3	21.2±3.5	ND	ND
TGO (UI/L)	188.4±66.4	188.8±52.1	157.0±14.1	175.0±37.3	157.0±14.1	175.0±37.3
TGP (UI/L)	69.6±3.8	74.0±12.9	97.8±34.1	74.8±11.3	97.8±34.1	74.8±11.3
Fosfatasa alcalina (UI/L)	526.6±82.5	478.5±72.9	555.4±35.5	517.2±57.9	ND	ND
Proteínas totales (g/dL)	6.6±0.2	6.5±0.3	6.8±0.3	6.4±0.2	ND	ND
Albumina (g/dL)	5.5±0.3	5.4±0.2	5.5±0.2*	5.1±0.2	ND	ND
Amilasa (UI/L)	561.4±45.0	564.5±82.2	889.4±56.4	840.3±60.0	ND	ND

Ratas hembra, ratas macho y ratas macho con periodo de recuperación (♦). Se muestran los valores promedio ± desviación estándar de 5 ratas por grupo. Grupos que son diferentes significativamente con respecto al grupo control se señalan con un asterisco (*); prueba “t” de Student, p<0.05. HDL: lipoproteínas de alta densidad TGP: alanina-aminotransferasa; TGO: la aspartato-aminotransferasa; ND: No determinado.

En el análisis macroscópico de los órganos no se observaron cambios morfológicos visibles en cuanto al color y la posición de los órganos de las ratas hembra y macho tratadas con la dosis diaria de 30 mg/kg de la rTBL-1 con respecto a los animales del grupo control. En los estudios de toxicidad oral subcrónica de la TBLF se describió una disminución del peso del intestino delgado tanto en ratas hembra como en ratas macho al finalizar el tratamiento (López-Sánchez y col., 2010). En el ensayo de tolerabilidad se describió que en las ratas macho que completaron el tratamiento con la TBLF aumentó el peso relativo del intestino delgado y disminuyó el peso relativo del intestino grueso, efecto que se revirtió después del periodo de recuperación de los animales

experimentales (Alatorre-Cruz y col., 2018). El peso relativo del intestino delgado, el intestino grueso y el hígado fue similar entre las ratas hembra y macho que recibieron el tratamiento de la rTBL-1 con las ratas de sus respectivos grupos control (**Figura 19**). Tampoco se observaron cambios en el índice de longitud del intestino delgado y del intestino grueso entre animales tratados con la rTBL-1 y sus controles (**Figura 20**).

El corazón, los pulmones y los riñones de las ratas tratadas con la rTBL-1 no mostraron diferencia significativa al compararse los pesos relativos de estos órganos con los de animales del grupo control (**Figura 21**). En el estudio de toxicidad oral subcrónica de la TBLF se visualizó una disminución en el peso de los riñones de ratas hembra y macho que recibieron la dosis de 5 mg/kg de peso, así como en el peso de pulmones de ratas hembra que recibieron la misma dosis (López-Sánchez y col., 2010). Esto no fue observado con al rTBL-1 mostrando así una mayor seguridad, de manera similar a los ensayos de tolerabilidad (Alatorre-Cruz y col., 2018).

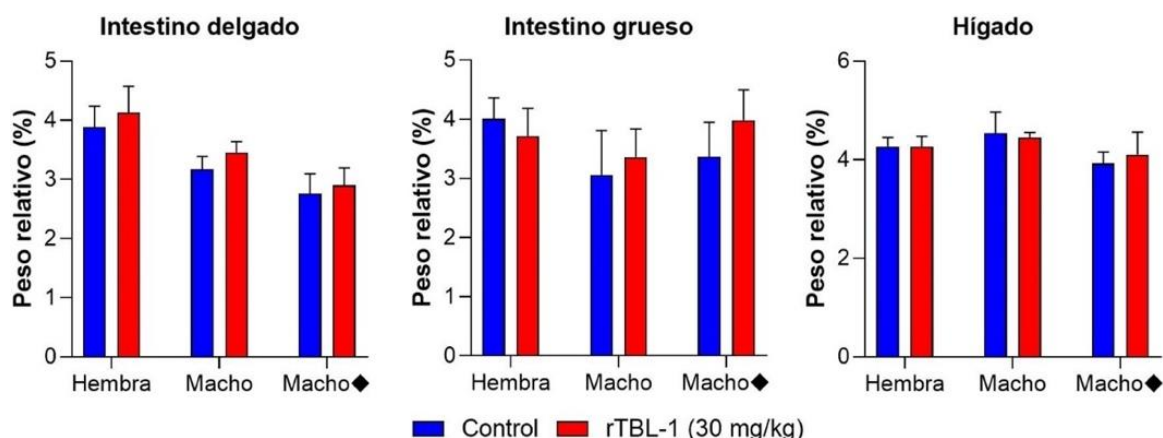


Figura 19. Peso relativo del intestino delgado, intestino grueso e hígado de ratas Sprague Dawley tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica. Ratas hembra, ratas macho y ratas macho con periodo de recuperación (macho♦). Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratas por grupo. (*) Grupos estadísticamente diferentes, prueba "t" de Student, $p < 0.05$.

