



**UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y  
TECNOLÓGICAS**

**POSGRADO EN BIOCENCIAS**

---

**EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE LA LECTINA  
VL (*Acacia constricta*) SOBRE CÉLULAS DE  
CÁNCER DE MAMA**

**TESIS**

que para obtener el grado de:

**MAESTRO EN BIOCENCIAS**

presenta:

**EDGAR ROGELIO ACEDO ESPINOZA**

**Hermosillo, Sonora, México**

**16 de diciembre de 2020**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Hermosillo, Sonora a 24 de febrero del 2021

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA  
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada **Efecto Antiproliferativo de la Lectina VL sobre Células de Cáncer de Mama**, en los sucesivos LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de **Maestro en Biociencias** virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

ATENTAMENTE

Edgar Rogelio Acedo Espinoza

Edgar Acedo

---

Nombre y Firma del Autor



Hermosillo, Sonora, México

Julio, 2020.

ESTUDIO DEL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE LA LECTINA VL  
(*Acacia constricta*) SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

T E S I S

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

EDGAR ROGELIO ACEDO ESPINOZA

Hermosillo, Sonora, México

16 de diciembre de 2020

## APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada “Efecto antiproliferativo de la lectina VL (*Acacia constricta*) sobre células de cáncer de mama” presentada por Edgar Rogelio Acedo Espinoza la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.




---

Dra. María Magdalena Ortega Nieblas  
Director



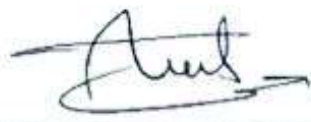
---

Dra. Irlanda Lagarda Díaz  
Co director



---

Dr. Enrique De la Re Vega  
Secretario



---

Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta  
Sinodal interno



---

Dra. Luz Vázquez Moreno  
Sinodal externo

## **DEDICATORIA**

*A mi sobrino*

*A mi Familia, como siempre*

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo no sería posible sin la ayuda de diferentes personas e instituciones:

Al Conacyt, por la beca otorgada.

Al Posgrado en Biociencias, por permitirme ser parte de su comunidad.

A la Dra Irlanda Lagarda y Dra. Magdalena Ortega, por brindarme los recursos y herramientas necesarias para el proyecto, pero, sobre todo, por su invaluable apoyo y conocimiento.

Al Dr, Enrique De la Re y Dra. María Burboa, por su generosidad en la lectura y comentarios sobre la tesis.

A la Dra. Luz Vázquez, por facilitarme trabajar en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Proteínas y Glicanos, y por sus comentarios de la tesis.

A la M.C. Ana María Guzmán, por su ayuda durante la purificación de la lectina.

Al Dr. Amir Maldonado, por permitirme trabajar en el laboratorio de Biofísica Celular.

A la Dra. Erika Silva, por su ayuda en el laboratorio de Biofísica Médica para obtener las imágenes de microscopía confocal.

A la Dra. Adriana Soto y Dr. Juan Martínez, por su ayuda en la utilización del equipo de citometría de flujo en el laboratorio de Bioquímica Clínica, así como por su ánimo de colaborar.

## RESUMEN

El cáncer es una enfermedad compleja en la cual las células de un tejido específico no responden a las señales que regulan la diferenciación celular, supervivencia, proliferación y muerte celular. Actualmente los tratamientos son poco específicos, por lo que resulta importante investigar estrategias más efectivas en el diagnóstico y tratamiento. Una alternativa podrían ser las lectinas, proteínas o glicoproteínas con capacidad de unión a carbohidratos. La unión de lectinas a líneas celulares de cáncer está en función del patrón de glicosilación de las células. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto antiproliferativo de la lectina de *Acacia constricta* (VL) sobre las líneas celulares MDA-MB-231 y T47D. En este trabajo se evaluó el reconocimiento de la lectina VL (marcada con fluoresceína) hacia los receptores de las células mediante microscopía confocal. La actividad antiproliferativa y la inducción de apoptosis de VL en las líneas celulares evaluadas se determinó mediante citometría de flujo. El incremento de especies reactivas de oxígeno se evaluó mediante citometría de flujo utilizando DA-DFCA (Diacetato de diclorofluoresceína). Como resultados, se observó que VL es capaz de reconocer receptores presentes en la superficie celular en ambas líneas celulares. Además, la lectina VL reduce la proliferación celular hasta un 50% en las líneas celulares MDA-MB-231 y T47D y se observaron cambios en la morfología de ambas líneas celulares. Por último se determinó que la lectina VL indujo apoptosis tanto en células MDA-MB-231 como en T47D independiente a la activación de especies reactivas de oxígeno. En conclusión, estos resultados muestran que la lectina VL puede ser considerada dentro de la clase de moléculas con potencial como agente antitumoral.



## ABSTRACT

Cancer is a complex disease where the cells of a specific tissue do not respond to the signals that regulate cell differentiation, survival, proliferation, and cell death. Currently, treatments are not very specific, thus it is important to investigate more effective strategies for diagnosis and treatment. Lectins are proteins or glycoproteins with carbohydrate-binding capacity. The binding of lectins to cancer cell lines depends upon the cell glycosylation patterns. The objective of this research was to evaluate the antiproliferative activity of *Acacia constricta* (VL) lectin on MDA-MB-231 and T47D cell lines. In this work, the recognition of VL lectin (fluorescein-labeled) towards cell receptors was evaluated by confocal microscopy. Antiproliferative activity and induction of apoptosis of VL in the evaluated lines were determined by flow cytometry. The increase of reactive oxygen species was evaluated by flow cytometry using DFCA-DA (Dichlorofluorescein diacetate). Confocal microscopy analysis demonstrated that VL can recognize receptors present on the cell surface in both cell lines. Furthermore, the VL lectin reduced cell proliferation by up to 50% in MDA-MB-231 and T47D cell lines, and changes in morphology of both cell lines were observed. Finally, it was determined that the VL lectin induced apoptosis in both MDA-MB-231 and T47D cells independent the activation of reactive oxygen species. In summary, these results show that the VL lectin can be considered within the class of molecules with potential as antitumor agent.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
APROBACIÓN .....	i
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
ÍNDICE GENERAL .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
INTRODUCCIÓN .....	1
I. ANTECEDENTES .....	3
I. 1. Generalidades de las lectinas de plantas .....	3
I. 1. 1. Principio de la interacción lectina-carbohidrato .....	5
I. 1. 2. Actividad biológica de lectinas de plantas .....	8
I. 2. Lectinas con actividad anticancerígena .....	11
I. 2. 1. Mecanismo de acción de lectinas sobre células cancerosas .....	11
I. 2. 2. Estudios de lectinas de plantas .....	14
I. 3. Lectinas leguminosas silvestres .....	19
I. 3. 1. Lectina de <i>Acacia constricta</i> (Vinorama) .....	19
II. JUSTIFICACIÓN .....	21
III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	21
IV. HIPÓTESIS .....	22
V. OBJETIVOS .....	23
V. 1. Objetivo general .....	23
V. 2. Objetivos específicos .....	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
VI. 1. Purificación de lectina .....	24
VI. 2. Cultivo de líneas celulares .....	25
VI. 3. Bioreconocimiento .....	25
VI. 4. Actividad antiproliferativa .....	26
VI. 5. Ensayo de inducción de apoptosis .....	26
VI. 6. Ensayo de especies reactivas de oxígeno .....	27
VI. 7. Análisis estadístico .....	27
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
VII. 1. Bioreconocimiento de la lectina VL .....	28
VII. 2. Cambios morfológicos inducidos por la lectina VL .....	30
VII. 3. Evaluación de la actividad antiproliferativa de VL por citometría de flujo .....	32
VII. 4. Inducción de apoptosis por VL en MDA-MB-231 y T47D .....	36
VII. 5. Evaluación de especies reactivas de oxígeno por la lectina VL .....	40

VIII. CONCLUSIÓN .....	44
IX. RECOMENDACIONES .....	45
X. LITERATURA CITADA .....	46

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Estructuras de N-glicanos que reconoce PHA-E	7
2	Esquematación del reconocimiento a receptores	12
3	Vinorama ( <i>A. constricta</i> )	20
4	Esquema general de trabajo	24
5	Bioreconocimiento de la lectina VL hacia células MDA-MB-231 y T47D tratadas con VL-FITC	29
6	Efecto de la lectina VL sobre la morfología de las células MDA-MB-231 y T47D	31
7	Células MDA-MB 231 expuestas a diferentes concentraciones de VL	33
8	Células T47D expuestas a diferentes concentraciones de VL	34
9	Ensayo de inducción de apoptosis en las células MDA-MB-231 tratadas con VL	37
10	Ensayo de inducción de apoptosis en las células T47D tratadas con VL	39
11	Acumulación relativa de ERO en MDA-MB-231	42
12	Acumulación relativa de ERO en T47D	43

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Especificidad de lectinas a carbohidratos simples y complejos	4
2	Actividad antineoplásica de algunas lectinas de plantas	10

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es considerado un conjunto de enfermedades relacionadas con el desarrollo de células anormales; se caracteriza por evadir las señales que regulan la diferenciación celular, supervivencia, proliferación y muerte celular. Es una de las principales causas de muerte a nivel mundial con alrededor de 8.8 millones de defunciones anuales. El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte en mujeres de entre 40-55 años (Ataollahi *et al*, 2015). Para 2015 se reportaron alrededor de 571,000 defunciones en el mundo (Sun *et al.*, 2017). En México, la Secretaria de Salud reporta una incidencia de 20,444 casos de cáncer de mama anuales. En la actualidad, las terapias del cáncer resultan poco específicas debido a que atacan por igual a células cancerosas como normales. Es por ello que resulta importante encontrar nuevas terapias menos invasivas.

Las lectinas pertenecen a un grupo de proteínas que reconocen específica y reversiblemente a carbohidratos, sean libres o que formen parte de estructuras más complejas. Comúnmente se habla de lectinas en plantas, sin embargo, se distribuyen en otros organismos como bacterias, hongos y animales. Algunas de estas proteínas presentan actividad antiproliferativa, antifúngica o antibacteriana, lo cual las ha convertido en proteínas de interés biotecnológico. Las lectinas se han utilizado en numerosas investigaciones como en el estudio de la estructura de las membranas, detección de transformaciones malignas, purificación de glicoconjugados, estudios citogenéticos, entre muchas otras (Sharon y Lis, 2004) Además, las lectinas de plantas pueden ser utilizadas para rastrear alteraciones en células o tejidos.

En general, todas las actividades biológicas descritas para las lectinas tienen en común el reconocimiento de un receptor oligosacárido, esto las coloca como un sistema modelo para el estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. Algunas lectinas poseen efectos inmunosupresores y otras también son tóxicas, dado que inhiben el crecimiento de células tumorales y participan en la adhesión celular (Sharon, 2002). Debido a la capacidad de las lectinas de modular procesos biológicos, se ha propuesto su investigación para utilizarse en el diagnóstico y terapia del cáncer.

En el cáncer, se ha reportado que el patrón de glicosilación de glicoproteínas en células tumorales esta alterado en contraste con células normales. Durante la diferenciación celular y la transformación maligna, la biosíntesis de las cadenas de oligosacáridos de glicoproteínas está frecuentemente alterada y esta alteración puede ser detectada por las lectinas. La unión de lectinas a líneas celulares de cáncer está en función del patrón de glicosilación de las células. Los mecanismos de acción a nivel molecular de estas proteínas en células tumorales son muy variados y dependen de diferentes factores (Pinho y Reis, 2015). En este sentido, el estudio de nuevas lectinas y su participación en diversos procesos biológicos contribuirá al conocimiento del estado actual de enfermedades como el cáncer. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el efecto antiproliferativo, en diversas líneas celulares, de la lectina VL, extraída de semillas de *Acacia constricta*; una leguminosa del Desierto de Sonora.

## I. ANTECEDENTES

### I. 1. Generalidades de las lectinas de plantas

Las lectinas se encuentran bien representadas en la naturaleza y se pueden encontrar en: bacterias, virus, hongos y plantas. En plantas, son sintetizadas durante el desarrollo de la semilla, germinación y crecimiento; se almacenan en hojas, tallos, raíces, flores y frutos. Estas proteínas se han identificado en más de 500 especies de plantas, por lo que no todas las especies contienen niveles detectables de lectinas. En varias investigaciones se ha reportado la amplia actividad biológica de las lectinas de plantas (Hernández *et al.*, 2005).

Las lectinas mayor estudiadas pertenecen a la familia de las leguminosas, estas exhiben hasta un 15% de proteína en sus semillas. Presentan una conformación proteica con una a cuatro subunidades idénticas o diferentes y con un peso molecular de entre 25-30 kDa. La mayoría de lectinas de leguminosas poseen un estado oligomérico de dímeros o tetrámeros (Srinivas *et al.*, 2011). La tetramerización de las lectinas está relacionada con la unión a carbohidratos complejos (Deacon *et al.*, 1997). Las lectinas de leguminosas presentan alta similitud en su cadena de aminoácidos como en su estructura secundaria y terciaria. Algunas lectinas presentan sitios de unión con diferente especificidad. Por ejemplo, *Phaseolus vulgaris* presenta dos sitios de unión con distinta especificidad a carbohidratos, cada una está relacionada a una función particular (Sharon y Lis, 2001).

Las lectinas pueden participar en diversas funciones como es el almacenamiento y transporte de hidratos de carbono en la semilla, unión de bacterias fijadoras de nitrógeno a la raíz y en la defensa contra hongos, insectos o depredadores herbívoros. También se ha reportado que participan en otros procesos biológicos como el reconocimiento célula-célula y la división celular. Así mismo, las lectinas se han utilizado como herramienta en el reconocimiento de receptores de membrana para el estudio de tumores (Karnachanatat, 2012). Algunos de los carbohidratos que pueden reconocer las lectinas son glucosa (Glc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), fucosa, algunos tipos de ácido siálico, entre otros. También pueden reconocer oligosacáridos presentes en glicoconjugados como son las glicoproteínas (Van Damme *et al.*, 2008).



Por otra parte, las lectinas pueden ser clasificadas con base en su especificidad a un tipo de carbohidrato (Tabla 1). Asimismo, se pueden clasificar de acuerdo al número de sitios de unión a carbohidratos (Hernández *et al.*, 2005). Por ejemplo, lectinas con solo un sitio de unión se clasifican como merolectinas, con dos o más sitios como hololectinas y para lectinas con uno o dos sitios de unión y otro dominio con actividad catalítica o biológica se clasifican como chimerolectinas. Mientras que las superlectinas presentan al menos dos sitios de unión con capacidad de unirse a diferentes carbohidratos (Figuroa *et al.*, 2017).

