

# UNIVERSIDAD DE SONORA

FACULTAD INTERDISCIPLINARIA DE INGENIERÍA

Departamento de Investigación en Polímeros y  
Materiales

**Estudio fisicoquímico de la línea celular  
monocítica de leucemia aguda humana THP-1  
expuesta a la lectina PF2 de *Olneya tesota***

**TESIS**

**DOCTORA EN CIENCIA DE MATERIALES**

**1942**  
**PRESENTA:**

**M. en C. Diana Laura Villegas Coronado**

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

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2023

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



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

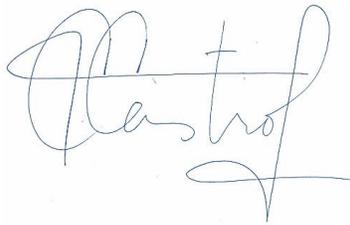


Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual de la Universidad de Sonora y del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del director de tesis, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director de la Tesis.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al DIPM, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Teresa del Castillo Castro', written in a cursive style.

Dra. Teresa del Castillo Castro

Jefe del Departamento

# APROBACIÓN DE TESIS

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de Doctorado de la Maestra en Ciencias Diana Laura Villegas Coronado la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de **Doctora en Ciencia de Materiales**.



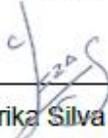
Dr. Amir Maldonado Arce  
Presidente



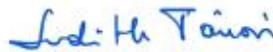
Dra. Irlanda Lagarda Díaz  
Secretario



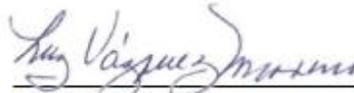
Dr. José Carmelo Encinas Encinas  
Sinodal



Dra. Erika Silva Campa  
Sinodal



Dra. Judith Celina Tanori Córdova  
Sinodal



Dra. Luz Vázquez Moreno  
Sinodal Externo

# DEDICATORIA

A mi abuela Teresa Coronado Tanori

A mi tío Martin Coronado Coronado

DEP

# AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el otorgamiento de una Beca (CVU No. **862403**) durante la duración del posgrado para poder continuar con mis estudios.

Al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM) de la Universidad de Sonora (UNISON) por el aporte de reactivos, equipo e instalaciones necesarios para realizar los experimentos del presente proyecto.

A mis directores de tesis por su apoyo incondicional y por transmitir sus valiosos conocimientos. Muchas gracias, Dra. Irlanda Lagarda Díaz y Dr. Amir Maldonado Arce.

A los miembros de mi comité de tesis doctoral a la Dra. Judith Tánori Córdova, Dra. Erika Silva Campa, Dra. Luz Vázquez Moreno y Dr. Carmelo Encinas Encinas

Al Departamento de Física de UNISON.

Al laboratorio de Biofísica y Biofísica celular del departamento de física Unison.

A la Dra. Lerma Chan y la Dra. Ana Gloria Villaba por su ayuda y amistad.

Al laboratorio de Bioquímica clínica del departamento de medicina de Unison.

A la Dra. Adriana Soto Guzmán y al Dr. Juan Manuel Martínez Soto por su apoyo en citometría de flujo y amistad.

Al laboratorio de bioquímica de proteínas y glicanos del CIAD

A la M.C. Ana María Guzmán partida por su apoyo y amistad

A la Dra. Luz Vázquez Moreno por permitirme trabajar en el laboratorio de Bioquímica de proteínas y glicanos.

Al laboratorio de Física medica de la Unison

A la Dra. Erika Silva Campa y al Dr. Andre-i Sarabia por su apoyo con el microscopio confocal.

A la Dra. Nayelli Terán Saavedra por ayudarme en la experimentación y por su amistad.

A mis amigos del laboratorio Edgar, Alan, Abraham y Claudia.

A mis amigos del posgrado Abraham y Guillermo, me hicieron más fácil la racha final.