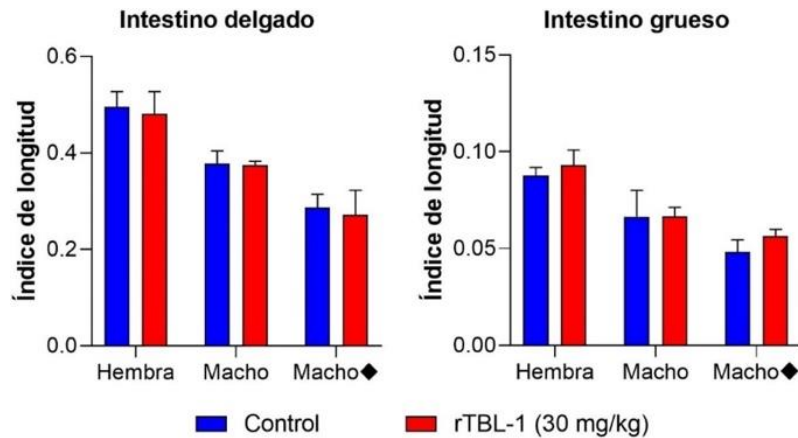


Figura 20. Índice de longitud de intestino delgado e intestino grueso de ratas Sprague Dawley tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica. Ratas hembra, ratas macho y ratas macho con periodo de recuperación (macho♦). Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratas por grupo. (*) Grupos estadísticamente diferentes, prueba “t” de Student, $p < 0.05$.

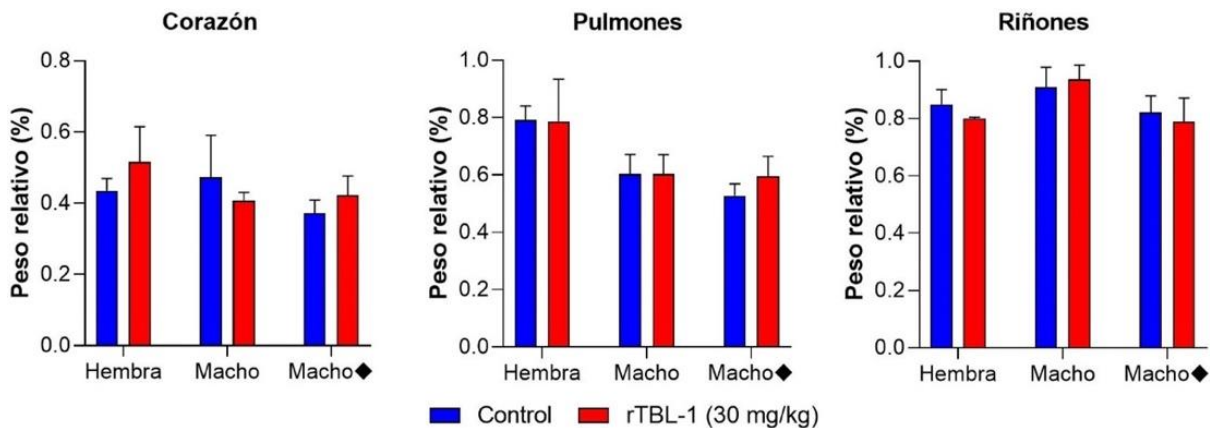


Figura 21. Peso relativo del corazón, pulmones y riñones de ratas Sprague Dawley tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad oral subcrónica. Ratas hembra, ratas macho y ratas macho con periodo de recuperación (macho♦). Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratas por grupo. (*) Grupos estadísticamente diferentes, prueba “t” de Student, $p < 0.05$.

El peso relativo del estómago, páncreas y cerebro de animales tratados con la dosis diaria de 30 mg/kg de la rTBL-1 (**Figura 22**) así como del bazo, el timo, los ovarios (en las ratas hembra) y los testículos (en las ratas macho) (**Figura 23**) fue similar al peso relativo de estos órganos en los animales del grupo control. En los ensayos de toxicidad oral subcrónica y de tolerabilidad de la TBLF tampoco fueron reportados cambios significativos en el análisis macroscópico de estos órganos al comparar entre

grupos tratados y control (Alatorre-Cruz y col., 2018; Ferriz-Martínez y col., 2015; López-Sánchez y col., 2010).