**Tabla 1.** Especificidad de lectinas leguminosas a carbohidratos simples y complejos.

ESPECIFICIDAD DE LECTINAS DE PLANTAS			
Monosacáridos	Lectina	Abreviatura	Referencia
$\alpha$ -D-manosa, $\alpha$ -D-glucosa	<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A	Iordache <i>et al.</i> , 2015
	<i>Lens culinaris</i>	LCA	Iordache <i>et al.</i> , 2015
	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	AHL	Estrada-Martínez <i>et al.</i> , 2017
D-manosa	<i>Cratylia mollis</i>	CML	Albores <i>et al.</i> , 2013
$\beta$ -galactosa	<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	Huaung <i>et al.</i> , 2014
$\beta$ -D-galactosa	<i>Ricinus communis</i>	RCA-I	Estrada-Martínez <i>et al.</i> , 2017
N-acetil- $\alpha$ -D-galactosamina	<i>Glycine max</i>	SBA	Estrada-Martínez <i>et al.</i> , 2017
	<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL	Estrada-Martínez <i>et al.</i> , 2017
$\alpha$ -D-fucosa	<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA	Iordache <i>et al.</i> , 2015
	<i>Ulex europeus</i>	UEA	Procopio <i>et al.</i> , 2017
N-acetil-glucosamina	<i>Triticum vulgare</i>	WGA	Lam <i>et al.</i> , 2011
	<i>Helix pomatia</i>	HPA	Castillo-Villanueva <i>et al.</i> , 2007
GalNAc	<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSL I	Iordache <i>et al.</i> , 2015
	<i>Bauhinia purpurea</i>	BPL	Iordache <i>et al.</i> , 2015
	<i>Crotalaria striata</i>	CSL	Lam <i>et al.</i> , 2011
	<i>Sophora japonica</i>	SJL	Estrada-Martínez <i>et al.</i> , 2017
Man/Glc	<i>Cratylia floribunda</i>	CFL	Estrada-Martínez <i>et al.</i> , 2017
	<i>Vicia faba</i>	VFA	Lam <i>et al.</i> , 2011
<b>Oligosacáridos</b>			
N-glicosídicos	<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A	Estrada-Martínez <i>et al.</i> , 2017
	<i>Lens culinaris</i>	LCA	Lam y Ng <i>et al.</i> , 2011
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHA	Estrada-Martínez <i>et al.</i> , 2017
	<i>Euonymus europaeus</i>	EEL	Chen <i>et al.</i> , 2006

### I. 1. 1. Principio de la interacción lectina-carbohidrato

Las lectinas presentan uno o varios sitios con capacidad de reconocer carbohidratos mediante uniones no covalentes: fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrogeno o interacciones electrostáticas; la unión puede darse en la posición terminal o intermedia del glicano. Los iones de calcio y magnesio en los sitios de reconocimiento pueden intervenir en la unión con el carbohidrato (Bellande *et al.*, 2017). Las lectinas de leguminosas se enlazan a carbohidratos mediante los aminoácidos asparagina, ácido aspártico, residuos aromáticos o leucina. Estos aminoácidos del sitio de unión a carbohidratos se encuentran altamente conservados en leguminosas, por lo que su especificidad puede estar relacionada a la orientación de los monosacáridos del sitio de unión (Abhilash *et al.*, 2013).

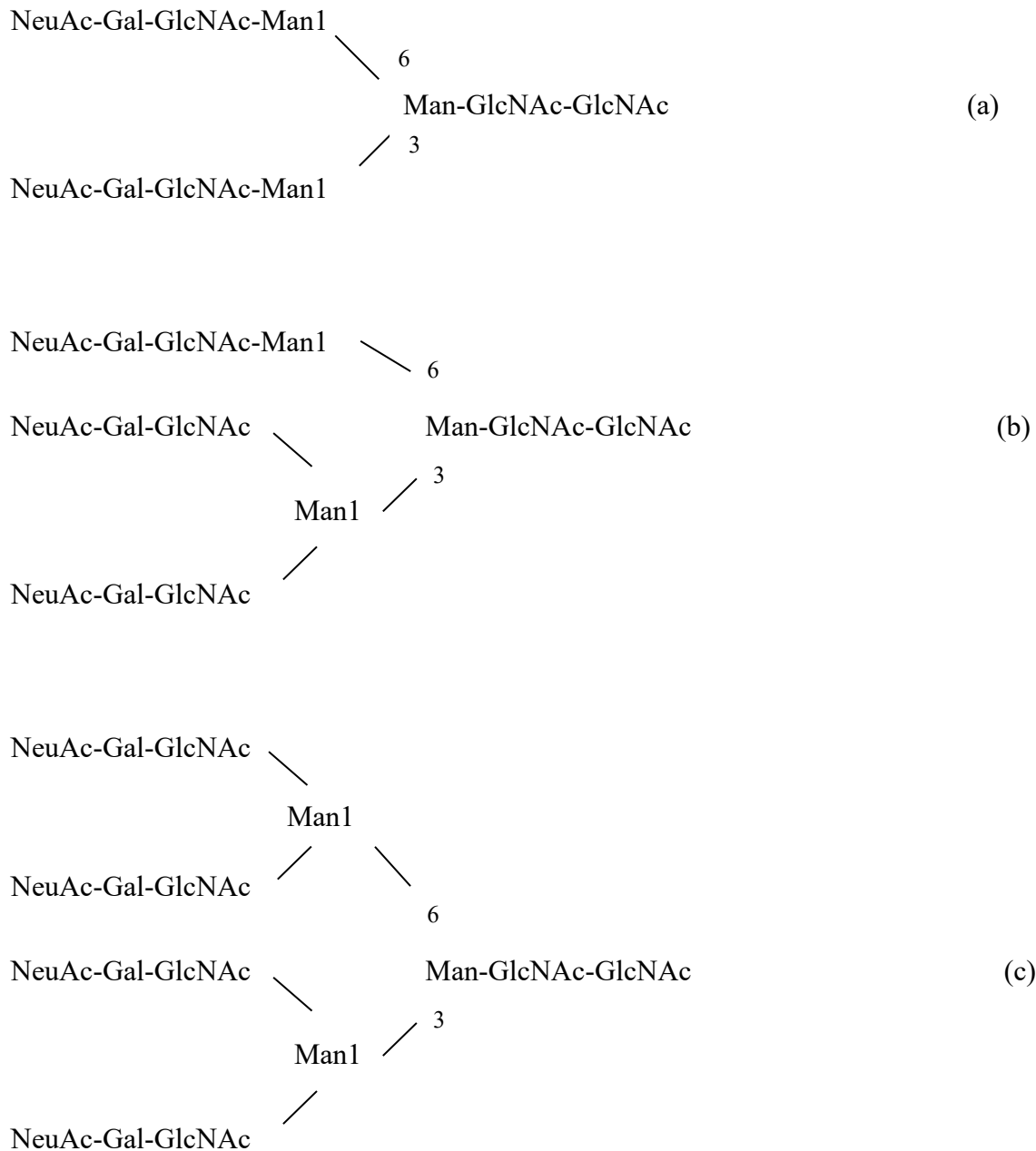
En mayor medida las lectinas se unen a monosacáridos u oligosacáridos, aunque también pueden unirse a carbohidratos más complejos o glicoproteínas. Los monosacáridos di, tri y tetra sacáridos son los carbohidratos simples que comúnmente reconocen. Por ejemplo, las lectinas específicas a manosa o glucosa como Con A (*Canavalia ensiformis*) y LCA (*Lens culinaris*) establecen puentes de hidrogeno mediante el oxígeno 1 de la asparagina con los hidroxilos de las posiciones 4 y 6 del monosacárido, mientras que el nitrógeno 2 forma un puente de hidrogeno con el hidroxilo en posición 4 del monosacárido. En la lectina de soya (SBN) y frijol (PNA), el oxígeno 1 de la asparagina forma puentes de hidrogeno con los hidroxilos de la posición 3 y 4 del monosacárido, y el nitrógeno 2 forma un puente de hidrogeno con el hidroxilo de la posición 3 del monosacárido (Kaneda *et al.*, 2002). Las estructuras más complejas que reconocen algunas lectinas son de tipo N-glicanos con residuos en la posición terminal de galactosa o ácido siálico. Esta especificidad a carbohidratos más complejos está relacionada a la función de defensa de lectinas de plantas contra depredadores (Hashim *et al.*, 2017)

En algunos casos, la distribución de los oligosacáridos determina el reconocimiento y especificidad de las lectinas. En la lectina de *Arachis hypogaea*, la presencia de oligosacáridos de manera continua no afecta el reconocimiento, mientras que en la lectina de *Amaranthus leucocarpus* los sitios de reconocimiento permiten la unión a oligosacáridos cuando los residuos del carbohidrato se alejan por cinco o seis aminoácidos. La lectina de *Marchantia polymorpha* presenta dos dominios de reconocimiento diferentes y con afinidad a Gal $\beta$ 1-3GalNAc y a N-

acetilglucosamina. La afinidad a Gal $\beta$ 1-3GalNAc también se ha reportado en las lectinas de *Amaranthus caudatus* (Sharon y Lis, 2004).

Por otro lado, la conformación espacial de los oligosacáridos es importante en la interacción con la lectina. Por ejemplo, las lectinas de LCA y WGA (*Triticum vulgare*) son más específicas a oligosacáridos unidos a glicopéptidos que a oligosacáridos liberados por acción enzimática o química de los glicopéptidos (Lis y Sharon, 1998). La lectina de *Ricinus communis* es afín a oligosacáridos en el cual el ácido siálico esté en la posición  $\alpha$  2,6 debido a que es más accesible al sitio de unión de la lectina (Green *et al.*, 1987).

La interacción de las lectinas con estructuras oligosacáridas es altamente específica. Por ejemplo, *Phaseolus vulgaris* presenta dos tipos de lectinas: PHA-E y PHA-L. Estas son muy similares en su composición de carbohidratos y aminoácidos, pero difieren en la especificidad a complejos tipo N-glicanos: PHA-E reconocen eritrocitos y PHA-L leucocitos. Las diferencias en la secuencia de los aminoácidos que intervienen en el sitio de unión al carbohidrato provoca cambios en la especificidad de PHA. En la Figura 1 se observan el carbohidrato que reconoce la lectina PHA-E y PHA-L (Kaneda *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Estructura de N-glicanos que reconoce PHA-E y PHA-L. PHA-E reconoce estructuras biantenarias (a) y PHA-L reconoce estructuras triantenarias (b) y tetrantenarias (c). (Cummings y Kornfeld, 1982).

### I. 1. 2. Actividad biológica de lectinas de plantas

Las funciones de las lectinas son muy diversas, van de la aglutinación de eritrocitos, estimulación mitogénica de linfocitos e inhibición de fagocitos, hasta actividad antimicrobiana, insecticida y anticancerígena. También participan en el reconocimiento y diferenciación celular, migración de linfocitos y metástasis, entre otras funciones (Casas-Corredor *et al.*, 2016).

La actividad aglutinante es una de las primeras evidencias de actividad biológica. El reconocimiento de las lectinas hacia los carbohidratos presentes en la membrana celular de eritrocitos o células, da lugar a la formación de una red entre los eritrocitos. Esta capacidad de aglutinar ocurre solo en lectinas con mínimo dos sitios de reconocimiento (Hernández-Díaz *et al.*, 1999). La gran mayoría de lectinas aglutina eritrocitos de los diferentes grupos sanguíneos, por lo que no son específicas de grupos. Sin embargo, las lectinas provenientes de *Phaseolus limensis* y *Vicia cracca* aglutinaron al tipo sanguíneo A pero no a los tipos B y O. Mientras que extractos de *Lotus tetragonolobus* solo aglutinaron sangre para el tipo sanguíneo O (Sharon y Lis, 2001).

Por otra parte, algunas lectinas de plantas tienen efectos nocivos en diferentes etapas de desarrollo de insectos; pueden aumentar la mortalidad, frenar el desarrollo y reducir la fecundidad. El mecanismo insecticida de las lectinas se basa en su interacción con receptores glicosilados en el intestino del insecto. La lectina PHA ha demostrado que provoca la destrucción y desorganización de las microvellosidades, así como la inflamación de las células epiteliales en el lumen del intestino de *Empoasca fabae*. También se ha reportado que las lectinas reducen la actividad de las enzimas  $\alpha$ -amilasas, importantes en la conversión de almidón a oligosacáridos para la obtención de energía, de manera que inhiben la absorción y digestión de los alimentos (Procopio *et al.*, 2017). Por ello, representan un alto potencial como agentes insecticidas naturales contra insectos plagas. (Peumans y Van Damme, 1995).

En bacterias, las lectinas pueden unirse a carbohidratos como ácido teicoico, peptidoglicanos y lipopolisacárido presentes en la pared celular y ejercer un efecto antibacterial. Por ejemplo, las lectinas de *Viciaeae tribe* interaccionan con estructuras de la pared celular de bacterias como ácido murámico (Oliveira-Días *et al.*, 2015). Las lectinas también pueden alterar la morfología de bacterias; la lectina de *Araucaria angustifolia* provoca poros en la pared celular

de bacterias Gram positivas y burbujas en Gram negativas (Santi-Gadelha *et al.*, 2012). La lectina de *Indigofera heterantha* mostró un efecto antibacterial importante sobre las especies *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Iordache *et al.*, 2015).

Las lectinas de *Astragalus mongholicus* y *Phaseolus coccineus* pueden inhibir el crecimiento de hongos. El modo de acción de las lectinas es mediante la unión a quitina y glicanos de la superficie en hongos. Esto afecta tanto el crecimiento y la germinación de esporas. La interacción lectina-hongo ha demostrado inducir la hinchazón de las hifas, vacuolización de la célula y aumento de lisis en la pared celular de las hifas (Ciopraga *et al.*, 1999). También pueden causar cambios morfológicos en hongos que los hacen más vulnerables a situaciones de estrés. Por ejemplo, la lectina de WGA se une a los oligosacáridos de quitina e inhibe el crecimiento de hifas y germinación de esporas (Peumans y Van Damme, 1998).

Por otro lado, la lectina de *Boodlea coacta* exhibió una potente actividad antiviral contra el virus VIH-1 (virus de la inmunodeficiencia adquirida) al reconocer los receptores de la envoltura viral. También la lectina de *Musa acuminata* ha mostrado inhibir la replicación del VIH. Además, se reportó que *B. coacta* hemaglutinó distintas cepas virales entre las que destaca el virus influenza H1N1. A pesar de estos esfuerzos, son necesarios más estudios de las lectinas para ser consideradas como un nuevo fármaco o tratamiento antiviral (Sharon, 2008).

En numerosas investigaciones se discute el potencial antitumoral y anticancerígeno de las lectinas de plantas (Tabla 2). En los siguientes apartados se abordará la actividad anticancerígena de lectinas y sus mecanismos de acción.

**Tabla 2.** Actividad antineoplásica de algunas lectinas de plantas.

<b>Planta</b>	<b>Lectina</b>	<b>Actividad <i>in vitro</i></b>	<b>Referencias</b>
<i>Abrus precatorius</i>	AGG	Inhibición de la síntesis de proteínas, inducción de apoptosis	Lam y Ng, 2011
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	Efecto antiproliferativo, apoptosis y autofagia.	Giacometti, 2015
<i>Astragalus membranaceus</i>	AML	Efecto antiproliferativo, inducción de apoptosis por caspasa	Giacometti, 2015
<i>Phaseolus acutifolius</i>	TBL	Efecto antiproliferativo, inducción de apoptosis	Castillo-Villanueva <i>et al.</i> , 2007
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHA	Efecto antiproliferativo, inducción de apoptosis por muerte de los receptores.	Estrada-Martínez <i>et al.</i> , 2017
<i>Pinellia ternate</i>	PTL	Efecto antiproliferativo, inducción de apoptosis	Yau <i>et al.</i> , 2015
<i>Triticum vulgaris</i>	WGA	Efecto antiproliferativo, inducción de apoptosis	Jiang <i>et al.</i> , 2015
<i>Viscum album</i>	ML	Efecto antiproliferativo e inducción de apoptosis.	Bussingr <i>et al.</i> , 1999

## **I. 2. Lectinas con actividad anticancerígena**

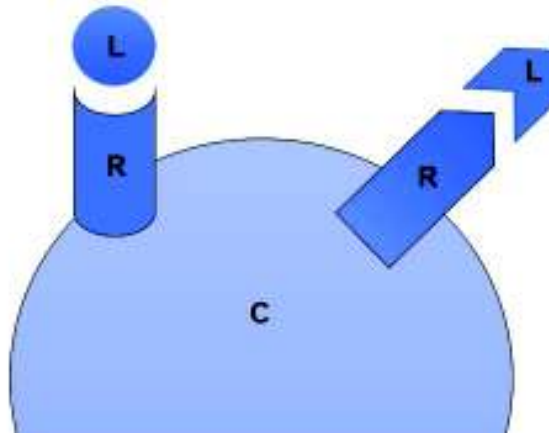
### **I. 2. 1. Mecanismo de acción de lectinas sobre células cancerosas**

Las células tienen la capacidad de reconocer a agentes externos mediante carbohidratos y proteínas. Los carbohidratos se encuentran en la membrana celular formando conjugados como son las glicoproteínas (Crocker, 2001; Berg *et al.*, 2002). Las lectinas pueden unirse a oligosacáridos de la membrana celular y enviar señales que provoquen cambios biológicos en la célula: mitosis, aglutinación, división celular o actividad mitogénica. Los oligosacáridos son estructuras complejas con alta flexibilidad conformacional que pueden ser reconocidas por receptores específicos. El proceso de reconocimiento de las lectinas y receptores es inmediato (Lockwood, 1996).