# CONTENIDO

APROBACIÓN DE TESIS.....	¡Error! Marcador no definido.
AGRADECIMIENTOS.....	4
CONTENIDO .....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT .....	13
CAPÍTULO 1.....	14
INTRODUCCIÓN.....	14
OBJETIVOS.....	16
Objetivo general .....	16
Objetivos específicos .....	16
CAPÍTULO 2.....	17
ANTECEDENTES.....	17
Lectinas de Plantas .....	17
Actividad Antitumoral de las lectinas .....	18
Lectina de Palo Fierro PF2.....	22
Glicosilación .....	23
Leucemia Mieloblástica Aguda.....	27
Tratamientos.....	28
Células tumorales.....	30
Propiedades Mecánicas.....	31
Microfluídica .....	33
CAPITULO 3.....	35
ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO .....	35
MATERIALES.....	36
MÉTODOS.....	37
Purificación de lectina PF2. ....	37
Cultivo de la línea celular THP-1 .....	37
Tratamientos de monocitosTHP-1 con la lectina PF2.....	37

<b>Caracterización celular y molecular de monocitos THP-1 expuestos a la lectina PF2</b> .....	38
<b>Bio-reconocimiento</b> .....	38
<b>Actividad antiproliferativa</b> .....	38
<b>Inducción de apoptosis</b> .....	39
<b>Determinación de especies reactivas de oxígeno (ensayo ROS)</b> . ....	40
<b>Análisis del potencial de membrana mitocondrial</b> .....	40
<b>Ensayo de fragmentación de ADN</b> .....	41
<b>Caracterización física de monocitos THP-1 expuestos a la lectina PF2</b> .....	42
<b>Fabricación de chip microfluídico</b> .....	42
<b>Tamaño de Diámetro celular</b> .....	42
<b>Configuración experimental del chip microfluídico</b> .....	42
<b>Análisis de Video</b> .....	43
<b>Índice de deformación de monocitos THP-1</b> .....	43
<b>Tiempo de entrada de las células THP-1 en el canal de constricción</b> . ....	44
<b>Perfil de velocidades de los monocitos THP-1 al transitar por el canal de constricción</b> . ....	46
<b>Análisis estadístico</b> .....	47
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	48
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	48
<b>Purificación de lectina PF2</b> .....	48
<b>Caracterización celular y molecular de monocitos THP-1 expuestos a la lectina PF2</b> .....	49
<b>La lectina PF2 reconoce los monocitos THP-1</b> .....	49
<b>PF2 inhibe la proliferación e induce la apoptosis de las células THP1</b> .....	51
<b>Caracterización física de monocitos THP-1 expuestos a la lectina PF2</b> .....	61
<b>Chip microfluídico</b> .....	61
<b>Diámetro celular</b> .....	63
<b>Índice de deformación, tiempo de entrada y perfiles de velocidad de los monocitos THP-1 en el canal de constricción</b> . ....	65
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	71
<b>PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES</b> .....	72
<b>REFERENCIAS</b> .....	73
<b>ANEXOS</b> .....	82

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A. interacciones lectina-carbohidrato en la superficie celular presentes en glicoproteínas, infección por virus, glicolípidos e infección por bacterias. B. Estructura general de las lectinas de leguminosas (Modificado de: Sharon y Lis, 2004; Lagarda-Díaz et al., 2017).....	18
Figura 2	Las lectinas vegetales inducen la muerte de células cancerosas a través de la red de señalización de muerte celular programada. Tomado de Fu Lei-Lei et al., 2011.....	21
Figura 3	Palo fierro ( <i>O. tesota</i> ). Fuente: CONANP y CONABIO.....	22
Figura 4	Estructuras de los oligosacáridos complejos de la fetuina reconocidos por (a) PHA-E y por PF2 (b). (Urbano-Hernández, 2007).....	23
Figura 5	Célula THP-1 en la región de relajación en el canal de microfluídica, antes de entrar a la región de constricción. B. Secciones de largo y ancho para tomar en cuenta en el cálculo del índice de deformación.	43
Figura 6	Fotogramas (1-11) extraídos de uno de los videos capturados de las células THP-1 tratadas con 50 µg/ml de PF2 conforme entra a la región de constricción del canal microfluídico.....	44
Figura 7	Definición de la sección transversal para calcular el perfil de velocidad de las células THP-1 en el canal de constricción utilizando cada segmento del 1 al 5.....	45
Figura 8	Micrografías de fluorescencia confocal se obtuvieron con un microscopio confocal 20X. PF2 se incubó con 10 µg/ml de PF2 marcado con FITC y el control negativo se incubó con PBS. La emisión de fluorescencia verde corresponde al reconocimiento de los monocitos THP-1 por la lectina FITC-PF2.....	48