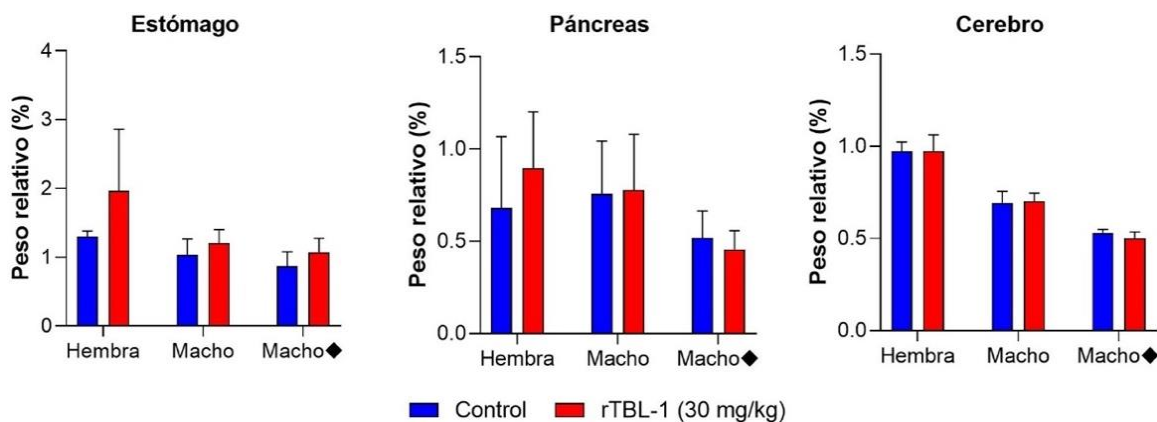


Figura 22. Peso relativo del estómago, páncreas y cerebro de ratas Sprague Dawley tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica. Ratas hembra, ratas macho y ratas macho con periodo de recuperación (macho♦). Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratas por grupo. (*) Grupos estadísticamente diferentes, prueba “t” de Student, $p < 0.05$.

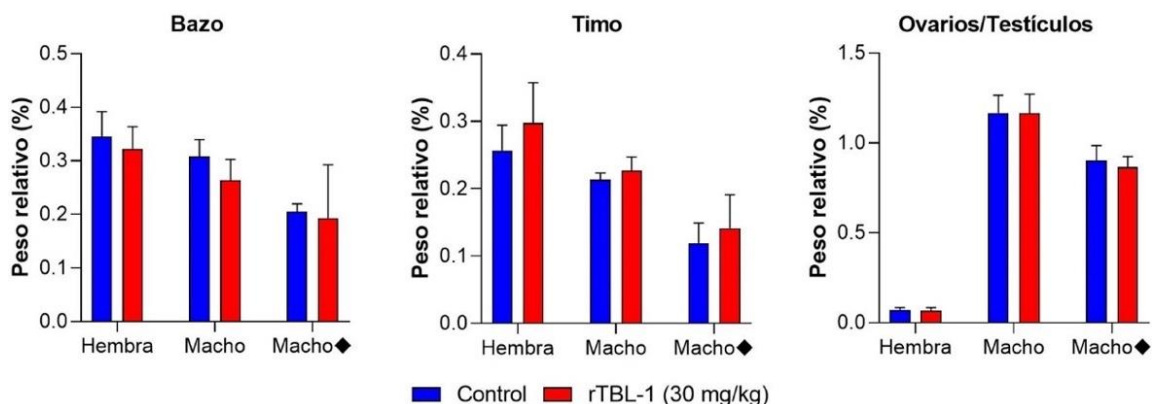


Figura 23. Peso relativo de bazo, timo y ovarios de ratas Sprague Dawley tratadas con 30 mg/kg de rTBL-1 en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica. Ratas hembra, ratas macho y ratas macho con periodo de recuperación (macho♦). Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 5 ratas por grupo. (*) Grupos estadísticamente diferentes, prueba “t” de Student, $p < 0.05$.

En cuanto a la histopatología de órganos después de la exposición diaria por 28 días de la rTBL-1 no se observaron cambios en páncreas en ambos grupos (**Figura 24**) no obstante, en el grupo tratado con 30 mg/kg en el bazo se observó esplenomegalia por líquido. Lo anterior sugiere un efecto estimulador en bazo debido a la acción de la rTBL-1. En el caso del hígado, en el grupo experimental se observó congestión

moderada, hepatitis multifocal leve y degeneración glucogénica, sin embargo, llama la atención que el grupo control también presentó congestión ligera y hepatitis multifocal leve. Por ello se puede pensar que los efectos observados no corresponden a causa-efecto de la administración de la rTBL-1 sino a un factor externo que afectó a ambos grupos. Además, este efecto puede estar relacionado con los altos niveles de triglicéridos presentados en las ratas macho después de la exposición subcrónica. En estudios previos usando una dosis de 50 mg/kg (López-Sánchez y col., 2010) no se observaron alteraciones en hígado, bazo, timo, corazón o estómago. No obstante Alatorre-Cruz y col. (2018) evidenciaron un aumento no significativo de la pulpa blanca a las 6 semanas de administración de 50 mg/kg de TBLF, lo que sugiere activación del sistema inmunológico, además, observaron hipertrofia en el páncreas exocrino (acinos pancreáticos), con un aumento de los acinos y cambios en su morfología (células acinares redondas en vez de alveolar). Este hecho no fue observado con la administración de rTBL-1, posiblemente porque la TBLF contiene más proteínas que pueden llevar a cabo efectos sinérgicos. Se conoce que la hipertrofia del páncreas está relacionado a los inhibidores de tripsina contenido en las harinas de semillas de leguminosas (Greer y col., 1985).