Los carbohidratos son responsables del reconocimiento de la célula por la lectina, mientras que otras unidades de carbohidratos presentes en la membrana participan en la transmisión del mensaje y en la activación de un segundo mensajero. El reconocimiento de la lectina al receptor en la membrana de la célula puede ocasionar cambios funcionales y morfológicos en la célula. Las lectinas son proteínas muy dinámicas dado que participan en el reconocimiento de células tumorales, adhesión, localización celular y transducción de señales. Esto hace importante evaluar el potencial de las lectinas como marcadores moleculares o fármacos en el cáncer. En la Figura 3 se esquematiza el mecanismo de reconocimiento de las lectinas a los receptores de membrana (Van Damme *et al.*, 1998).

En el cáncer, los carbohidratos de la superficie celular están alterados lo que favorece la progresión del tumor y alteración del reconocimiento normal. Esta alteración en los carbohidratos puede dar paso a la sobreexpresión de estructuras, pérdida de expresión, presencia de nuevas o incompletas estructuras de glicanos. Por otro lado, las diversas funciones biológicas de las lectinas están relacionadas a su capacidad de unirse a carbohidratos específicos (Giacometti, 2015). De ahí las diferentes respuestas de las lectinas en células cancerosas: efectos inmunosupresores, inhibición del crecimiento celular, apoptosis y metástasis. También pueden participar en la inhibición de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, así como en la actividad de las enzimas ADN y ARN polimerasa (Ferriz-Martinez *et al.*, 2010).





**Figura 2.** Esquematación del reconocimiento a receptores por las lectinas. Las lectinas (L) son específicas a ciertos receptores (R) de la superficie de la célula (C), lo cual está en función del tipo de carbohidrato del receptor. Fuente: Van Damme *et al* (1998), modificado por Acedo, 2020.

Por otra parte, se ha reportado algunos de los mecanismos de acción de las lectinas en células cancerosas. Un primer mecanismo es mediante la unión de las lectinas a moléculas de adhesión, las cuales participan en la regulación celular. La lectina también podría internalizarse en la célula y afectar la división celular. Estos provocan cambios moleculares y bioquímicos que conducen a la inducción de apoptosis e inhiben el crecimiento celular. Los factores que intervienen en el mecanismo de acción de las lectinas son origen celular, clase de tumor, concentración de lectina y especificidad de unión a carbohidrato (Castillo y Abdullaev, 2005).

La actividad mitogénica de las lectinas ha sido evaluada en líneas celulares de cáncer como leucemia Mo-T, Jurkat, L1210, M1, hepatocarcinoma y células de cáncer de mama. Algunas lectinas como PHA y Con A han mostrado una respuesta mitogénica en células de linfocitos. Ambas lectinas tienen actividad mitogénica selectiva sobre linfocitos T pero no en linfocitos B. Mientras que para las lectinas de lentejas se ha reportado una respuesta mitogénica tanto en linfocitos T como B. Por otro lado, la lectina de *A. precatorius* también se ha relacionado con la modulación del sistema inmune, debido a la activación de interleucinas, interferón gamma (IFN) y el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), como en la activación de linfocitos T y macrófagos (Ashraf y Khan, 2003; Lam y Ng, 2011).

Por otro lado, la actividad antiproliferativa de las lectinas vegetales se ha reportado en distintas líneas celulares de cáncer. Las lectinas como PHA, GSA, Con A, WGA y PNA inhibieron el crecimiento de tres líneas celulares de cáncer colorrectal humano (LoVo, HCT-15 y SW837); todas las lectinas presentaron un alto potencial citotóxico en altas concentraciones y a un mayor tiempo de exposición. Las lectinas que mayor inhibieron el crecimiento de las líneas celulares fueron Con A y WGA (Kiss *et al.*, 1997). Estudios *in vivo* con la lectina PNA contra ratones con linfoma de Dalton reportan la reducción de la proliferación celular y activación de la apoptosis y autofagia (Cochran *et al.*, 1999).

Las lectinas también pueden desencadenar la activación de la apoptosis en líneas celulares de cáncer, de manera que las células con daños irreversibles sean eliminadas. La apoptosis en las células puede evaluarse por la fragmentación del ADN, pérdida del potencial de membrana en mitocondrias, contracción de la célula, condensación del núcleo y desprendimiento celular. Esto se determina mediante citometría de flujo. La apoptosis puede activarse a través de diferentes vías; por las caspasas u otras proteínas involucradas, por la regulación positiva o negativa de genes relacionados con la supresión o inducción de la apoptosis; o por los receptores de muerte celular, los cuales pueden ser reconocidos por lectinas. El receptor FAS es una proteína de apoptosis que interacciona comúnmente con estas proteínas. Varias lectinas de plantas que se internalizaron en las células provocaron una disminución del potencial de membrana mitocondrial y la liberación del citocromo c, el cual participa en la activación de la apoptosis. Durante la apoptosis se pueden activar diferentes tipos de caspasas, generalmente se estudia a las caspasas-3 debido al rol central que tiene en la apoptosis (Ashraf y Khan, 2003; Estrada-Martínez *et al.*, 2017).

La apoptosis no siempre ocurre en todas las células expuestas a lectinas. La autofagia es otro mecanismo que pueden inducir las lectinas en el cual ocurre la descomposición de componentes citoplasmáticos como proteínas u orgánulos por los lisosomas. Este mecanismo elimina células dañadas o infectadas que perturban la homeostasis del sistema inmunitario. Mediante esto se puede inducir la muerte celular apoptótica o independiente de las caspasas. Por ejemplo, p53 es una proteína supresora de tumores importante en la quimioterapia que al ser alterada interviene en el crecimiento descontrolado de las células cancerosas (Jiang *et al.*, 2015) Por lo tanto, las vías de inducción de autofagia son muy diversas y dependen del tipo de lectina.

## I. 2. 2. Estudios de lectinas de plantas

Diversos estudios con lectinas de plantas han reportado un efecto anticancerígeno o antitumoral en diferentes modelos biológicos. En cada reporte se discuten los mecanismos de acción de las lectinas, mismos que se describen en los siguientes párrafos.

La lectina Con A ha demostrado que induce la apoptosis en la línea celular de monocitos PU5-1.8. Esto ocurre por la agrupación de las mitocondrias y la liberación del citocromo c. También se ha evaluado el efecto sobre células de melanoma (A375), en las cuales la lectina indujo la apoptosis dependiente a la vía de las caspasas. Las lectinas Con A y Con Br provocan la fragmentación del ADN internucleosomal y alteran el potencial transmembrana de la mitocondria de células leucémicas. Ambas lectinas inducen la apoptosis y aumentan las especies reactivas de oxígeno (ERO) en células leucémicas. En células de hepatocarcinoma la lectina Con A fue altamente citotóxica. Esto se debió a la unión con manosas de glicoproteínas de membrana, seguido de la internalización y acumulación en las mitocondrias. Lo anterior activa la autofagia, que ocasiona la degradación de mitocondrias afectadas y muerte celular (Chen *et al.*, 2009).

En otros estudios con Con A han reportado la inducción de autofagia en células de hepatocarcinoma por la vía BNIP3 (factor inductor de muerte celular). Este factor provoca la disminución del potencial de membrana y promueve la internalización de Con A, que desencadena la autofagia. Por otra parte, en estudios con hámsters se reportó que esta lectina inhibía el crecimiento tumoral. En ratones normales en los que se administró de manera intraperitoneal las lectinas Con A, Con B y DGL (*Dioclea grandiflora*) hubo un aumento de las células mononucleares y polimorfonucleares, importantes en el sistema inmune (Zheng *et al.*, 2014).

Las líneas celulares de cáncer pancreático, BxPC, MIA, Panc-1, CFPAC, ASPC, HS-766T, HTB-147, CaPan-1 y CaPan-2 fueron expuestas con lectinas como Con A, WGA y PHA-L. Se determinó que las células expuestas con la lectina WGA mostraron un efecto antiproliferativo dependiente de la concentración. Esta lectina se unió a los residuos de ácido siálico en las glicoproteínas de membrana, lo que ocasionó la condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo y liberación del ADN. La lectina WGA también inhibió la

proliferación de células de tumor pancreático de rata (AR42J). En otros reportes *in vivo* se encontró inhibición del cáncer de colon en ratas (F-344) (Estrada-Martínez *et al.*, 2017). En líneas de cáncer de células de ratones (WEHI-279, J774, P388D1 y A-20) expuestas con otra lectina, *Sauromatum venosum* (SVL) se inhibió su proliferación. También resultó en un efecto antiproliferativo las líneas celulares cancerosas T47D, SiHa, SW-620, HT-29, HEP-2, OVCAR-5 y PC-3 expuestas a la lectina SVL (Lam y Ng, 2011).

La lectina de *Sophora flavescens* (SFL) ha demostrado activar la ruta de las caspasas en diferentes líneas celulares de cáncer. Lo mismo ocurre para la lectina *Phaseolus coccineus*, la cual activó la apoptosis mediante la vía de las caspasas en las células de fibrosarcoma (L929). Además, se reportó que esta lectina reconoce al ácido sálico presente en la membrana de las células (Chen *et al.*, 2009). Esta unión inhibió la actividad del ácido siálico y se relacionó con la activación de la apoptosis. La unión a ácido siálico y manosa de células cancerosas se da también con la lectina de *Polygonatum cyrtonema* (PCL), que ha reportado un efecto apoptótico en las líneas celulares HeLa, MCF-7, A375 y L929. La inducción de apoptosis en estas células puede ocurrir por la vía ERO-p38-p53 mediadas por la mitocondria. Esta lectina (PCL) induce la autofagia por las vías antes mencionadas en contribución con la inhibición de las vías de señalización celular Ras-Raf y PI3K-Akt (Giacometti, 2015).

Otros estudios con la lectina SFL mostraron un aumento en la expresión de p53, proteína supresora de tumores, y p21, proteína relacionada a la regulación del ciclo celular en las células MCF-7. También se reporta que esta lectina regula las fases G2/M del ciclo celular por la regulación positiva de p21 y la regulación negativa de CDK1 y CDK2, proteínas encargadas de regular el ciclo celular. Para la lectina Con A, el mecanismo de inducción de apoptosis en MCF-7 fue mediante la vía NF-kB, aumento en la expresión de p53 y disminución de la expresión de ERK y JNK. Tanto la lectina SFL como Con A mostraron citotoxicidad en MCF-7 pero no en células normales como MCF-10 (Zheng *et al.*, 2014).

Estudios con la lectina de *Phaseolus acutifolius* (TBLF) en ratones con cáncer de colon inducido por dimetilhidrazina, mostraron inhibición temprana de la tumorigénesis mediante la vía apoptótica. Mientras que en estudios *in vitro* la lectina TBLF mostró un efecto antiproliferativo dependiente de la dosis en células de cáncer de mama, cuello uterino (C33-A) y colon de humano (Sw480) (Castillo-Villanueva *et al.*, 2007). Por otra parte, las células de

cáncer gástrico humano (AGS) fueron incubadas durante 24 h con la lectina de *Urtica dioica*. Esta inhibió el crecimiento celular y estimuló la inducción de apoptosis (Lam y Ng, 2011).

Para la lectina de *Vicia faba* (VFA) se reportó que al incubarse en líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal (LS174T, SW1222 y HT29) se inhibió la proliferación celular de manera dosis/dependiente, además que mostraron agregación celular y diferenciación morfológica. La lectina de *Glycine max* mostró una disminución en la proliferación de la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) y hepatoma (HepG2). También se reportó que la lectina del frijol morado inhibe la proliferación de las células HepG2 mediante la activación de cuerpos apoptóticos (Jordinson *et al.*, 1999).

La lectina de *Ricinus communis* (RCL) que fue incubada con células HeLa reportó que desencadenó la apoptosis por la generación de ERO y activación de las caspasas-3. En las células de hepatocarcinoma (BEL7404) la apoptosis por la lectina RCL fue mediada también por la activación de las caspasas. Mientras que las lectinas de *Benincasa hispida* (BhL) y *Datura innoxia* (DiL9) provocaron un efecto antiproliferativo y apoptótico en cáncer pancreático humano (PANC-1) por la despolarización de la membrana mitocondrial (Yau *et al.*, 2015).

La lectina de *Bauhinia forficata* (BFL) mostró un efecto citotóxico selectivo e inhibición de la adhesión celular en la línea celular MCF-7. Mientras que la lectina de frijol verde desencadenó la activación de apoptosis en las células MCF-7. Por su parte, la lectina de *Bauhinia variegata* ha mostrado inhibir la proliferación de las células HepG2 y MCF-7. Para la lectina de *Galanthus nivalis* el efecto antiproliferativo y apoptótico en células cancerosas se ha asociado con la muerte de los receptores y la vía mitocondrial, así como con la activación de TNF $\alpha$  (Hashim *et al.*, 2017).

En la lectina de *Prosopis juliflora* (PJL) se observó un efecto antiproliferativo sobre células HeLa pero no sobre células normales (González de Mejía *et al.*, 2002). Mismo efecto se encontró al exponer a las células de cáncer humano HT29, SiHa y HeLa a la lectina de *Arisaema tortuosum* (ATL). La inhibición de la proliferación celular y de la síntesis de ADN se reportó también en las células de glioma C6, expuestas a la lectina de *Datura stramonium* (DSL) (Sasaki *et al.*, 2002).

La lectina de *Glycine max* (SBA) produce especies reactivas de oxígeno, así como la inducción de apoptosis, autofagia y daño del ADN en células HeLa. También se ha reportado inhibición de las células de linfoma ascítico y estimulación del sistema inmune, y efecto antiproliferativo en las células MCF-7 y HepG2 (Yau *et al.*, 2015).

La lectina de *P. sativum* (PSL) presentó un efecto anticancerígeno sobre células de Ehrlich debido a la inhibición del ciclo celular en la fase G2/M y en la expresión de genes relacionados a la apoptosis (Bcl-2, Bcl-X y Bax). Esta lectina también provocó la activación de la apoptosis en células HepG2 mediante la regulación positiva de p53. En la línea celular A375 se observó autofagia por la vía ROS-p38-p53 mediada por la mitocondria al ser expuestas con la lectina *Polygonatum cyrtonema* (PCL) (Chrispeels y Raikhel, 1991)

La interacción de la lectina con los carbohidratos puede ser no suficiente para inducir a apoptosis. En un estudio con la lectina de *Griffonia simplicifolia* (GSIB4) sobre las células de melanoma (BL6-8) reportaron que al realizar la transfección del gen de galactosiltransferasa y  $\alpha$ -galactosil, que interactúan con la lectina GSIB4, no se indujo a apoptosis en esta línea celular. Se encontró que la apoptosis en las células BL6-8 se da por la interacción de la lectina al receptor de la célula; internalización en la célula por endocitosis y otras vías que conducen a apoptosis (Chen *et al.*, 1994)

En estudios *in vivo* con la lectina de *Cratylia mollis* (CML) se reportó que al encapsular la lectina se evitó daño en tejidos como hígado y riñones, y obtuvieron mejores resultados de la actividad antitumoral en ratones inoculados con sarcoma 180 (Andrade *et al.*, 2004). También se han realizado nanopartículas de las lectina de *Bauhinia monandra* (BmoLL) y *Lens culinaris* (LCL) como una manera controlada de suministrar en pacientes con cáncer (Chan *et al.*, 2015). Esto podría ser a futuro un nuevo fármaco dirigido y menos agresivo que las terapias actuales.