Figura 9	La viabilidad de las células THP-1 tratadas con concentraciones crecientes de PF2 durante 24 h. La viabilidad celular se presenta como el porcentaje de células viables normalizadas a células no tratadas (control) (al 100%). Las barras representan las medias de los porcentajes de viabilidad celular y la desviación estándar de los triplicados. Literales diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).....	50
Figura 10	Análisis de citometría de flujo de monocitos THP1 expuestos a lectina PF2 utilizando marcaje fluorescente con anexina V-FITC y yoduro de propidio. El control negativo consta de células tratadas con PBS. A. Diagramas de cebra representativos. B. Porcentajes de población celular en cada uno de los cuadrantes de los diagramas de puntos de citometría de flujo. C. Porcentajes de células viables y no viables. Las barras representan las medias $\pm$ DE (n=3). Diferentes literales entre cuadrantes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) contra el control no tratado.....	51
Figura 11	Análisis de fragmentación del ADN genómico en células THP-1 tratadas con PF2 durante 6 h. Línea 1 = ADN de células tratadas con PBS (control negativo); línea 2 = ADN de células tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 mM; línea 3 = ADN de células tratadas con dexametasona 10 mM; línea 4 = ADN de células tratadas con 10 $\mu$ g/mL de lectina PF2.....	55
Figura 12	Acumulación relativa de ROS en monocitos THP-1 expuestos a diferentes concentraciones de lectina PF2. A. Medición de ROS por citometría de flujo seguida de la reacción de diclorofluoresceína fluorescente (DFCA). B. Histogramas representativos de unidades de intensidad de fluorescencia (MFI) media $\pm$ SD de DFCA (en el canal FITC-A). Los valores se expresan como IMF en $1 \times 10^4$ . Acumulación relativa de ROS considerando los niveles basales de ROS como punto de comparación. Literales diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).....	56

Figura 13	Efecto de la lectina PF2 sobre el potencial de membrana mitocondrial THP-1. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de monocitos THP-1 teñidos con rodamina 123 con un aumento de 20x (A) y 40x (B). Unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia (C). Una disminución en la intensidad de la fluorescencia indica la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Las barras representan las medias $\pm$ DE (n=4). Literales diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).....	57
Figura 14	Chip de Poli Dimetil Sulfoxido (PDMS) sellado en cubreobjetos de vidrio y sus orificios de entrada y salida.....	59
Figura 15	Dispositivos microfluídico de canal de constricción visualizado por microscopía óptica. a) Vista general, la flecha roja indica una burbuja embebida en la zona de entrada. Barra de escala blanca de 500 $\mu$ m. b) Detalle del canal central, barra negra de escala de 100 $\mu$ m. 1) Radio de entrada de 250 $\mu$ m, 2) ancho de 30 $\mu$ m, 3) ancho de 8 $\mu$ m, 4) largo de 250 $\mu$ m.....	15
Figura 16	Histograma de distribución de tamaños de las células THP-1 tomando el diámetro celular en condiciones esféricas.....	61
Figura 17	Promedio del índice de deformación de las células THP-1 al entrar completamente al canal de constricción. Las células fueron tratadas con 50 $\mu$ g/ml de lectina PF2 por 3 h y el control con medio de cultivo. *Diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).....	64
Figura 18	Promedio del tiempo de entrada de las células en la región de constricción. Células tratadas con 50 $\mu$ g/ml de lectina PF2 por 3h y control sin lectina. *Diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).....	65
Figura 19	Promedio de las velocidades de las células THP-1 transitadas por el canal de constricción incubadas por 3 h con 50 $\mu$ g/ml de la lectina PF2 y control. *Diferencia significativa $p < 0.05$ .....	66
Figura 20	Gráfica de velocidades de las células THP-1 por el canal de constricción tratadas con 50 $\mu$ g/mL de lectina PF2 y control sin	

tratamiento en diferentes puntos de la dimensión  $x$ . Perfiles de 67  
velocidad de sección transversal del canal de constricción.....