Después de 6 semanas de recuperación, la histopatología de órganos no mostró cambios a nivel del páncreas en ambos grupos (**Figura 25**) sin embargo, en el grupo tratado con rTBL-1, en el bazo se observó hiperplasia de la pulpa blanca, lo que sugiere activación del sistema inmunológico. En el caso del hígado en el grupo experimental se observó congestión moderada, hepatitis multifocal leve y degeneración glucogénica, mientras en el control también presentó congestión ligera y hepatitis multifocal leve, es decir después de 6 semanas de recuperación se siguieron observando los efectos encontrados después de la administración diaria de rTBL-1, sin embargo, dichos efectos no son atribuibles a la rTBL-1. Los resultados obtenidos sugieren que la rTBL-1 presenta menos efectos adversos que el uso de TBLF.

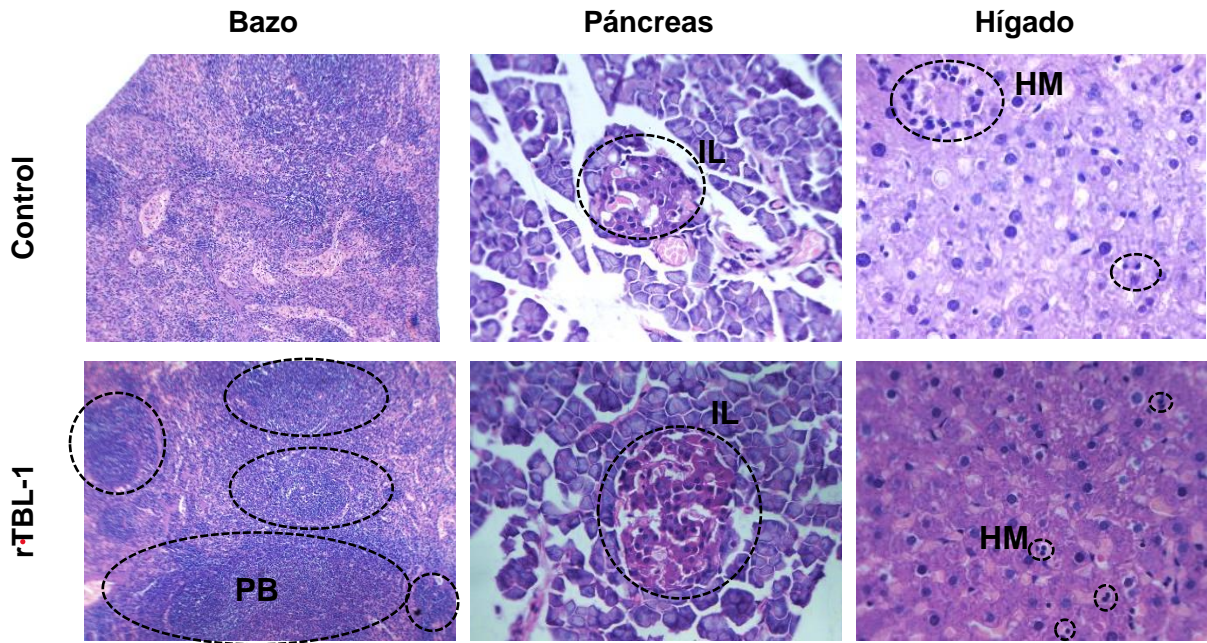


Figura 24. Micrografías representativas de cortes histológicos de bazo, páncreas e hígado de ratas Sprague Dawley en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina; se muestran los cortes de bazo a 10x y los cortes de páncreas e hígado a 40x. PB: Pulpa blanca; IL: islote de Langerhans; HM: Hepatitis multifocal