Las lectinas de muérdago (ML) han sido ampliamente estudiadas por su potente efecto anticancerígeno. Un estudio con esta lectina reportó la activación de TNF, IL-1 e IL-6 que pueden activar a la caspasa-8 e inducir la apoptosis, debido a que la lectina inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas en células malignas. Mientras que en células normales no ocurre esta respuesta, lo que se relaciona con un efecto diferencial en el reconocimiento de la lectina. Estos resultados sugieren la activación del sistema inmune del organismo (Bussing *et al.*, 1999).

También se ha evaluado su efecto en mamíferos pequeños como ratones. En estos han observado que el tratamiento con la lectina ML ha provocado la disminución en el tamaño y crecimiento del tumor. Esta lectina mostró una potente actividad antitumoral con una regresión parcial y remisión total del tumor en ratones con cáncer de páncreas (Ernst *et al.*, 2003)

La lectina de muérdago de corea (*Viscum album coloratum*) (KML) ha mostrado un efecto antitumoral sobre líneas celulares de melanoma, carcinoma de colon y linfoma. En estudios *in vivo* con mamíferos pequeños con metástasis pulmonar, la lectina KML provocó una mayor actividad de macrófagos sobre las células cancerígenas y la activación de las células NK. Para la lectina de muérdago europeo (ML), la incubación *in vitro* e *in vivo* provoca la activación de macrófagos que secretan TNF $\alpha$ , el cual interviene en la disminución del crecimiento tumoral y prevención de la metástasis. Lo anterior sugiere que las lectinas pueden modular el sistema inmune para mejorar la respuesta de defensa del sistema ante las células cancerosas (Lyu *et al.*, 2002).

En un estudio comparativo entre la lectina de muérdago KML y ML encontraron una mayor actividad citotóxica de la lectina KML en diferentes células cancerosas, en contraste con la lectina de muérdago europeo. Reportaron que la lectina KML indujo apoptosis, lo que provocó cambios morfológicos del núcleo y fragmentación del ADN. También se reportó una potente citotoxicidad en la línea celular de leucemia L1210. Ambas lectinas presentaron una actividad citotóxica contra la línea celular Molt-1 (leucemia linfoblástica de células T). Otro estudio con la lectina KML en metástasis de células tumorales (melanoma B16-BL6, carcinoma de colon 26-M3.1 y linfoma 5178Y-ML25) en ratones, reportaron que mostró una actividad moduladora del sistema inmune, de manera que se favoreció el sistema de defensa. El efecto terapéutico contra las células metastásicas se relacionó con las células NK y macrófagos. Por otro lado, la lectina extraída del muérdago chino tuvo efectos importantes en la citotoxicidad, apoptosis y producción de citocinas en células T gamma delta de humanos (Ashraf y Khan, 2003).

### **I. 3. Lectinas leguminosas silvestres**

La familia de leguminosas tiene gran presencia e importancia en el Desierto de Sonora, comprende cerca de 730 géneros de planta y 19,400 especies. Estas se distribuyen desde climas templados, tropicales áridos y semiáridos, son plantas herbáceas, arbustivas y arbóreas. Las flores son vistosas y están adaptadas a la polinización por insectos (Sánchez-Escalante, 2007). Las semillas presentan testa gruesa y dos cotiledones; son una fuente de proteínas, carbohidratos y lípidos (Olvera-Luna *et al.*, 2012).

En plantas de leguminosas se han purificado de la semilla distintas lectinas para estudiar su efecto insecticida. Por ejemplo, Con A y PSA han mostrado inhibir la supervivencia y desarrollo de las larvas del escarabajo *Meligethes aeneus*. Asimismo, la lectina PF2 inhibe el desarrollo larval del gorgojo *Zabrotes subfasciatus* que ataca al frijol común.

Por otra parte, las lectinas secuenciadas de haba, lentejas, frijol común y guisante han mostrado alta homología en su secuencia de aminoácidos. La homología de la secuencia primaria de la región N-terminal ha mostrado relaciones taxonómicas entre las plantas de la familia. Esto indica que las lectinas de leguminosas se han conservado durante la evolución (Rudiger y Gabius, 2001).

En la actualidad, la investigación sobre las lectinas de leguminosas del Desierto de Sonora se ha concentrado en la purificación y caracterización de los géneros *Parkinsonia*, *Acacia*, *Prosopis* y *Olneya*. Estas presentan monómeros 30 o 66 kDa y pueden formar dímeros o tetrameros. Las leguminosas tienen un alto contenido de aceite y proteína en sus semillas (Ortega-Nieblas, 1993). Por tanto, es necesario evaluar la actividad biológica de estas lectinas sobre diferentes modelos biológicos.

#### **I. 3. 1. Lectina de *Acacia constricta* (Vinorama)**

La planta de Vinorama es un arbusto que puede crecer hasta 4 m. Presenta hojas pequeñas de tipo pinnadas y flores amarillas en pequeñas esferas de alrededor 1 cm de diámetro. Los tallos varían de color gris a café oscuro. El fruto es en forma de vaina lineal curvada fuertemente contraída entre semillas. Las vainas son largas y delgadas de hasta 12 cm y de 3-6 mm de ancho. La especie se distribuye desde el sur de Arizona, Nuevo México y al oeste de Texas. En México,



crece desde el norte del país hasta el sur de Oaxaca. Florece a finales de la primavera y en julio-octubre. La floración requiere de una cantidad mínima de agua seguida por periodos de calor (Seigler y Ebinger, 2005).

Estudios previos han reportado la purificación de una lectina y tres isolectinas de las semillas de *A. constricta*. La lectina VL es tetrámerica con un peso molecular de 34 kDa por subunidad. Las isolectinas VL2-VL4 son tetrámericas, cada subunidad con un peso molecular de 34 kDa. No obstante, cada una presenta un diferente punto isoeléctrico e interacción a carbohidratos. La secuencia primaria de VL es altamente homóloga con PHA y con otras lectinas leguminosas. Todas las lectinas de *A. constricta* reconocen carbohidratos complejos presentes en fetuina (Guzmán-Partida *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Vinorama (*A. constricta*). Fuente: Velazco Macías C. G. /CONABIO

## **II. JUSTIFICACIÓN**

La interacción de lectinas con células cancerígenas se da por el reconocimiento específico a glicoconjugados presentes en la membrana celular. Las lectinas son proteínas que tienen un gran potencial de aplicaciones biomédicas o industriales. Se ha reportado que algunas lectinas tienen actividad antiproliferativa sobre células tumorales. Sobre la lectina VL de *A. constricta* se ha reportado la purificación y caracterización de la proteína. No obstante, estudios sobre su actividad biológica sobre células cancerígenas no se han abordado. Por lo tanto, evaluar la actividad antiproliferativa de la lectina VL aportará información sobre su uso potencial en el desarrollo de nuevas terapias para el cáncer.

## **III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué efecto tiene la lectina VL sobre las células MDA-MB-231 y T47D?

#### **IV. HIPÓTESIS**

La lectina VL reconoce a carbohidratos presentes en las células cancerosas, lo que produce un efecto antiproliferativo debido a la activación de mecanismos moleculares.

## **V. OBJETIVOS**

### **V. 1. Objetivo general**

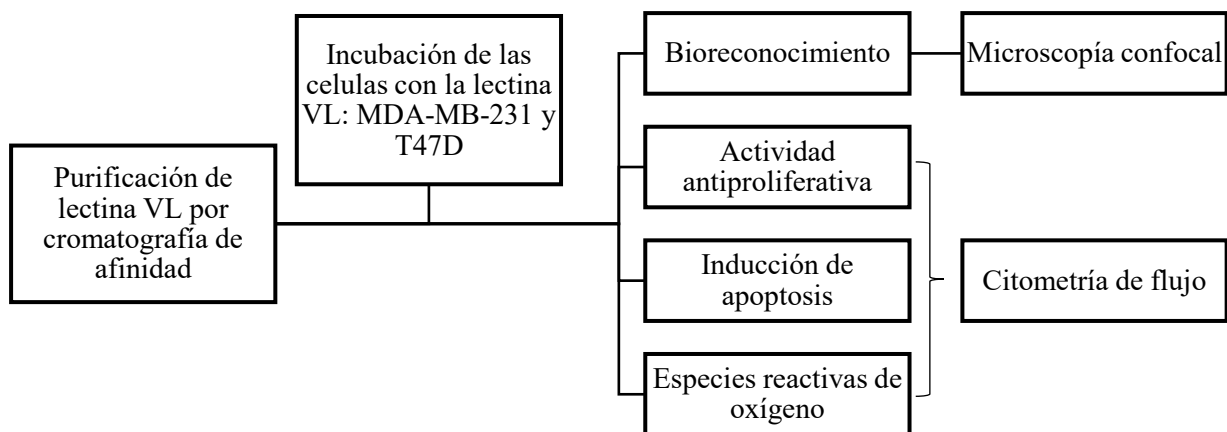
Evaluar el efecto antiproliferativo de la lectina VL sobre líneas celulares de cáncer de mama.

### **V. 2. Objetivos específicos**

- Evaluar el reconocimiento de la lectina hacia las células cancerígenas MDA-MB-231 y T47D.
- Evaluar el efecto antiproliferativo de las lectinas VL sobre las células.
- Evaluar la inducción de apoptosis y necrosis.
- Evaluar el incremento de especies reactivas de oxígeno.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Los objetivos de esta investigación se abordarán de acuerdo al siguiente esquema de trabajo:



**Figura 4.** Esquema general de trabajo.

### VI. 1. Purificación de lectina

La purificación de la lectina se realizó de acuerdo a lo establecido en Guzmán-Partida et al (2004). Se recolectaron semillas de *A. constricta* ubicadas al este de Hermosillo, Sonora en las coordenadas 27°30'42'' N 102°50'36'' O. Las semillas fueron trituradas y desgrasadas con hexano en el laboratorio de Fitoquímica del DICTUS y finalmente fueron pulverizadas hasta obtener una harina.

Para la extracción de proteínas de la harina de Vinorama se utilizó solución salina al 0.9% (1:10 p/v) en presencia de 0.2 mM de PMSF con agitación constante durante 24 horas a 4°C. A la postre, el extracto crudo se centrifugó a 4000 x g por 20 minutos y se clarificó por filtración con fibra de vidrio. El extracto crudo se inyectó a una columna cromatográfica de mini-leak-fetuína acoplada a agarosa. Las fracciones de proteínas que no se unieron a la columna se obtuvieron con búfer de PBS ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  20 Mm, 0.9 % NaCl y 0.02%  $\text{NaN}_3$ , pH 7.2). Las proteínas retenidas fueron eluidas con glicina-HCl (0.02 M, pH 2.5) y neutralizadas con Trizma base 1 M pH 8. Las fracciones se dializaron contra agua a 4°C; fueron liofilizadas y almacenadas a -10°C hasta su uso. La concentración de proteína se determinó por Lowry y el grado de pureza de la lectina VL fue evaluado mediante electroforesis en condiciones reductoras y desnaturalizantes (SDS-PAGE).

## **VI. 2. Cultivo de líneas celulares**

Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y T47D se obtuvieron del laboratorio de Biofísica Celular del Departamento de Física. Las células T47D mantienen los receptores hormonales (estrógeno y progesterona) y las células MDA-MB-231 son triple negativo. Las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% (v/v) y penicilina–estreptomina al 1% (v/v), e incubadas en un ambiente húmedo (37°C/5%  $\text{CO}_2$ ). Las células se dividieron 3 veces por semana y la densidad celular no superó las 1 000 000 células/mL (Gautam *et al.*, 2018).

## **VI. 3. Bioreconocimiento**

Las líneas celulares MDA-MB-231 y T47D fueron sembradas en microplacas de 96 pozos a una densidad de 10,000 células/pozo e incubadas por 24 h. Después, se retiró el medio de cultivo y las células se incubaron con metanol absoluto por 1 h a -20°C. Seguido a esto, se realizaron una serie de lavados con PBS con albúmina (PBSA/1%) para bloquear interacciones inespecíficas. Después, se adicionó la lectina VL marcada con fluoresceína (VL-FITC/5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubó durante 1 h. Posteriormente, se realizaron una serie de lavados con PBSA para eliminar el

excedente de VL-FITC. Las células fueron visualizadas en un microscopio confocal marca Nikon Ti Eclipse C2+ Japón, con láseres de 488 nm y con aumento 20X (Pedrosa-Santana *et al.*, 2018).

#### **VI. 4. Actividad antiproliferativa**

Las células MDA-MB-231 y T47D mantenidas en medio DMEM al 5% de SFB (suero fetal bovino) se sembraron en una placa de 24 pozos a una densidad de 150,000 células/pozo y se incubaron por 3 h. Posteriormente, se retiró el medio y se añadió la lectina VL preparada con medio DMEM al 1% de SFB en concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL y se incubó por 3 h. La actividad antiproliferativa se determinó usando el kit de Anexina V mediante citometría de flujo (BD FACSVerser) (Gondim *et al.*, 2017). Las comparaciones se hicieron mediante la prueba Tukey-Kramer,  $p \leq 0.05$ .

#### **VI. 5. Ensayo de inducción de apoptosis**

El ensayo de apoptosis se realizó por citometría de flujo utilizando el kit de Anexina V (cat. 640914, BioLegend, USA). Para fines experimentales las células MDA-MB-231 y T47D fueron sembradas en placa de 24 pozos a una densidad de 150,000 células/pozo. Después, las células fueron incubadas por 3 h con la lectina VL con medio DMEM al 1% de SFB con diferentes concentraciones (25, 50 y 100 µg/mL); como control positivo se utilizó DMSO (Dimetilsulfóxido/1:10), que es una sustancia altamente citotóxica. Después, las células se retiraron de la placa utilizando tripsina y se realizaron dos lavados con PBS, entre cada lavado las células se centrifugaron a 1200 rpm por 7 min. Posteriormente, se resuspendieron en 300 µL de búfer de incubación y se añadió 2 µL de anexina V-FICT y 3 µL de PI; se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 min. Las muestras se analizaron por citometría de flujo. Se evaluaron 10,000 eventos por ensayo con el equipo BD FACSVerser y el software FACSuite v1 de BD Biosciences (CA, EE. UU.). La tinción de anexina V y yoduro de propidio (PI) se evaluó por FITC-A y PE-A, respectivamente. Los datos obtenidos fueron porcentajes de células teñidas para anexina V y PI (Gondim *et al.*, 2017).

## **VI. 6. Ensayo de especies reactivas de oxígeno**

La detección de especies reactivas de oxígeno (ERO) también se realizó por citometría de flujo. Las células MDA-MB-231 y T47D fueron cultivadas en medio DMEM al 5% por 24 h en una placa de 24 pozos. Después, se retiró el medio y se incubó con la lectina VL en concentraciones de 25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  en medio DMEM al 1% durante 3 h. Se utilizó un control negativo, sin lectina. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas y lavadas con PBS. Estas fueron teñidas con 2',7-diacetato de diclofluoreceína (DA-DFCA) por 15 min en oscuridad a 25°C. Finalmente se utilizó de nuevo el equipo BD FACSVerse y el software FACSuite v1 de BD Biosciences (CA, EE. UU.). Las células teñidas se evaluaron por el canal FITC-A. Los datos obtenidos fueron la intensidad media de fluorescencia (IMF) en el canal FITC-A. Para hacer comparaciones entre concentraciones y expresión control de ERO se graficó la acumulación relativa de ERO para cada tratamiento tomando como unidad al control basal. Las comparaciones se hicieron mediante la prueba de Tukey-Kramer,  $p \leq 0.05$  (Faheina-Martins *et al.*, 2012).