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Estructura química de los monosacáridos comunes que forman los glicanos. Modificado de Díaz-Fernández, 2020.....	25
<b>Tabla 2.</b>	Valores IC50 de lectinas de leguminosas contra líneas celulares de cáncer.....	52
<b>Tabla 3.</b>	Características del tamaño de las células THP-1.....	61

## RESUMEN

La leucemia monocítica aguda es un tipo de leucemia que afecta a los monocitos de la línea hematopoyética. Las terapias clínicas actuales para la leucemia resultan insatisfactorias debido a los efectos secundarios y la falta de especificidad hacia las células diana. Algunas lectinas muestran actividad antitumoral y pueden reconocer específicamente las células cancerosas al unirse a las estructuras de carbohidratos en su superficie. Por lo tanto, en este estudio se evaluó la respuesta inducida de la lectina PF2 de *Olneya tesota* en la línea celular THP-1 de leucemia monocítica. El efecto antiproliferativo se determinó mediante un ensayo de resazurina. La inducción de apoptosis y de especies reactivas de oxígeno se evaluaron mediante citometría de flujo. La interacción de la lectina PF2 con THP-1 y el potencial de membrana mitocondrial se evaluaron usando microscopía confocal. La genotoxicidad de PF2 se evaluó a través de análisis de fragmentación de ADN en electroforesis en gel. Además, se determinaron parámetros físicos como la deformación, tiempo y velocidad de tránsito de monocitos THP-1 tratados y no tratados con la lectina PF2 mediante un chip microfluídico. Los resultados mostraron que la lectina PF2 fue capaz de unirse a monocitos THP-1 e inducir un efecto antiproliferativo mediante vía apoptótica. PF2 activa mecanismos relacionados con la vía apoptótica como degradación del ADN, pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno en monocitos THP-1. Respecto a las propiedades físicas, PF2 aumentó el índice de deformación y el tiempo de entrada de las células al chip. Además, la velocidad de las células en el canal de constricción fue menor para las que fueron tratadas con PF2. Estos resultados sugieren el potencial de PF2 como una opción para desarrollar tratamientos anticancerígenos alternativos con mayor especificidad. Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar el mecanismo de acción de la lectina PF2 hacia las células cancerígenas.

Palabras clave: leucemia mieloide aguda, células THP-1, lectina PF2, anticancerígeno, microfluídica, apoptosis.

## ABSTRACT

Acute monocytic leukemia is a type of leukemia that affects monocytes in the hematopoietic line. Current clinical therapies for leukemia are unsatisfactory due to their side effects and lack of specificity towards target cells. Some lectins display antitumor activity and can specifically recognize cancer cells by binding to carbohydrate structures on their surface. Therefore, this study evaluated the response of the human monocytic leukemia cell line THP-1 to the lectin PF2 from *Olnya tesota*. The antiproliferative effect was determined using a resazurin assay. Induction of apoptosis and reactive oxygen species were evaluated by flow cytometry. The interaction of lectin PF2 with THP-1 and mitochondrial membrane potential were assessed using confocal microscopy. The genotoxicity of PF2 was evaluated through DNA fragmentation analysis by gel electrophoresis. Additionally, the transit velocity through narrow capillaries of PF2-treated and untreated cells was determined using a microfluidic device. The results showed that PF2 binds to THP-1 cells, triggers apoptosis and DNA degradation, alters mitochondrial membrane potential, and increases reactive oxygen species levels in PF2-treated THP-1 cells. Furthermore, PF2 increases the deformability index, increases entry time, and reduces the velocity of THP-1 cells in the constriction channel. These results suggest the potential of PF2 as an alternative anticancer treatment with greater specificity. However, further studies are needed to elucidate the mechanism of action of the lectin PF2 toward cancer cells.