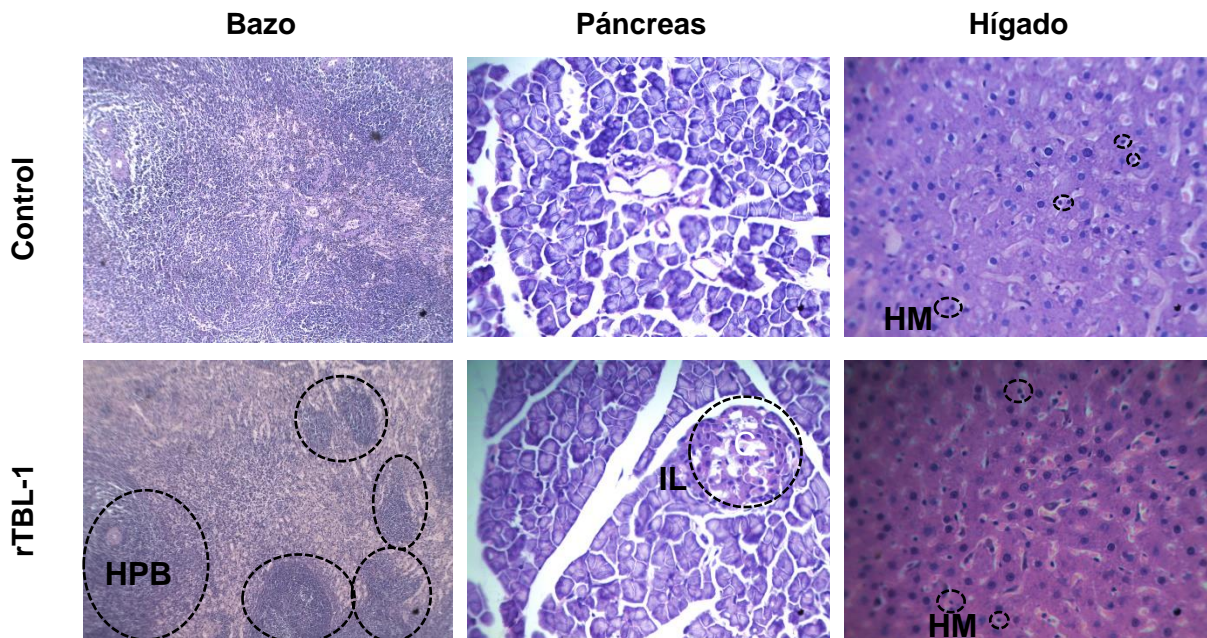


Figura 25. Micrografías representativas de cortes histológicos de bazo, páncreas e hígado de ratas Sprague Dawley en el estudio de toxicidad intragástrica subcrónica después de un periodo de recuperación de 6 semanas. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina; se muestran los cortes de bazo a 10x y los cortes de páncreas e hígado a 40x. HPB: Hiperplasia de la Pulpa blanca; IL: Islote de Langerhans; HM: Hepatitis multifocal

Algunas otras lectinas como las presentes en el frijol rojo crudo (*P. vulgaris*), administrado al 1% en la dieta provocan la muerte de ratas en un lapso dos semanas, incluso si éste se somete a proceso de cocción por calor a 70 °C por 30 min al 20% de la dieta ocasiona retardo en el crecimiento (McPherson, 1990). En humanos la administración oral única de *P. vulgaris* crudo y en altas concentraciones ocasiona manifestaciones gastrointestinales como náusea, vómito, hinchazón y diarrea (He y col., 2017). Efectos que no se presentan cuando el frijol es sometido a proceso de cocción adecuado previo a su consumo.

La TBLF causó efectos adversos mínimos en ratas tratadas en los ensayos de toxicidad oral aguda y toxicidad oral subcrónica (López-Sánchez y col., 2010), y también mostró ser bien tolerada ya que la mayoría de efectos observados fueron reversibles después de un periodo de recuperación (Alatorre-Cruz y col., 2018; Ferriz-Martínez y col., 2015; López-Sánchez y col., 2010). El presente estudio muestra que la rTBL-1 también es bien tolerada por ratas Sprague Dawley y mantiene su actividad biológica como activador del sistema inmune.

VIII. CONCLUSIONES

En el presente estudio, la administración intragástrica aguda y subcrónica de rTBL-1 mostró buena tolerabilidad y efectos similares a los observados con la TBLF como la activación del sistema inmune. No se manifestaron alteraciones en los parámetros hematológicos, excepto por el incremento de células blancas en los grupos tratados, ni en los marcadores bioquímicos que pudieran sugerir disfunción hepática, renal, pancreática o nutricia. Tampoco se identificaron cambios macroscópicos en los órganos de los roedores que fueron tratados con la rTBL-1 y a nivel microscópico no se observaron cambios estructurales o alteraciones celulares atribuibles a la rTBL-1, a excepción de la esplenomegalia e incremento de la pulpa blanca en bazo, lo que apunta a la activación del sistema inmune. Los resultados hasta ahora obtenidos sugieren que la administración oral de la rTBL-1 en ratas hembra y macho, en dosis repetida de 30 mg/kg por 28 días, es segura.