## **VI. 7. Análisis estadístico**

Los datos se expresaron con medias y error estándar. La comparación entre grupos se realizó mediante las pruebas de Tukey-Kramer y Mann-Whitney por el paquete estadístico Minitab.18 Statistical Software versión 18.1.0. Los valores se consideraron significativos cuando  $p \leq 0.05$ .



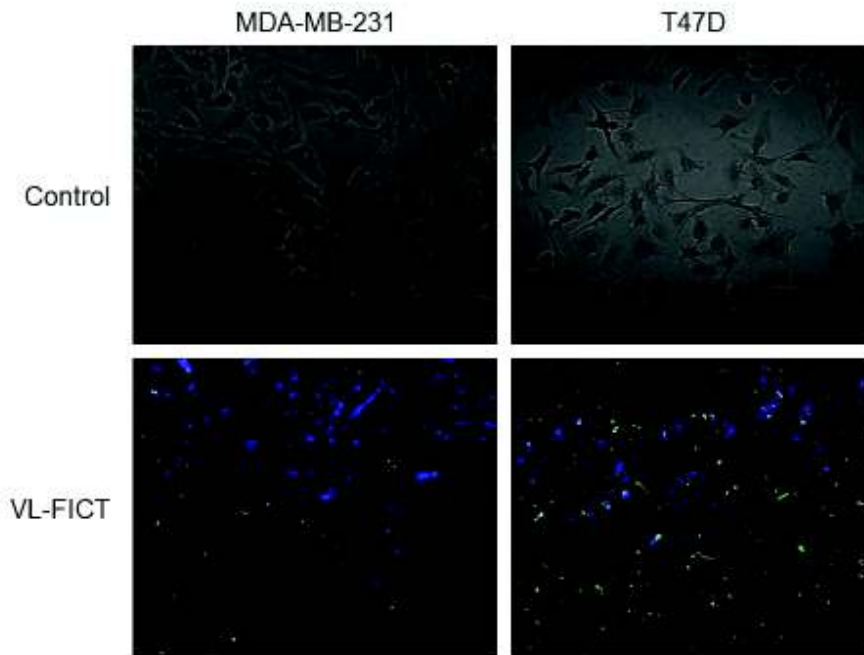
## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La lectina VL presentó bioreconocimiento y actividad antiproliferativa sobre las células MDA-MB-231 y T47D. Cabe mencionar que este trabajo es el primer reporte del efecto de VL sobre células cancerígenas.

### VII. 1. Bioreconocimiento de la lectina VL

Se ha reportado que las lectinas pueden interactuar con carbohidratos de la membrana celular o interiorizarse en la célula y asociarse en distintos compartimientos celulares. En este trabajo, la distribución de la lectina VL se estudió por microscopía confocal (Figura 5). Las células MDA-MB-231 y T47D mostraron señal de fluorescencia después del tratamiento con la lectina marcada; sin embargo, se observó una baja fluorescencia en ambos casos. El control no emitió fluorescencia. El núcleo fue teñido con DAPI. Estos resultados indican que el carbohidrato que reconoce VL se encuentra en baja proporción en las líneas celulares. Además, se sugiere que la distribución celular de VL ocurre en la superficie celular de MDA-MB-231 y T47D (Figura 5).

En relación con eso, la distribución de VL sugiere que su acción biológica podría ejercerse desde el exterior de la célula mediante la interacción con carbohidratos de la superficie celular. Por ejemplo, la lectina MAL-II interactuó con los carbohidratos de ácido siálico ( $\alpha$ -2,3 y  $\alpha$ -2,6) y fucosa ( $\alpha$ -1,6/ $\alpha$ -1,2) presentes en la membrana celular de TPC-1 (cáncer de tiroides); esto provocó la disminución en la viabilidad celular (Sancakli y Kaptan, 2019). Mientras que la lectina SFL se unió a manosas y ejerció la inducción de apoptosis y necrosis en células HeLa (Mehta *et al.*, 2013). No obstante, otros trabajos han reportado que las lectinas pueden asociarse en diferentes compartimientos celulares y ejercer su actividad biológica. Por lo tanto, se requiere de más estudios para comprender la distribución celular de VL y si esta puede relacionarse con su actividad antiproliferativa.



**Figura 5.** Bioreconocimiento de la lectina VL hacia células MDA-MB 231 y T47D tratadas con VL-FITC. Control negativo. La lectina VL se marcó con isotiocianato de fluoresceína (verde); el núcleo fue teñido con DAPI (azul). La lectina VL-FITC se distribuye en la superficie celular. Imágenes obtenidas por microscopía confocal. Aumento 20X.

En un estudio con células de cáncer de mama, la lectina HPA se unió a la membrana celular y citoplasma en las células MCF-7 y T47D, así como en la zona perinuclear en MCF-7. También se ha reportado que la lectina HPA se unió al aparato de Golgi en MCF-7 y T47D. Asimismo, HPA reconoció a proteínas con glicanos modificados de cáncer colorrectal (Saint-Guirons *et al.* 2007). La lectina WGA se ha encontrado en lisosomas y aparato de Golgi en células de próstata humano (Allen *et al.*, 1989). Por su parte, la lectina Con A se ha asociado a mitocondrias en hepatoma de células de ratones (Chang *et al.*, 2007). En atención a lo citado, la distribución de la lectina puede relacionarse al mecanismo de acción que se desencadena en células cancerosas. Por otro lado, las lectinas pueden ser útiles herramientas en el reconocimiento celular de los patrones de glicosilación en tumores benignos o malignos.

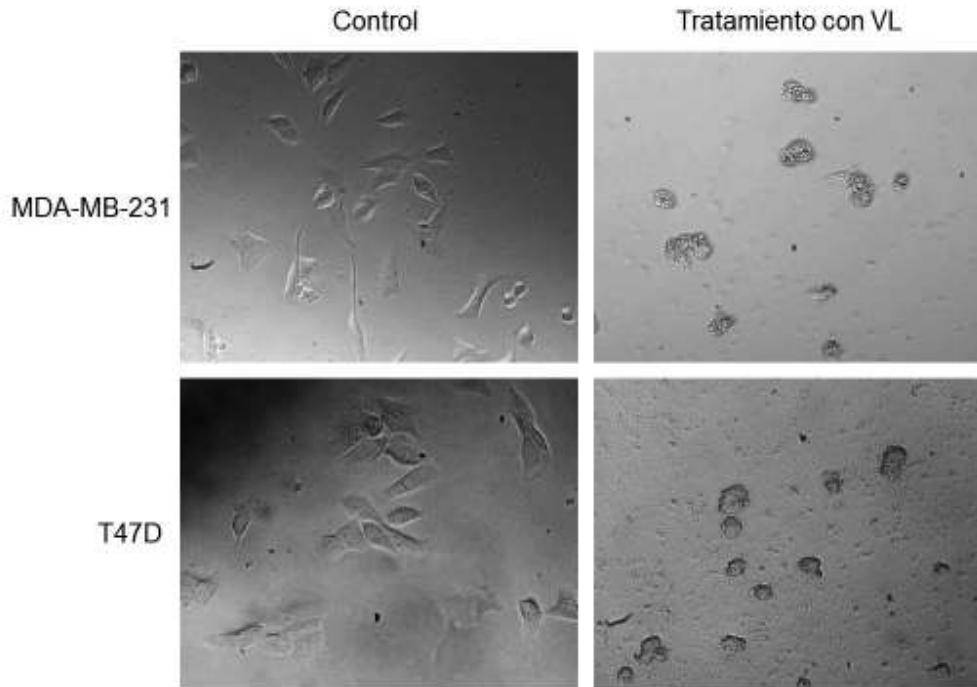
En la actualidad, las lectinas son consideradas biomarcadores para la investigación del desarrollo del cáncer. Mediante técnicas histoquímicas se ha encontrado que la lectina de VVA

y HPA son específicas a GalNaC y se han utilizado como marcadores pronósticos del cáncer de mama. También la lectina HPA, con especificidad al antígeno TF, se ha utilizado como marcador en el cáncer de mama (Brooks *et al.*, 2001; Kawaguchi *et al.*, 2006). Esta especificidad al antígeno TF evita resultados con falsos negativos. Por consiguiente, estas podrían utilizarse para explorar los cambios en los patrones de glicosilación en etapas tempranas del cáncer de mama, debido a que en estas etapas no es posible identificar bajo el microscopio anomalías morfológicas en las células. Así, el uso de lectinas podría contribuir a la detección temprana, diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama (Hashim *et al.*, 2017).

## **VII. 2. Cambios morfológicos inducidos por la lectina VL**

Las células cancerígenas MDA-MB-231 y T47D expuestas a diferentes tratamientos con la lectina VL presentaron cambios significativos en el número de células y en la morfología, que contrastan con el control sin lectina. En todos los tratamientos (25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ), las células perdieron su cualidad de adherencia y exhibieron cambios en su forma celular, pasaron de una forma alargada a una redonda y reducida de tamaño. Además, se observó una mayor cantidad de detrito celular en las células tratadas con VL (Figura 6). Estos cambios observados como el encogimiento celular y deformación de la membrana celular están relacionados a la activación de las vías apoptóticas (Van Cruchten y Van Den Broeck, 2002)

La concentración de la lectina VL influyó en la respuesta de las células cancerígenas. Las concentraciones de 25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  evidenciaron una cantidad significativa de detritos celulares (Figura 6). No obstante, la adherencia de las células se recuperó cuando se redujo la concentración de VL. De igual manera, los cambios morfológicos disminuyeron en dependencia a la concentración, lo que evidencia un efecto dosis dependiente por parte de la lectina sobre las células.



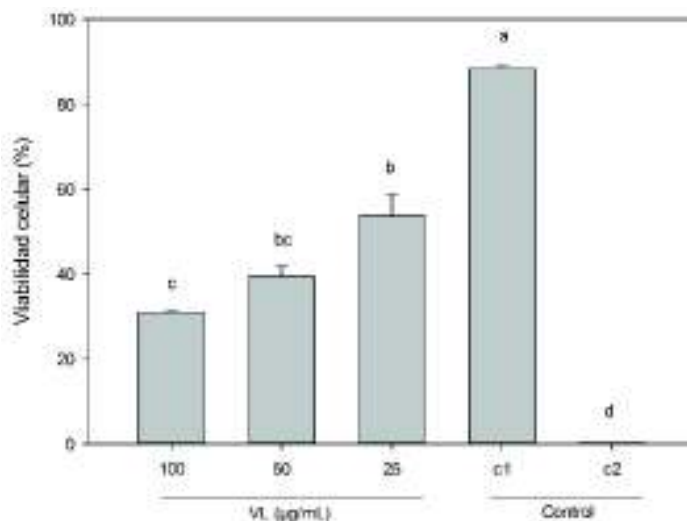
**Figura 6.** Efecto de la lectina VL sobre la morfología de las células MDA-MB-231 y T47D. Las células mostraron cambios en su forma celular y pérdida de la adherencia (VL/100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Control sin tratamiento con VL. Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica (20X).

### VII. 3. Evaluación de la actividad antiproliferativa de VL por citometría de flujo

Para determinar la actividad antiproliferativa de VL en las líneas celulares de cáncer de mama, se utilizó el parámetro de porcentaje de viabilidad celular obtenido en citometría de flujo. Después de 3 h de incubación con la lectina VL, se observó una disminución en la proliferación celular sobre MDA-MB-231 y T47D, incluso en las concentraciones más bajas (Figuras 7 y 8). En ambos casos se observó una disminución de más del 50% de la viabilidad celular, lo cual es indicativo de un efecto de VL sobre las líneas celulares de cáncer de mama. Esta disminución celular se relacionó con la activación de apoptosis en las células.

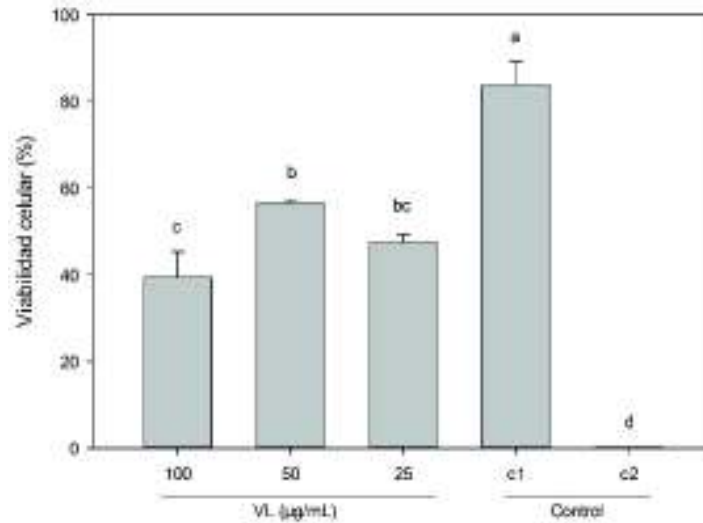
Es importante considerar que la actividad antiproliferativa es evaluada comúnmente mediante el ensayo colorimétrico de MTT o resazurina. En ambos ensayos, el compuesto MTT o resazurina es metabolizado en la mitocondria por las células con actividad metabólica, por lo que el resultado está relacionado con el número de células vivas. Si bien estas metodologías son ampliamente utilizadas para la evaluación de la proliferación celular, existen otras técnicas que aportan mejores resultados (Valadez-Vega *et al.*, 2014). La evaluación por citometría de flujo es un método más sensible; distingue entre células viables a células en alguna etapa de apoptosis o en necrosis. De manera que se evita cuantificar células en etapa apoptótica como células viables, debido a que estas se encuentran metabólicamente activas.

Los resultados de viabilidad celular para MDA-MB-231 están presentados en la Figura 7. Como controles, se utilizaron células sin tratamiento con lectina VL y células incubadas con DMSO. Las diferencias entre las concentraciones fueron evaluadas por la prueba Tukey-Kramer. El mayor efecto en la viabilidad celular se observó en la concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos. La concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mostró una viabilidad del 40%, sin diferencias estadísticas. En la menor concentración, la viabilidad celular fue del 55% y estadísticamente diferente a los otros tratamientos. Mientras que el control sin lectina presentó una viabilidad celular del 90% y el control con DMSO del 1%. Estos resultados sugieren que la lectina VL tiene un efecto diferencial dependiente de la concentración y que el comportamiento de dosis-respuesta fue gradual.



**Figura 7.** Células MDA-MB-231 expuestas a diferentes concentraciones de VL. Los resultados se expresan en comparación con el control negativo (c1) y control positivo con DMSO (c2). El porcentaje de viabilidad celular disminuyó hasta un 50% en los tratamientos de 100 y 50 µg/mL con la lectina VL. Diferencias estadísticas por la prueba de Tukey-Kramer,  $p \leq 0.05$

En T47D, el control sin tratamiento presentó una viabilidad celular del 90% y el control con DMSO del 1%. Las diferencias estadísticas se evaluaron por la prueba de Tukey-Kramer. El tratamiento de 100 µg/mL mostró una disminución celular de más del 50%, mientras que el tratamiento de 50 µg/mL el 57%; ambos tratamientos mostraron diferencias estadísticas. Para la concentración de 25 µg/mL, el porcentaje de viabilidad de celular fue del 47% y fue estadísticamente similar a los otros tratamientos. En este caso, el comportamiento dosis-respuesta no fue gradual, debido a que el porcentaje de viabilidad en la concentración de 50 µg/mL fue mayor que en 25 µg/mL (Figura 8).



**Figura 8.** Células T47D expuestas a diferentes concentraciones de VL. Los resultados se expresan en comparación con el control negativo (c1) y control positivo con DMSO (c2). Se observa una disminución de hasta el 50% en la viabilidad celular en los tratamientos (100 y 25 µg/mL) con la lectina VL. Diferencias estadísticas por la prueba de Tukey-Kramer,  $p \leq 0.05$ .