Keywords: acute myeloid leukemia, THP-1 cells, PF2 lectin, anticancer, microfluidic, apoptosis.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que se unen específicamente a carbohidratos simples o complejos. Su capacidad de reconocimiento hacia carbohidratos las convierte en herramientas importantes en estudios a nivel molecular y celular. Las lectinas actúan como aglutinadoras de eritrocitos y desempeñan un papel esencial en el mecanismo de reconocimiento e interacción celular (Lagarda-Díaz et al., 2017). Las células tumorales suelen presentar un patrón de glicosilación rico en glucanos sialilados, que difiere de lo observado en las células normales. Esta glicosilación anormal juega un papel vital en la proliferación, invasión y migración de células cancerosas (Lityn et al., 2001; Shen et al., 2017). Algunas lectinas pueden unirse a las estructuras de glucano en las células tumorales y ejercer un efecto antiproliferativo. Se ha informado que lectinas aisladas de plantas leguminosas como el género *Vicia*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* y *Pisum sativum* muestran actividad anticancerígena mediante la inducción de la muerte celular por apoptosis (Chan et al., 2016; El-Aassar et al., 2014; Fei Fang et al., 2010; Gupta et al., 2018; Lagarda-Díaz et al., 2017; Nasi et al., 2009). Por lo tanto, detectar el potencial antiproliferativo de nuevas lectinas con capacidades específicas de reconocimiento hacia las células cancerosas puede conducir al desarrollo de terapias dirigidas contra el cáncer.

Por otro lado, algunos tratamientos pueden dirigirse a cambiar las propiedades mecánicas de las células cancerígenas. Las células tumorales y las células normales muestran diferencias en sus propiedades mecánicas, las cuales se relacionan con la capacidad de metástasis que presentan algunos tipos de cáncer. En el caso de las células tumorales que se encuentran en circulación por el torrente sanguíneo, tienen la capacidad de deformarse para infiltrarse en los vasos sanguíneos y formar nuevos focos neoplásicos.

La lectina PF2, aislada de la leguminosa silvestre del desierto de Sonora, *Olneya tesota* (Palo fierro), ha mostrado actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de mama (Acedo-Espinoza, 2020). Por lo tanto, en este estudio se evaluó la respuesta fisicoquímica de la lectina PF2 en las células de leucemia monocítica THP-1. El estudio abarcó el efecto de PF2 a nivel bioquímico (actividad antiproliferativa, inducción de apoptosis, entre otros) y a nivel biofísico mediante la evaluación de las propiedades mecánicas de las células expuestas a la lectina.

# **OBJETIVOS**

## **Objetivo general**

Estudiar fisicoquímicamente el efecto de la lectina PF2 sobre la línea celular monocítica de leucemia aguda humana THP-1.

## **Objetivos específicos**

- Evaluar el reconocimiento biológico de la lectina PF2 hacia células THP-1.
- Determinar el efecto antiproliferativo de PF2 en la línea celular THP-1.
- Evaluar la inducción de apoptosis y necrosis en las células THP-1 expuestas a PF2.
- Evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), fragmentación del ADN y el potencial de la membrana mitocondrial en las células THP-1 expuestas a PF2.
- Determinar el índice de deformación y los perfiles de velocidad de células THP-1 expuestas a la lectina PF2 mediante un dispositivo microfluídico.

# **CAPÍTULO 2**

## **ANTECEDENTES**

### **Lectinas de Plantas**

Las lectinas son proteínas de origen no inmune que se unen de manera reversible y altamente específica a carbohidratos simples o complejos. Durante mucho tiempo, estas proteínas fueron conocidas como hemaglutininas debido a su capacidad para aglutinar glóbulos rojos (Lagarda-Díaz et al., 2017). La actividad biológica de las lectinas se debe principalmente a su interacción con carbohidratos. Las lectinas funcionan como receptores de diversas glicoproteínas en la superficie celular y, aunque algunas de estas proteínas poseen especificidad por estructuras de glicanos similares, presentan diversas actividades biológicas (Sharon y Lis, 2004).