Estudios posteriores se centrarán en la histopatología tanto del intestino delgado como del intestino grueso a nivel de las microvellosidades y de las criptas de colon, ya que una de las características identificadas hasta el momento para la mayoría de las lectinas provenientes de leguminosas, incluida la TBLF, es la atrofia intestinal de las microvellosidades. Este punto es indispensable para conocer los efectos adversos más importantes de la rTBL-1 y poder continuar los estudios sobre cáncer de colon en roedores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alatorre-Cruz, J. M., Pita-López, W., López-Reyes, R. G., Ferriz-Martínez, R. A., Cervantes-Jiménez, R., Guerrero Carrillo, M. de J., Aranda Vargas, P. J., López-Herrera, G., Rodríguez-Méndez, A. J., Zamora-Arroyo, A., Gutiérrez-Sánchez, H., Reis de Souza, T., Blanco-Labra, A., and García-Gasca, T. (2018). Effects of intragastrically-administered Tepary bean lectins on digestive and immune organs: Preclinical evaluation. *Toxicology Reports*, 5, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.008>
- American Cancer Society. (2020). *About Colorectal Cancer*. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/key-statistics.html>
- Augustyniak, M., and Galas, A. (2022). Calcium intake may explain the reduction of colorectal cancer odds by dietary selenium - a case-control study in Poland. *BMC Nutrition*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40795-022-00515-w>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Calva-Arcos, M., and Acevedo-Tirado, M. T. (2009). Revisión y actualización general en cáncer colorrectal. *Anales de Radiología México*, 1, 99–115. <https://doi.org/10.1002/sat.4600070104>
- Castillo-Villanueva, A., and Abdullaev, F. (2005). Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de Investigación Clínica*, 57(1), 55–64. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2013.05.002>
- Cavalcante da Silva, G., Macário de Oliveira, A., Barbosa Machado, J. C., Assunção Ferreira, M. R., Lys de Medeiros, P., Lira Soares, L. A., Ivone, A. de S., Guedes Paiva, P. M., and Henrique Napoleão, T. (2020). Toxicity assessment of saline extract and lectin-rich fraction from *Microgramma vacciniifolia* rhizome. *Toxicon*, 187(September), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.021>
- De Mejia, E. G., Hankins, C. N., Paredes-Lopez, O., and Shannon, L. M. (1990). The

- Lectins and Lectin-Like Proteins of Tepary Beans (*Phaseolus Acutifolius*) and Tepary common Bean (*Phaseolus Vulgaris*) Hybrids. *Journal of Food Biochemistry*, 14(2), 117–126. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1990.tb00825.x>
- De Mejía, E. G., and Prisecaru, V. I. (2005). Lectins as bioactive plant proteins: A potential in cancer treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(6), 425–445. <https://doi.org/10.1080/10408390591034445>
- Delwatta, S. L., Gunatilake, M., Baumans, V., Seneviratne, M. D., Dissanayaka, M. L. B., Batagoda, S. S., Udagedara, A. H., and Walpola, P. B. (2018). Reference values for selected hematological, biochemical and physiological parameters of Sprague-Dawley rats at the Animal House, Faculty of Medicine, University of Colombo, Sri Lanka. *Animal Models and Experimental Medicine*, 1–5. <https://doi.org/10.1002/ame2.12041>
- Dena Beltrán, J. L. (2020). Evaluación del mecanismo de acción de una lectina recombinante del frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células de cáncer de colon. (*Tesis de Maestría*) Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro.
- Diehl, K. H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. M., and Van De Vorstenbosch, C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 21(1), 15–23. <https://doi.org/10.1002/JAT.727>
- Eghianruwa, Q., Odekanyin, O., and Kuku, A. (2011). Physicochemical properties and acute toxicity studies of a lectin from the saline extract of the fruiting bodies of the shiitake mushroom, *lentinula edodes* (Berk). *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2(4), 309–317.
- Estrada-Martínez, L. E., Moreno-Celis, U., Cervantes-Jiménez, R., Ferriz-Martínez, R. A., Blanco-Labra, A., and García-Gasca, T. (2017). Plant lectins as medical tools against digestive system cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1403. <https://doi.org/10.3390/ijms18071403>
- Fabricant, D. S., and Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109(Suppl 1), 69.

<https://doi.org/10.1289/EHP.01109S169>

- Ferriz-Martinez, R. A., Torres-Arteaga, I. C., Blanco-Labra, A., and Garcia-Gasca, T. (2010). The role of plant lectins in cancer treatment. In *New Approaches in the Treatment of Cancer (Capítulo 4)* (pp. 71–90).
- Ferriz-Martínez, R., García-García, K., Torres-Arteaga, I., Rodríguez-Mendez, A. J., Guerrero-Carrillo, M. de J., Moreno-Celis, U., Ángeles-Zaragoza, M. V., Blanco-Labra, A., Gallegos-Corona, M. A., Robles-Álvarez, J. P., Mendiola-Olaya, E., Andrade-Montemayor, H. M., Garcia, O. P., and Garcia-Gasca, T. (2015). Tolerability assessment of a lectin fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats. *Toxicology Reports*, 2, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.10.015>
- García-Gasca, T., and Andrade-Portillo, V. P. (2021). Protocolo de manejo de animales de experimentación para la realización de estudios in vivo y obtención de anticuerpos policlonales en la Facultad de Ciencias Naturales. *Facultad de Ciencias Naturales - UAQ*, 1–12.
- García-Gasca, T., García-Cruz, M., Hernandez-Rivera, E., López-Matínez, J., Castañeda-Cuevas, A. L., Yllescas-Gasca, L., Rodríguez-Méndez, A. J., Mendiola-Olaya, E., Castro-Guillén, J. L., and Blanco-Labra, A. (2012). Effects of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) protease inhibitor and Semipure lectin fractions on cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 64(8), 1269–1278. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.722246>
- Granados Mora, E. (2014). Cáncer colorrectal: un enfoque actualizado del tamizaje y epidemiología. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 61(612), 763–770.
- Greer, F., Brewer, A. C., and Pusztal, A. (1985). Effect of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) toxin on tissue weight and composition and some metabolic functions of rats . *British Journal of Nutrition*, 54(1), 95–103. <https://doi.org/10.1079/bjn19850096>
- Hamid, R., and Masood, A. (2009). Dietary Lectins as Disease Causing Toxicants. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(3), 293–303. <https://doi.org/10.3923/pjn.2009.293.303>