En otro orden de ideas, la respuesta de las células a la lectina VL está relacionada con el tipo celular, el carbohidrato que reconoce y la concentración de la lectina. Se ha reportado que las lectinas interactúan mejor con células tumorales que con células normales. Las células cancerosas sufren alteración de sus patrones de glicosilación, como suele ser una sobreexpresión de ácido siálico en la cadena de oligosacáridos (Milde *et al.*, 2014). En este trabajo, la viabilidad celular en los tratamientos con VL fue poco variable entre las dos líneas celulares; respuesta posiblemente relacionada con la especificidad a carbohidratos. Además, estos datos sugieren que VL interactuó con carbohidratos y ejerció un efecto antiproliferativo en ambas líneas celulares.

Las células MDA-MB-231 son triple negativo; sin expresión de receptores hormonales (estrógenos y progesterona), ni expresión del receptor HER2. Mientras que T47D solo expresa los receptores hormonales (Cailleau *et al.*, 1978). La lectina VL se unió a la superficie de ambas células, por lo que es importante evaluar la interacción de VL a las glicoproteínas de las líneas celulares de cáncer de mama; esto para determinar la importancia de los receptores en la activación de los mecanismos celulares relacionados con el efecto antiproliferativo.

En otros trabajos se ha reportado la especificidad a carbohidratos de la lectina de plantas y su efecto antiproliferativo. La lectina PCL (*Polygonatum cyrtonema*) presentó especificidad hacia el ácido siálico y ha reportado inhibición en la proliferación celular de fibrosarcoma L929 (Chen *et al.*, 2009). Por su parte, la lectina de garbanzo ha mostrado actividad antiproliferativa diferencial sobre las líneas celulares de cáncer Ishikawa, HepG-2, MCF-7 y MDA-MB-231, con mayor efecto a una concentración de 100 µg/mL sobre las células MDA-MB-231 y HepG-2 (Gautam *et al.*, 2018).

Muchos estudios que evalúan un nuevo fármaco comienzan con altas concentraciones para determinar si este es candidato a utilizarse en pruebas adicionales. Los resultados obtenidos en este trabajo señalan que incluso en bajas concentraciones la lectina promueve la disminución de la proliferación celular. Asimismo, otros estudios han determinado que concentraciones bajas de lectinas asumen un efecto negativo en la viabilidad celular. Cabe destacar que altas concentraciones pueden promover la mutación celular: células más resistentes a lectinas (Stanley y Carver, 1977). Esto es un factor importante a considerar para evitar efectos sobre células cancerosas, como promover la proliferación celular. Por ello, es importante encontrar el tratamiento adecuado para inhibir los procesos biológicos de la célula de cáncer.

En consideración a lo anterior, se determinó la concentración óptima de muerte celular del 50% de células en cultivo. En MDA-MB-231, el valor de IC<sub>50</sub> es de 47.44 µg/mL y está en concordancia con los resultados que se muestran en la Figura 6, puesto que es superior a la concentración de 25 µg/mL. En T47D, no fue posible determinar el IC<sub>50</sub> debido al comportamiento no gradual en la dosis-respuesta.

En varias investigaciones se ha reportado que las lectinas pueden tener un comportamiento no lineal en la dosis-respuesta. Por ejemplo, la lectina de *Phaseolus acutifolius* (TBL) mostró un efecto antiproliferativo no gradual en las líneas celulares cancerígenas MCF-7, C33-A, Sknsh; dosis menores de TBL presentaron mayor efecto que dosis más altas. Solo se observó una respuesta gradual de la dosis de TBL en las células SW480 (Valadez-Vega *et al.*, 2014). En el caso de la lectina de *Maackia amurensis* (MAL-II), la disminución en la proliferación celular en TPC-1 fue independiente de la dosis (Sancakli y Kaptan, 2019). De



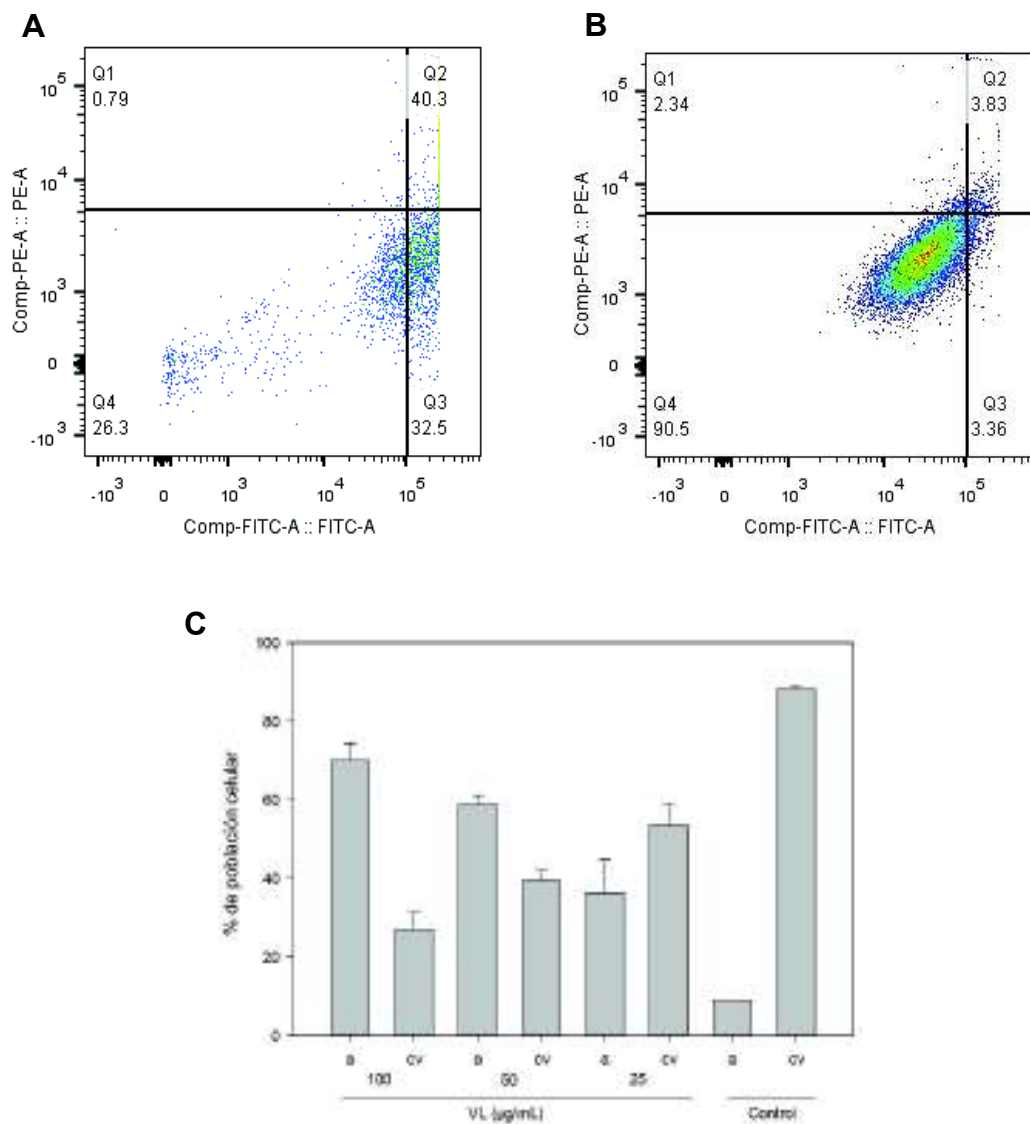
modo que la acción de las lectinas sobre células cancerosas puede estar condicionado al tipo celular.

#### **VII. 4. Inducción de apoptosis por VL en MDA-MB-231 y T47D**

La apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular que elimina células dañadas o desconocidas y que desempeña un papel de protección ante enfermedades (Shi *et al.*, 2013). En este trabajo, se cuantificó el porcentaje de células en apoptosis después de 3 h de tratamiento con la lectina VL. Tanto MDA-MB-231 como T47D exhibieron altos niveles de apoptosis tardía y temprana.

La cuantificación de apoptosis se evaluó por la tinción con Anexina V y PI (yoduro de propidio). Esta tinción genera patrones que son detectados por citometría de flujo y divididos en cuatro poblaciones celulares en cuatro cuadrantes: Q1, Q2, Q3 y Q4. Q1 agrupa todas las células en necrosis y no viables; presentan alta fluorescencia para PI y baja para Anexina V. Q2 presenta células en apoptosis tardía; con fluorescencia tanto para Anexina V y PI. Q3 presenta células en apoptosis temprana; con mayor fluorescencia para Anexina V que PI. Q4 agrupa todas las células viables, sin tinción para ningún marcador (Gondim *et al.*, 2017). En este estudio, las líneas celulares evaluadas se desplazaron principalmente del cuadrante Q4 a los cuadrantes Q2 y Q3.

Las células MDA-MB-231, mostraron un incremento en la apoptosis después de 3 h con la lectina VL. Todos los tratamientos evaluados (25, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) presentaron un incremento dosis-dependiente en el porcentaje de células teñidas para anexina V y una disminución de células viables, lo cual contrasta con el control negativo. Esto indica un aumento de apoptosis tardía y temprana (Figura 9C). En el histograma de la Figura 9A se observa que las células se desplazaron desde el cuadrante Q4 al Q2 y Q3 para el tratamiento con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; alrededor del 40% de las células exhibieron apoptosis tardía (Q2) y el 33% apoptosis temprana (Q3); mientras que el control negativo mostró un 90% de células viables (Figura 9B). Las células teñidas con anexina V presentan pérdida de la integridad de la membrana, así como externalización de fosfatidilserina.



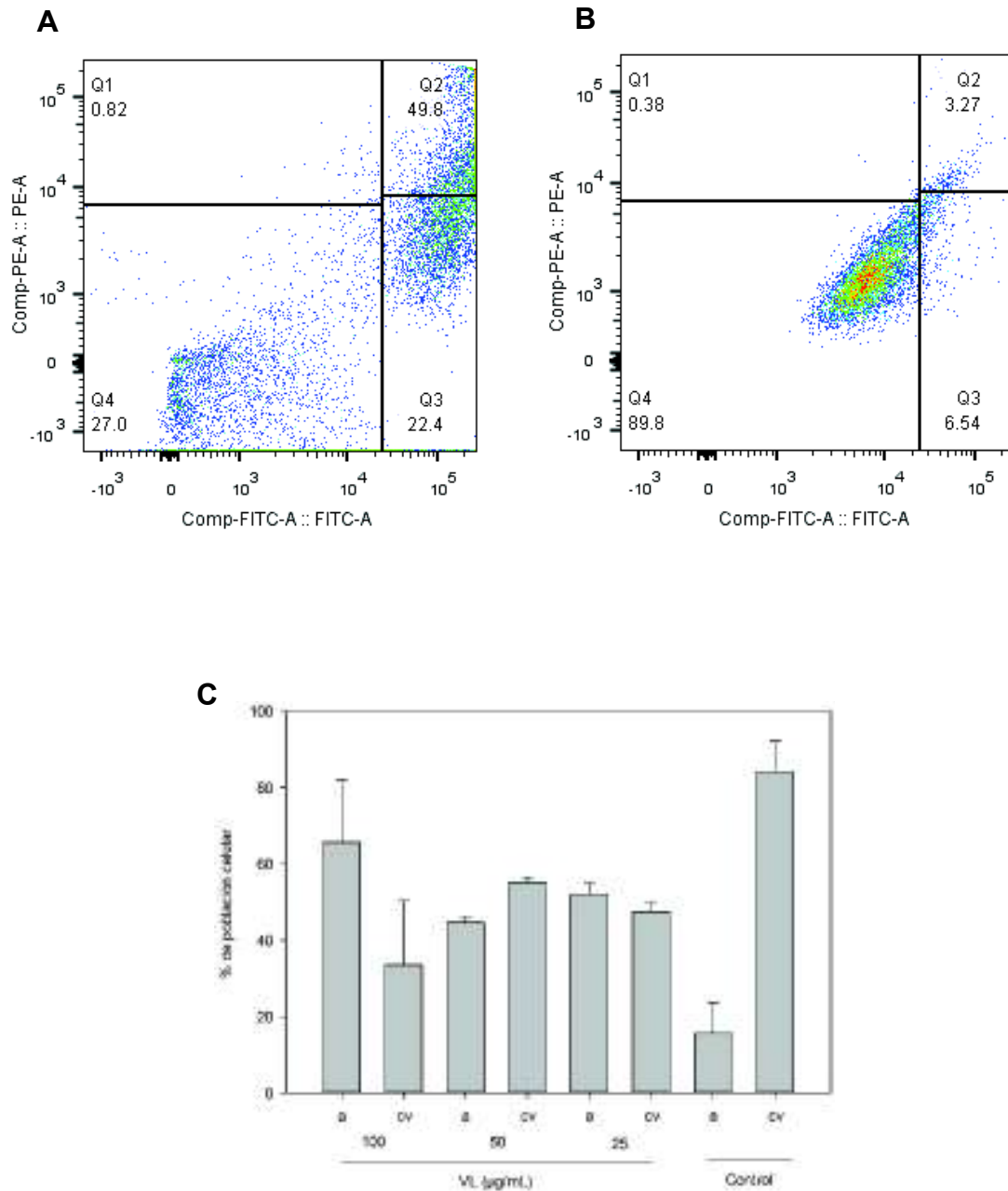
**Figura 9.** Ensayo de inducción de apoptosis en las células MDA-MB-231 tratadas con VL. 10A) Células expuestas durante 3 h a VL (100 µg/mL) con alta inducción de apoptosis. 10B) Control negativo. 10C) Porcentaje de población celular en apoptosis (a) y células viables (cv) en comparación con el control negativo. Todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticas contra el control negativo. Prueba de Mann-Whitney,  $p \leq 0.05$

Las células T47D exhibieron un incremento de células en apoptosis para los tratamientos de 25, 50 y 100 µg/mL. En este caso, no se observó un comportamiento dosis-dependiente en el incremento de apoptosis; la concentración de 25 µg/mL exhibió un mayor porcentaje de células

en apoptosis que el tratamiento de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 10C). Para el tratamiento de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , las células se desplazaron del cuadrante Q4 a los cuadrantes Q2 y Q3 (Figura 10A), mientras que las células sin tratamiento mostraron porcentajes de apoptosis normales (Figura 10B). El porcentaje de células en apoptosis tardía fue de alrededor del 50% y en apoptosis temprana del 22%. Estas células experimentaron pérdida de la integridad de membrana y externalización de fosfatidilserina. A partir de esto, se sugiere que la lectina VL puede activar la apoptosis, debido a que fosfatidilserina se expresa únicamente en este tipo de muerte celular y es uno de los marcadores principales.

La rápida respuesta de las células puede relacionarse con la afinidad a carbohidratos de la superficie celular o internalización de la lectina. En este sentido, los resultados obtenidos con VL no exploran las vías de señalización que desencadena la lectina. Se sabe que VL presenta afinidad por carbohidratos complejos tipo N-glicanos (Guzmán-Partida *et al.*, 2004), como la gran mayoría de lectinas de leguminosas (Sharon y Lis, 2002). Es por ello que la activación de los procesos apoptóticos en las células de cáncer de mama podría ejercerse mediante la interacción a los receptores transmembranales, sin requerir internalizarse en las células; ya que otras lectinas de plantas han demostrado ejercer su efecto desde el exterior de la célula. Esta unión de la lectina a carbohidratos de la superficie celular puede regular procesos diversos entre los cuales destaca el ciclo celular, proliferación y apoptosis (Kim *et al.*, 1993).