Las actividades biológicas de las lectinas tienen en común el reconocimiento de un receptor oligosacárido, lo cual las convierte en un modelo para el estudio de las interacciones proteína-carbohidrato (Figura 1). El uso de lectinas en el estudio de estas interacciones ha revelado mecanismos de interacción molecular, como el reconocimiento de glicoconjugados presentes en la membrana celular, que están involucrados en muchos procesos de gran importancia para el correcto funcionamiento de la célula, como el tráfico de proteínas, las interacciones ligando-

receptor y el desarrollo del cáncer (Lagarda-Díaz et al., 2017; Cruz et al., 2005).

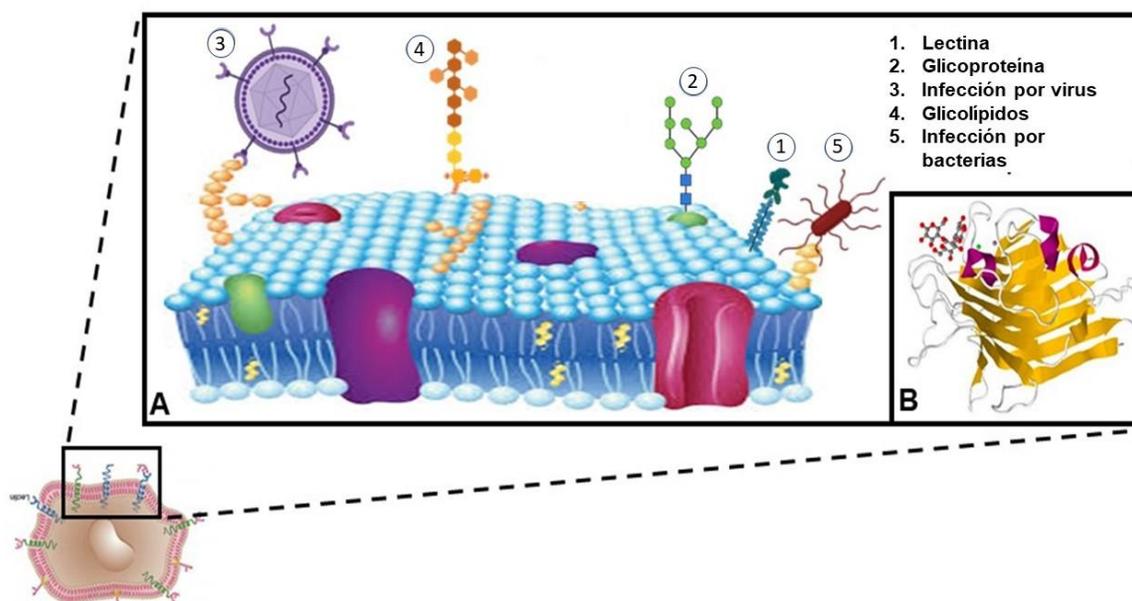


Figura 1. A. interacciones lectina-carbohidrato en la superficie celular presentes en glicoproteínas, infección por virus, glicolípidos e infección por bacterias. B. Estructura general de las lectinas de leguminosas (Modificado de: Sharon y Lis, 2004; Lagarda-Díaz et al., 2017).

## Actividad Antitumoral de las lectinas

En modelos in vitro, las lectinas de plantas han mostrado tener actividad antitumoral en diferentes líneas celulares. Estudios in vivo y pruebas clínicas han demostrado que algunas lectinas vegetales poseen efectos inmunosupresores e inhiben el crecimiento de células tumorales (Pinedo et al., 2017; Procópio et al., 2017). Los carbohidratos presentes en la superficie de células tumorales representan el primer blanco de acción de las lectinas y su unión va a depender del patrón de glicosilación de las células y del tipo de receptor glicosilado al que se unen.

Los mecanismos de acción de las lectinas a nivel molecular en células tumorales son variados y dependen de diferentes factores, como el origen celular, la clase de

tumor, la concentración de lectina y la especificidad de unión a glicoconjugados. Lectinas como la Concanavalina A (Con A), *Bauhinia variegata*, *Galanthus nivalis* (GNA) y Fitohemaglutinina (PHA) han mostrado tener un efecto antiproliferativo sobre células cancerígenas. Algunas lectinas de plantas pueden inducir eventos de apoptosis (muerte celular programada) y/o autofagia en células tumorales, ya sea a través de vías intrínsecas o extrínsecas, en las células cancerosas (Konozy y Osman, 2022 (De Mejía y Prisecaru, 2005). (Xia y Ng, 2006). Además, algunas lectinas pueden tener actividad mitogénica al estimular linfocitos T (Yau et al., 2015).