- He, S., Simpson, B. K., Sun, H., Ngadi, M. O., Ma, Y., and Huang, T. (2017). Phaseolus vulgaris lectins: A systematic review of characteristics and health implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(1), 70–83. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1096234>
- Hossain, S., Karuniawati, H., Abdulrahman Jairoun, A., Urbi, Z., Jiun Ooi, D., John, A., Chee Lim, Y., Kibria, K., Mohiuddin, A. K. M., Chiau Ming, L., Wen Goh, K., and Abdul Hadi, M. (2022). Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers*, 14(1732), 1–25.
- Huan-Yao, L., and Chih-Peng, C. (2009). Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. *Journal of Biomedical Science*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-10>
- IARC. (2020). *Cancer Today - GLOBOCAN*. International Agency for Research on Cancer - World Health Organization. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&i
- INEGI. (2022). *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer: Datos nacionales*. (Issue 2021).
- Jordinson, M., El-Hariry, I., Calnan, D., Calam, J., and Pignatelli, M. (1999). Vicia faba agglutinin, the lectin present in broad beans, stimulates differentiation of undifferentiated colon cancer cells. *Gut*, 44(5), 709–714. <https://doi.org/10.1136/gut.44.5.709>
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., Van De Velde, C. J. H., and Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(February 2016), 1–25. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

<http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chnge-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/>

- Lam, S. K., and Ng, T. B. (2010). Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield. *Phytomedicine*, 17(6), 457–462. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.07.017>
- Lin, P., and Tzi, B. N. (2008). Preparation and biological properties of a melibiose binding lectin from *Bauhinia variegata* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10481–10486. <https://doi.org/10.1021/jf8016332>
- Lis, H., and Sharon, N. (1998). Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, 98(2), 637–674. <https://doi.org/10.1021/cr940413g>
- Liu, B., Zhang, B., Min, M. wei, Bian, H. jiao, Chen, L. fei, Liu, Q., and Bao, J. ku. (2009). Induction of apoptosis by *Polygonatum odoratum* lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(8), 840–844. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.04.020>
- López-Sánchez, C., López-Martínez, F. J., Castañeda-Cuevas, A. L., Yllescas-Gasca, L., Ferriz-Martínez, R. A., Torres-Arteaga, I. C., and García-Gasca, T. (2010). Evaluación de la toxicidad in vitro e in vivo de lectinas de frijol Tépari. *Ciencia@UAQ*, 3(1), 3–13.
- López Sánchez, C. (2008). *Estudio sobre la toxicidad aguda y subcrónica vía oral de una lectina de frijol Tépari* [Universidad Autónoma de Querétaro]. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/689>
- Martínez-Alarcón, D., Varrot, A., Fitches, E., Gatehouse, J. A., Cao, M., Pyati, P., Blanco-Labra, A., and Garcia-Gasca, T. (2020). Recombinant lectin from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) with specific recognition for cancer-associated glycans: Production, structural characterization, and target identification. *Biomolecules*, 10(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/biom10040654>
- Martínez Alarcón, D. (2017). Producción de una lectina recombinante de frijol tépari

(phaseolus acutifolius) con efecto citotóxico sobre células de cáncer de colon. (Tesis de Maestría) Centro de Investigación y Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional. Irapuato.

McPherson, L. L. (1990). The effect of the consumption of red kidney beans on the growth rate of rats and the implications for human populations. *Journal of the Royal Society of Health*, 110(6), 222–226. <https://doi.org/doi:10.1177/146642409011000610>

Moreno-Celis, U., López-Martínez, F. J., Blanco-Labra, A., Cervantes-Jiménez, R., Estrada-Martínez, L. E., García-Pascalín, A. E., Guerrero-Carrillo, M. D. J., Rodríguez-Méndez, A. J., Mejía, C., Ferríz-Martínez, R. A., and García-Gasca, T. (2017). Phaseolus acutifolius Lectin Fractions Exhibit Apoptotic Effects on Colon Cancer: Preclinical Studies Using Dimethylhydrazine or Azoxi-Methane as Cancer Induction Agents. *Molecules*, 22(10), 1670. <https://doi.org/10.3390/molecules22101670>