La inducción de apoptosis por las lectinas se divide en dos vías: extrínseca e intrínseca. La vía extrínseca ocurre mediante receptores transmembranales de muerte celular; esta ocasiona cambios morfológicos como encogimiento celular y condensación de la cromatina (Elmore, 2007). Para la vía intrínseca, se han reportado varios estímulos intracelulares asociados a mitocondrias que activan diferentes vías de señalización. En este caso, se inducen cambios en la membrana mitocondrial: apertura de poros de transición y alteración del potencial transmembrana, junto con la liberación de sustancias proapoptóticas (Saelens *et al.*, 2004). Ambas vías de inducción de apoptosis promueven la activación de múltiples caspasas; mecanismo común de varias lectinas.



**Figura 10.** Ensayo de inducción de apoptosis en las células T47D tratadas con VL. 10A) Células expuestas durante 3 h a VL (100 µg/mL) con alta inducción de apoptosis. 10B) Control negativo. 10C) Porcentaje de población celular en apoptosis (a) y células viables (cv) en comparación con el control negativo. Todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticas contra el control negativo. Prueba de Mann-Whitney,  $p \leq 0.05$

En numerosas investigaciones se ha estudiado el papel de las lectinas en la inducción de apoptosis. En la lectina de muérdago ML-I la activación de apoptosis se debió a la vía caspasa-8/FLICE; mientras que la lectina ML-II indujo apoptosis por la vía de las caspasas 9 y 3, a la par de un aumento significativo de peróxido de hidrogeno intracelular ( $H_2O_2$ ) en células de leucemia mieloide (Delebinski et al., 2015). Por otro lado, la lectina de ricina desencadenó la apoptosis por la vía mitocondrial mediada por la vía ERO-p38-p53 en las células de linfoma de Hodgkin (Bo *et al.*, 2009). En este trabajo, el mecanismo de acción de la lectina VL solo se comparó fue contrastado con el incremento de especies reactivas de oxígeno; sin embargo, es necesario elucidar las vías de señalización que son activadas después del tratamiento con VL.

## VII. 5. Evaluación de especies reactivas de oxígeno por la lectina VL

La generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la mitocondria provoca daño en moléculas como ADN, lípidos y proteínas. Los agentes químicos citotóxicos se han relacionado con la producción de ERO. En varios estudios con lectinas, se ha reportado que la activación de ERO puede inducir apoptosis mediante el estrés oxidativo o daño en ADN. También se conoce que ERO está involucrado en las primeras etapas de apoptosis y provoca la despolarización de la membrana (Ravidran *et al.*, 2011).

En este estudio, el incremento de ERO fue estudiado por el colorante DA-DFCA. Este es un compuesto no fluorescente que es oxidado por la acción intercelular de ERO a diclofluoreceína (DFCA), que puede ser detectado por citometría de flujo (Rajneesh *et al.*, 2017). Las células MDA-MB-231 y T47D mostraron un incremento significativo de ERO después del tratamiento con lectina VL. Este incremento fue evaluado por la intensidad media de fluorescencia y los resultados de los tratamientos se compararon con el control negativo.

El histograma A de la Figura 11 muestra la intensidad de fluorescencia en MDA-MB-231 después del tratamiento con VL. Los tratamientos mostraron un desplazamiento a la derecha en respuesta a la concentración de VL. Este desplazamiento fue indicativo del aumento en la intensidad de fluorescencia, el cual está relacionado con el incremento de ERO. En la Figura 11B se observó que conforme aumentó la concentración de VL se incrementó el contenido de ERO intracelular. Sin embargo, los tratamientos no mostraron diferencias estadísticas. Estos

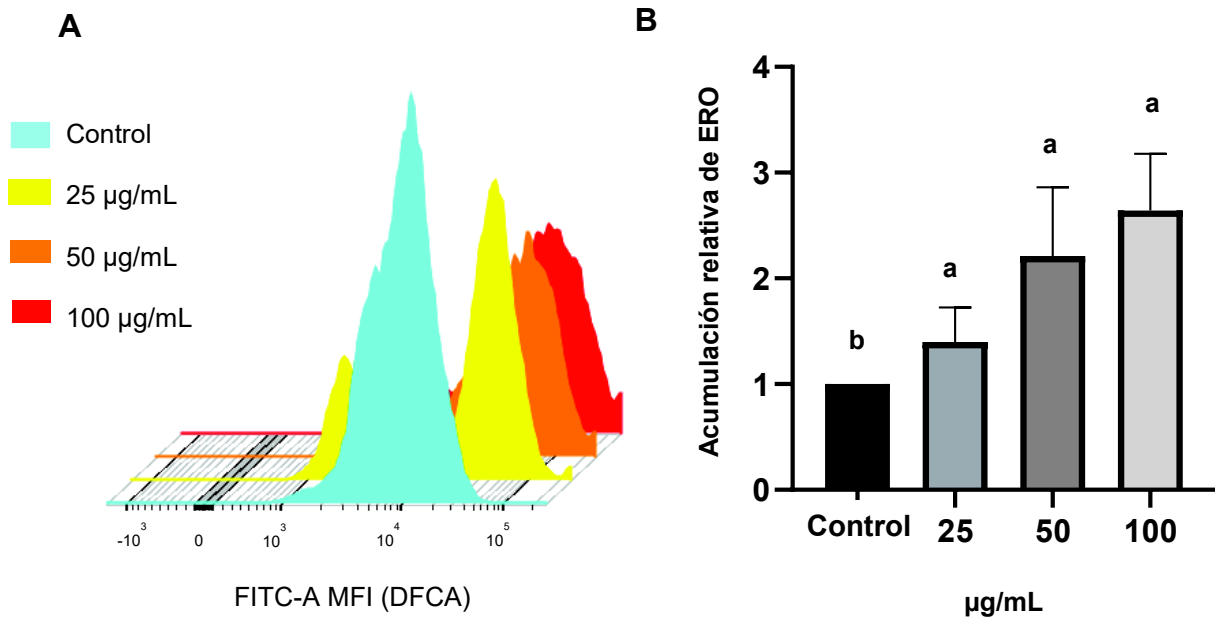
datos sugieren que el incremento de ERO no está relacionada con la inducción de apoptosis, puesto que los valores no son significativos; lo cual contrasta con el aumento de apoptosis en función de la dosis.

En T47D, los tratamientos se desplazaron a la derecha acorde al aumento en la concentración de VL (Figura 12A). Por su parte, la concentración de VL fue determinante para el incremento de ERO intracelular; la concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  exhibió un mayor incremento de ERO en contraste con el control negativo; sola la concentración menor y mayor exhibieron diferencias estadísticas (Figura 12B), por lo que no es posible relacionar la inducción de apoptosis por la activación de ERO; esto porque la concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  exhibió eventos apoptóticos.

Estudios con líneas celulares de leucemia (MOLT-4 y HL-60) tratadas con las lectinas ConBr y ConA mostraron un aumento significativo de ERO intracelular en las concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sin embargo, la producción de ERO no fue un factor inicial en la inducción de apoptosis (Faheina-Martins *et al.*, 2012). Por su parte, la lectina SBL evaluada en células HeLa mostró que la respuesta en la apoptosis y ERO fue dependiente de la dosis. De manera que la lectina SBL indujo apoptosis mediante la generación de ERO (Panda *et al.*, 2014). También se ha reportado que la lectina PCL indujo apoptosis en la línea de melanoma humano A375, por la vía p38-p53 mediada por ERO (Liu *et al.*, 2010).

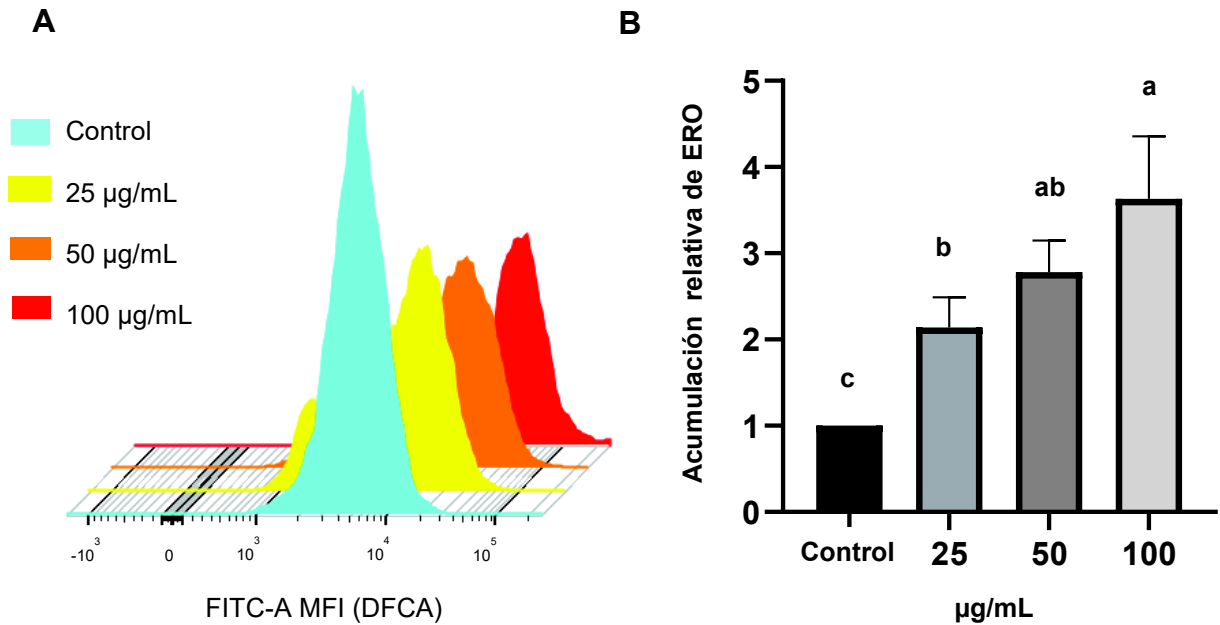
La diferencia en la respuesta de las líneas celulares está relacionada con el tipo celular, concentración de la lectina y el carbohidrato que reconocen en las líneas celulares. Por ello, es necesario evaluar las vías de señalización que son expresadas cuando las células son tratadas con VL.

## MDA-MB-231



**Figura 11.** Acumulación relativa de ERO en MDA-MB-231. A) Histogramas representativos de unidades de intensidad de fluorescencia media (MFI) de DFCA (en el canal FITC-A) en células MDA después de la incubación con la lectina VL. Los valores se expresan como MFI en  $2,5 \times 10^5$  células. B) Acumulación relativa de ERO (previamente medida en unidades MFI) en las concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL en comparación a la acumulación de ERO del control negativo. Prueba de Tukey-Tramer,  $p \leq 0.05$ .

## T47D



**Figura 12.** Acumulación relativa de ERO en T47D. A) Histogramas representativos de unidades de intensidad de fluorescencia media (MFI) de DFCA (en el canal FITC-A) en células T47D después de la incubación con la lectina VL. Los valores se expresan como MFI en  $2,5 \times 10^5$  células. B) Acumulación relativa de ERO (previamente medida en unidades MFI) en los tratamientos de 25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  en contraste con el control negativo. Prueba de Tukey-Kramer,  $p \leq 0.05$ .



## VIII. CONCLUSIÓN

En este trabajo se evaluó el efecto antiproliferativo de la lectina VL sobre las líneas celulares MDA-MB-231 y T47D; además de evaluar los mecanismos de acción relacionados con la actividad antiproliferativa de VL sobre las líneas celulares de cáncer de mama. Los resultados obtenidos indican que la lectina VL se unió a la superficie celular de las líneas celulares y mostró una actividad antiproliferativa dependiente de la concentración en las células MDA-MB-231 y no dependiente de la concentración en T47D. Después del tratamiento con VL, las células mostraron un aumento de eventos apoptóticos; mientras que el incremento de especies reactivas de oxígeno no se relacionó con la inducción de apoptosis en MDA-MB-231 y T47D. Por ello, más investigaciones son necesarias para evaluar el potencial de la lectina VL como nuevo tratamiento contra el cáncer.

## **IX. RECOMENDACIONES**

- Estudiar las vías de señalización implicadas en la activación de apoptosis por VL; para comprender a detalle el mecanismo de acción de esta lectina sobre las células de cáncer de mama.
- Determinar si el incremento de ERO por VL desencadena la autofagia en las líneas celulares de cáncer de mama.
- Evaluar el efecto de la lectina sobre el potencial de la membrana mitocondrial de las líneas celulares.
- Estudiar los cambios en la morfología de la membrana de las células cancerígenas tratadas con la lectina VL.
- Estudiar los receptores implicados en la unión de la lectina VL a las células de cáncer de mama, los cuales podrían utilizarse como marcadores moleculares.

## X. LITERATURA CITADA

- Albores, S., P. Mora, M. J. Bustamante, M. P. Cerdeiras, L. F. Fraguas. 2013. Purification and applications of a lectin from the mushroom *Gymnopilus spectabilis*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 172(4):2081-90. doi:0.1007/s12010-013-0665-5
- Allen, R. D., C. C. Schroeder, A. K. Fok. 1989. Intracellular binding of wheat germ agglutinin by Golgi complex, phagosomes, and lysosomes of *Paramecium multimicronucleatum*. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 37(2):195-202:286-296. doi:10.1177/37.2.2911005
- Andrade, C. A., M. T. Correia, L. C. Coelho, S. C. Nascimento, N. S. Santos-Magalhães. 2004. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes International Journal of Pharmaceutics. 278(2):435-45. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.03.028
- Ataollahi, M. R., J. Sharifi, M. R. Paknahad, A. Paknahad. 2015. Breast cancer and associated factors: a review. Journal of Medicine and Life. 8(4):6-11.
- Ashraf, T. y R. H. Khan. 2003. Mitogenic Lectins. Medical Science Monitor. 9(11):265-269. doi:10.13140/2.1.3317.8249
- Bellande, K., J. J. Bono, B. Savelli, E. Jamet, H. Canut. 2017. Plant lectins and lectin receptor-like kinases: How do they sense the outside? International Journal Of molecular Science. doi: 10.3390/ijms18061164
- Bo, L., M. Ming-Wei, B. Jin-Ku. 2009. Induction of Apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. Antophagy. 5(3): 432-433. doi:10.4161/auto.5.3.7924
- Brooks, S. A. 2000. The involvement of *Helix pomatia* lectin (HPA) binding N-acetylgalactosamine glycans in cancer progression. Histol Histopathol. 15:143-158. doi:10.14670/HH-15.143
- Brooks, S. A, D. M Hall, I. Buley. 2001. GalNAc glycoprotein expression by breast cell lines, primary breast cancer and normal breast epithelial membrane. British Journal of Cancer. 28:1014-1022. doi:10.1054/bjoc.2001.2028
- Bussing, A., G. M. Stein, U. Pfüller, M. Schietzel. 1999. Differential binding of toxic lectins from *Viscum album* L., ML I and ML III, to human lymphocytes. Anticancer Research. 19(6B):5095-5099.

- Cailleau, R., M. Olive, Q. V. Cruciger. 1978. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*. 14(11):911– 915. doi:10.1007/BF02616120
- Carvalho, F. C., S. G. Soares, M. B. Tamarozzi, E. M. Rego, M. C. Roque-Barreira. 2011. The recognition of N-glycans by the lectin ArtinM mediates cell death of a human myeloid leukemia cell line. *PLoS One* 6:e27892. doi:10.1371/journal.pone.0027892
- Casas-Corredor, Z. Y., E. A. Reyes-Montano, N. A. Vega-Castro. 2016. Lectinas con dominio de leguminosas: características estructurales y utilidad como agentes insectistáticos e insecticidas. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Science*. 32(2):157-169. doi:10.4067/S0719-38902016000200009
- Castillo-Villanueva, A., H. Caballero-Ortega, F. Abdullaev-Jafarova, Y. Garfias, C. M. Jiménez-Martínez, B. Martínez, G. Mendoza Hernández, E. Zenteno. 2007. Lectin from *Phaseolus acutifolius* var. escumite: chemical characterization, sugar specificity, and effect on human T-lymphocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:5781–5787. doi:10.1021/jf063644k
- Chan, Y. S., J. H. Wong, E. F. Fang, W. Pan, T. B. Ng. 2012. Isolation of a glucosamine binding leguminous lectin with mitogenic activity towards splenocytes and anti-proliferative activity towards tumor cells, *PLoS One* 7(6):e38961. doi:10.1371/journal.pone.0038961
- Chan, Y. S., H. Yu, L. Xia, T. B. Ng. 2015. Lectin from green speckled lentil seeds (*Lens culinaris*) triggered apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Chinese medicine*. 10:25. doi:10.1186/s13020-015-0057-6
- Chang, C. P., M. C. Yang, H. S. Liu, Y. S. Lin, H. Y. Lei. 2007. Concanavalin A induce autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. *Hepatology*. 45(2). doi:10.1002/hep.21509
- Chen, Y. F., C. R. Boland, E. R. Kraus, I. J. Goldstein. 1994. The lectin *Griffonia simplicifolia* I-A4 (GSI-A4) specifically recognizes terminal alpha-linked N-acetylgalactosaminyl groups and is cytotoxic to the human colon cancer cell lines LSII74 and SW1116. *International Journal of Cancer*. 57:561-7. doi:10.1002/ijc.2910570420
- Chen, J., B. Liu, N. Ji, J. Zhou, H. J. Bian, C. Y. Li, F. Chen, J. K. Bao. 2009. A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. *Phytomedicine*. 16(4):352-60. doi:10.1016/j.phymed.2008.07.003
- Cochran, A. J., C. R. Wen, O. Berthier-Vergnes, C. Bailly, J. F. Dore, F. Berard. 1999. Cytoplasmic accumulation of peanut agglutinin-binding glycoconjugates in the cells of primary melanoma correlates with clinical outcome. *Human Pathology*. 30:556-61. doi:10.1016/S0046-8177(99)90201-0

- Cummings, R. D., S. Kornfeld. 1982. Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. *Journal of Biological Chemistry*. 257(19):11230-4.
- Deacon, A., T. Gleichmann, A. J. Kalb, H. Price, J. Raftery, G. Bradbrook. 1997. The structure of concanavalin A and its bound solvent determined with small-molecule accuracy at 0.94 Å resolution. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 93(24):4305-4312.
- Delebinski, C. I., M. Twardziok, S. Kleinsimon, F. Hoff, K. Mulsow, J. Rolff, S. Jäger, A. Eggert, y G. Seifert. 2015. A Natural Combination Extract of *Viscum album* L. Containing both triterpene acids and lectins is highly effective against AML *in Vivo*. *Plos one*. 10(8):e0133892. doi:10.1371/journal.pone.0133892
- Dold, U., L. Edler, H. Mäurer. 1991. *Adjuvant Cancer Therapy in Advanced Non-Small Cell Bronchial Cancer: Multicentric Controlled Studies To Test the Efficacy of Iscador and Polyerga*. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- Ernst, E., K. Schmidt, M. K. Steuer-Vogt. 2003. Mistletoe for cancer? A systematic review of randomised clinical trials. *International Journal of Cancer*. 107:262-267. doi:10.1002/ijc.11386
- Estrada-Martínez, L. E., U. Moreno-Celis, R. Cervantes-Jiménez, R. A. Ferriz-Martínez, A. Blanco-Labra, T García-Gasca. 2017. Plant lectins as medical tools against digestive system cancers. *International Journal of Molecular Science*. doi:10.3390/ijms18071403.
- Faheina-Martins, G. V., A. L. da Silveira, B. C. Cavalcanti, M. V. Ramos, M. O. Moraes, C. Pessoa, D. A. Araújo. 2012. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. *Toxicology in Vitro*. 26(7):1161-9. doi:10.1016/j.tiv.2012.06.017.
- Ferriz-Martinez, R. A., I. C. Torres-Arteaga, A. Blanco-Labra, T. García-Gasca. 2010. The role of plant lectins in cancer treatment, 71-89 pp. En: Mejia-Vazquez (Eds). *New Approaches in the Treatment of Cancer*. Nova Science Publishers, Inc
- Gastman, B., K. Wang, J. Han, Z. Zhu, X. Huang, G. Wang, H. Rabinowich, E. Gorelik. 2004. A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 316:263-271. doi:10.1016/j.bbrc.2004.02.043
- Gautam, A. K., N. Gupta, D. T. Narvekar, R. Bhadkariya, S. S. Bhagyawant. 2018. Characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) lectin for biological activity. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 24(3):389-397. doi:10.1007/s12298-018-0508-5

- Giacometti, J. 2015. Plant lectins in cancer prevention and treatment. *Medicina fluminensis*. 51(2):211-229.
- Gondim A. C. S., I. Romero-Canelón, E. H. S. Sousa, C. A. Blindauer, J. S. Butler, M. J. Romero, C. Sanchez-Cano, B. L. Sousa, R. P. Chaves, C. S. Nagano, B. S. Cavada, P. J. Sadler. 2017. The potent anti-cancer activity of *Dioclea lasiocarpa* lectin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 175:179-189. doi:10.1016/j.jinorgbio.2017.07.011
- González de Mejía, E., N. Rocha, H. C. Winter, I. J. Goldstein. 2002. Differential effect of a lectin from mesquite (*Prosopis juliflora*) on HeLa and normal human keratinocyte cells. *The FASEB Journal*. 15(4):C-128.
- Green, E. D., R. M. Brodbeck, J. U. Baenziger. 1987. Lectin affinity high-performance liquid chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*. 262(25):12030-12039.
- Guzmán-Partida, A. M., M. R. Robles-Burgueño, M. Ortega-Nieblas, I. Vázquez-Moreno. 2004. Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. *BIOCHIME*. 86:335-342. doi:10.1016/j.biochi.2004.02.005
- Hamid, R., Y. Rotshteyn, L. Rabadi, R. Parikh, P. Bullock. 2004. Comparison of alamar blue and mtt assays for high throughput screening. *Toxicology in vitro*. 18(5):703-710. doi:10.1016/j.tiv.2004.03.012
- Hashim, O. H., J. J. Jayapalan, C. S. Lee. 2017. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. *PeerJ—the journal of life and environmental sciences*. doi:10.7717/peerj.3784
- Hernández-Díaz, P., O. Martín-González, Y. Rodríguez, G. Baez. 1999. Aplicaciones de la lectina. *Revista Cubana de Hematología e Inmunología y Hemoterapia*. 15(2):91-95.
- Hernández, C. P., E. P. Campo, L. Martínez, B. Ortiz, G. Martínez. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Revista de Educación Bioquímica*. 24(1):21-25.
- Huaung, Y., J. Tan, Z. Wang, S. W. Yin, X. Huaung, W. Wang, Q. Ren. 2014. Cloning and characterization of two different L-type lectin genes from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Developmental and Comparative Immunology*. doi:10.1016/j.dci.2014.04.015
- Iordache, F., M. Ionita, L. I. Mitrea, C. Fafaneata, A. Pop. 2015. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 16(2): 1-10. doi:10.2174/138920101602150112151907
- Jiang, Q. L., S. Zhang, M. Tian, S. Y. Zhang, T. Xie, D. Y. Chen, Y. J. Chen, J. He, J. Liu, L. Ouyang, X. Jiang. 2015. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging

- anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. *Cell Proliferation*. 48(1):17-28. doi:10.1111/cpr.12155
- Jordinson, M., I. El-Hariry, D. Calnan, J. Calam, M. Pignatelli. 1999. *Vicia faba* agglutinin, the lectin present in broad beans, stimulates differentiation of undifferentiated colon cancer cells. *Gut*. 44:709-714. doi:10.1136/gut.44.5.709
- Kawaguchi, T., H. Takazawa, S. Imai, J. Morimoto, T. Watanabe, M. Kanno, S. Igarashi. 2006. Expression of *Vicia villosa* agglutinin (VVA)-binding glycoprotein in primary breast cancer cells in relation to lymphatic metastasis: is atypical MUC1 bearing Tn antigen a receptor of VVA? *Breast Cancer Research and Treatment*. 98:31-43. doi:10.1007/s10549-005-9115-6
- Kerr, J. F. 2002. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*. 181–182:471–4. doi:10.1016/s0300-483x(02)00457-2
- Kim, M., M. V. Rao, D. J. Tweardy, M. Prakash, U. Galili, E. Gorelik. 1993. Lectin-induced apoptosis of tumour cells. *Glycobiology*. 3:447–453. doi:10.1093/glycob/3.5.447
- Lam, K. S. y T. B. Ng. 2011. Lectins: production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89:45-55. doi:10.1007/s00253-010-2892-9
- Liu, B., H. J. Bian, J. K. Bao. 2010. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters*. 287(1):1-12. doi:10.1016/j.canlet.2009.05.013.
- Lyu, S. Y., S. H. Choi, W. B. Park. 2002. Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Archives of Pharmacal Research*. 25:93-101. doi:10.1007/BF02975269
- Marvibaigi, M., E. Supriyanto, N. Amini, F. A. Abdul-Majid. 2014. Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2014/785479.
- Mehta, S., R. Chhetra, R. Srinivasan, S. C. Sharma, D. Behera, S. Ghosh. 2013. Potential importance of *Maackia amurensis* agglutinin in nonsmall cell lung cancer. *Journal of Biological Chemistry*. 394(7): 889-900. doi:10.1515/hsz-2012-0279
- Milde, L. K., T. Karn, M. Schmidt, C. Zu Eulenburg, L. Oliveira-Ferrer, R. M. Wirtz, U. Schumacher, I. Witzel, D. Schütze, V Müller. 2014. Prognostic relevance of glycosylation-associated genes in breast cancer. *Breast Cancer Research and treatment*. doi:10.1007/s10549-014-2949-z
- Oliveira-Dias, R., L. Dos Santos-Machado, L. Migliolo, O. Luiz-Franco. 2015. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. *Molecules*. 20(1):519-41. doi:10.3390/molecules20010519

- Panda, P. K., S. Mukhopadhyay, B. Behera, C. S. Bhol, S. Dey, D. N. Das, N. Sinha, A. Bissoyi, K. Pramanik, T. K. Maiti, S. K. Bhutia. 2014. Antitumor effect of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway. *Life Sciences*. 111(1-2):27-35. doi:10.1016/j.lfs.2014.07.004.
- Peumans, W. J., J. M. Van Damme. 1998. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 15:199-228. doi:10.1080/02648725.1998.10647956
- Pinheiro, A. Q., D. F. Melo, L. M. Macedo, M. G. Freire, M. F. Rocha, J. J. Sidrim, R. S. Brillhante, E. H. Teixeira, C. C. Campello, D. C. Pinheiro, M. G. Lima. 2009. Antifungal and marker effects of *Talisia esculenta* lectin on *Microsporium canis in vitro*. *Journal of Applied Microbiology*. 107:2063–2069. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04387.x.
- Pinho, S. S., C. A. Reis. 2015. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*. (9):540-55. doi:10.1038/nrc3982.
- Procopio, T., L. L. Siqueira-Patriota, M. C. Moura, P. M. da Silva, A. P. Oliveira, L. V. Carvalho, T. A. Lima. 2017. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. *International Journal of Biological Macromolecules*. 98:419-29. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.02.2019.
- Rajneesh, P. J., A. Chatterjee, S. P. Singh, R. P. Sinha. 2017. Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cyanobacteria Using the Oxidant-sensing Probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA). *Bio-protocol*. 717:e2545. doi:10.21769/BioProtoc.2545.
- Ravidran, J., N. Gupta, M. Agrawal, B. Bhaskar, P. V. L. Rao. 2011. Modulation of ROS/MAPK signaling pathways by okadaic acid leads to cell death via, mitochondrial mediated caspase-dependent mechanism. *Apoptosis*. 16:145–161. doi:10.1007/s10495-010-0554-0.
- Rudiger H., H. J. Gabius. 2001. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugates Journal*. 2001. 18:589–613. doi:10.1023/A:1020687518999
- Sancakli A, Kaptan E. 2019. Lectin Treatment Affects Malignant Characteristics of TPC-1 Papillary Thyroid Cancer Cells. *European Journal of Biology*. 78(1):51-57. doi:10.26650/EurJBiol.2019.0006
- Saelens, X., N. Festjens, W. Vande, M. Van Gurp, G. Van Loo, P. Vandenabeele. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 23:2861-2874. doi:10.1038/sj.onc.1207523



- Saint-Guirons, J., E. Zeqiraj, U. Schumacher, P. Greenwell, M. Dwek. 2007. Proteome analysis of metastatic colorectal cancer cells recognized by the lectin *Helix pomatia* agglutinin (HPA). *Proteomics*. 7:4082–4089.
- Sasaki, T., K. Yamazaki, T. Yamori, T. Endo. 2002. Inhibition of proliferation and induction of differentiation of glioma cells with *Datura stramonium* agglutinin. *British Journal of Cancer*. 87:918-23. doi:10.1038/sj.bjc.6600550
- Sharon, N., H. Lis. 2002. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(22):6586-6591. doi:10.1021/jf020190s
- Sharon, N., H. Lis. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 14(11):53R-62R. doi:10.1093/glycob/cwh122
- Sharon, N. 2008. Lectins: past, present and future. *Biochemical Society Transactions*. 36(6):1457-60. doi:10.1007/978-1-4020-6953-6
- Shi, Z., N. An, S. Zhao, X. Li, J. K. Bao, B. S. Yue. 2013. In silico analysis of molecular mechanisms of legume lectin-induced apoptosis in cancer cells. *Cell Proliferation*. 46: 86–96. doi:10.1111/cpr.12009
- Stanley, P., J. P. Carver. 1977. Lectin receptors and lectin resistance in Chinese hamster ovary cells. *Advances in experimental medicine and biological*. 84:265-84. doi:10.1007/978-1-4684-3279-4\_13
- Sun, Y. S., Z. Zhao, Z. N. Yang, F. Xu, H. J. Lu, Z. Y. Zhu, W. Shi, J. Jiang, P. P. Yao, H. P. Zhu. 2017. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*. 13(11):1387–1397. doi:10.7150/ijbs.21635
- Valadez-Vega, C., J. A. Morales-González, M. T. Sumaya-Martínez, L. Delgado-Olivares, A. Cruz-Castañeda, M. Bautista, M. Sánchez-Gutiérrez, C. Zuñiga-Pérez. 2014. Cytotoxic and Antiproliferative Effect of Tepary Bean Lectins on C33-A, MCF-7, SKNSH, and SW480 Cell Lines. *Molecules*. 19:9610-9627. doi: 10.3390/molecules19079610
- Van Cruchten, S., W. Van Den Broeck. 2002. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomy Histology Embryology*. 31:214-23. doi:10.1046/j.1439-0264.2002.00398.x
- Van Damme, E. J. M., W. J. Peumans, A. Barre, P. Rouge. 1998. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 17(6):575-692. doi:10.1080/07352689891304276

- Van Damme, E. J. 2008. Plant lectins as part of the plant defense system against insects. In: Schaller A. (eds) *Induced Plant Resistance to Herbivory*. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-1-4020-8182-8\_14
- Urbano-Hernández. 2007. Identificación de estructuras glicosídicos reconocidas por la lectina PF2 en fetuina y tejidos linfoides. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Ciencia de alimentos. Hermosillo, Sonora, México.
- Zheng, S., J. Chen, L. Chun-yang, N. AN, Z. Wang, S. Yang, K. Huaung, J. Bao. 2014. Antitumor effects of concanavalin A and *Sophora flavescens* lectin *in vitro* and *in vivo*. *Acta Pharmacologica Sinica*. 35:248–256. doi:10.1038/aps.2013.151