Moreno-Celis, U., López-Martínez, F. J., Cervantes-Jiménez, R., Ferríz-Martínez, R. A., Blanco-Labra, A., and García-Gasca, T. (2020). Tepary Bean (Phaseolus acutifolius) lectins induce apoptosis and cell arrest in G0/G1 by P53(Ser46) phosphorylation in colon cancer cells. *Molecules*, 25(5), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules25051021>

Ning, Z. H., Long, S., Zhou, Y. Y., Peng, Z. Y., Sun, Y. N., Chen, S. W., Su, L. M., and Zhao, Y. H. (2015). Effect of exposure routes on the relationships of lethal toxicity to rats from oral, intravenous, intraperitoneal and intramuscular routes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(2), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.008>

OCDE. (2001). OCDE/OECD 423 - Guideline for testing of chemicals - Acute oral toxicity-Acute toxic class method. In *Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos*. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>

OCDE. (2008). OCDE/OECD 407 Guideline for testing of chemicals - Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. *Guidelines for the Testing of Chemicals*, 4, 13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1787/20745788>

- Osman, M. A., Reid, P. M., and Weber, C. W. (2003). The Effect of Feeding Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Proteinase Inhibitors on the Growth and Pancreas of Young Mice. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(3), 111–115. <https://doi.org/10.3923/pjn.2003.111.115>
- Palmerín-Carreño, D., Martínez-Alarcón, D., Dena-Beltrán, J. L., Vega-Rojas, L. J., Blanco-Labra, A., Escobedo-Reyes, A., and García-Gasca, T. (2021). Optimization of a recombinant lectin production in *pichia pastoris* using crude glycerol in a fed-batch system. *Processes*, 9(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/pr9050876>
- Pita-López, W., Gomez-Garay, M., Blanco-Labra, A., Aguilera-Barreyro, A., Reis-de Souza, T. C., Olvera-Ramírez, A., Ferriz-Martinez, R., and García-Gasca, T. (2020). Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) lectin fraction provokes reversible adverse effects on rats' digestive tract. *Toxicology Research*, 9(5), 714–725. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa062>
- Repetto Jiménez, M., and Repetto Khun, G. (2009). *Toxicología fundamental* (4th ed.). Ediciones Díaz de Santos.
- Reyes-Rocha, B. L., and Gallegos-Torres, R. M. (2011). Lectinas Vegetales: Una Alternativa Terapéutica para el Cáncer. *Desarrollo Científico Enfermería*, 19, 179–182.
- Reyes, J., Dolz, C., and Cortés, J. (2020). El cáncer de colon. *Medicina Balear*, 35(3), 16–23. <https://doi.org/10.3306/MEDICINABALEAR.35.03.16>
- Reynoso-Camacho, R., González de Mejía, E., and Loarca-Piña, G. (2003). Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food and Chemical Toxicology*, 41, 21–27.
- Rivera, S. M., and Goodman Gilman, A. (2019). La invención de fármacos y la industria farmacéutica. In L. L. Brunton, R. Hilal-Dandan, & B. C. Knollmann (Eds.), *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (13th ed., pp. 3–11). McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Rodrigues da Silva, A., de Vasconcelos Alves, R. R., Pedrosa da Silva, S., Castelo

- Branco, S. J. dos S., de Oliveira Marinho, A., dos Santos Souza, T. G., Aparecido Chagas, C., Guedes Paiva, P. M., Macário de Oliveira, A., and Henrique Napoleão, T. (2022). Acute toxicity and genotoxicity assessment of PgTeL, a lectin from pomegranate sarcotesta, in mice. *South African Journal of Botany, March*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.02.035>
- SAGARPA. (2001). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Norma Oficial Mexicana*, 1–58.
- Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T., and Przybyłowicz, K. E. (2021). A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. *Cancers*, 13(9), 1–23. <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>
- Schwenk, M., Werner, M., and Younes, M. (2002). Regulatory toxicology: objectives and tasks defined by the working group of the German society of experimental and clinical pharmacology and toxicology. *Toxicology Letters*, 126(3), 145–153. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00457-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00457-X)
- Sharon, N., and Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11), 53–62. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh122>
- SSA. (2016). *NORMA Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de fármacos*. (NOM-164-SSA1-2015). Diario Oficial de La Federación; Secretaría de Salud. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5424377&fecha=04/02/2016#gs.tab=0
- Tárraga López, P. J., Solera Albero, J., and Rodríguez-Montes, J. A. (2014). Primary and secondary prevention of colorectal cancer. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*, 7, 33–46. <https://doi.org/10.4137/CGast.S14039>
- Tirado Gómez, L. L., and Mohar Betancourt, A. (2008). Epidemiología del cáncer de colon y recto. In *Gaceta Mexicana de Oncología* (Vol. 7, Issue 5). <https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=57221>

Van Damme, E. J. M. (2022). 35 Years in Plant Lectin Research: a Journey From Basic Science To Applications in Agriculture and Medicine. *Glycoconjugate Journal*, 39(1), 83–97. <https://doi.org/10.1007/s10719-021-10015-x>