Las vías de señalización son moduladas de acuerdo con la concentración de lectina utilizada, el tiempo de exposición, así como el tipo de línea celular. Elucidar todos los mecanismos moleculares que controlan la respuesta celular inducida por lectinas abre una nueva perspectiva para su posible uso clínico futuro. Por ejemplo, si se estudia la interacción específica de lectinas hacia glicanos presentes específicamente en células de cáncer sería clínicamente más seguro y esto podría abrir nuevos caminos en la medicina del cáncer basada en lectinas (Huldani et al., 2022).

Algunas lectinas vegetales son útiles como biomarcadores tumorales porque reconocen selectivamente estructuras alteradas de glicanos en células cancerosas. Ese reconocimiento puede resultar en la destrucción de las células dañadas mediante diferentes vías de muerte celular como apoptosis, autofagia y necrosis (Bhutia et al., 2019).

Por ejemplo, Con A puede inducir la muerte celular autofágica y apoptótica en células tumorales al unirse a varios receptores que involucran MT1-MMP, PZR y RTK, modulando sus vías de señalización aguas abajo como PI3K/Akt, JAK/STAT, MAPK y NF- $\kappa$ B (Wang et al., 2019; Huldani et al., 2022). La lectina ConA puede desencadenar apoptosis por vía intrínseca a bajas concentraciones (5  $\mu$ g/ml) y aumentar la producción de ROS a dosis altas (50  $\mu$ g/ml). Cabe señalar que los niveles de ROS no son el factor inductor de apoptosis inicial (Faheina-Martins et al., 2012; Huldani et al., 2022).

Existen receptores de superficie celular glicosilados reportados para algunas lectinas en su mayoría son glicoproteínas integrales en las membranas celulares. Para la lectina Con A los receptores más estudiados son MT1-MMP (Membrane-Type Matrix Metallo Proteinase-1). También se ha reportado la proteína PZR (relacionada con la proteína cero), otro receptor primario, transmembranal de tipo I súper glicosilado con posibles ligandos desconocidos. Las vías de desactivación de los RTK (receptores de tirosina quinasas) son inducidas por Con A (Huldani et al., 2022).

Uno de los grupos de lectinas vegetales más tóxicos es la familia inhibidora de ribosomas (RIP). En especial las lectinas de muérdago (*Viscum álbum*) o ML son las proteínas más investigadas para el tratamiento del cáncer. Las lectinas ML se internalizan en las células e inhiben la síntesis de proteínas a través del daño en la subunidad 28S del ARN ribosomal (Mazalovska et al., 2020). Por lo tanto, la lectina ML es una prueba que las lectinas pueden internalizarse a las células para ocasionar la muerte celular.

Las ML (principalmente referidos a ML-I y ML-II) poseen actividades anti-proliferativas hacia varios tipos de células cancerosas (p. ej., células de leucemia linfoblástica aguda humana y células mielo leucémicas humanas U937) (Fulda y Debatin, 2006; Hoessli y Ahmad, 2008). ML-I posee más sensibilidad a la inducción de apoptosis mediante receptores TNF-1 en células cancerosas (Pryme et al., 2006; Hoessli y Ahmad, 2008). Además, se descubrió que ML-I induce la apoptosis activando la caspasa-8 a través de la vía apoptótica extrínseca, en las células T leucémicas Jurkat (Bantel et al., 1999; Lei-lei Fu et al., 2011).

Los mecanismos de lectinas antitumorales han sido dilucidados a diferentes niveles moleculares (Figura 2). Por ejemplo, algunas lectinas de leguminosas pueden activar receptores glucosilados de las superficies celulares, receptores FAS-FADD que activan secuencialmente la vía de las caspasas y a las proteínas MMP. Las lectinas B de ricina activan diferentes rutas de muerte celular programada. La lectina GNA activa la ruta de EGFR donde interviene el receptor del factor de crecimiento epidérmico.

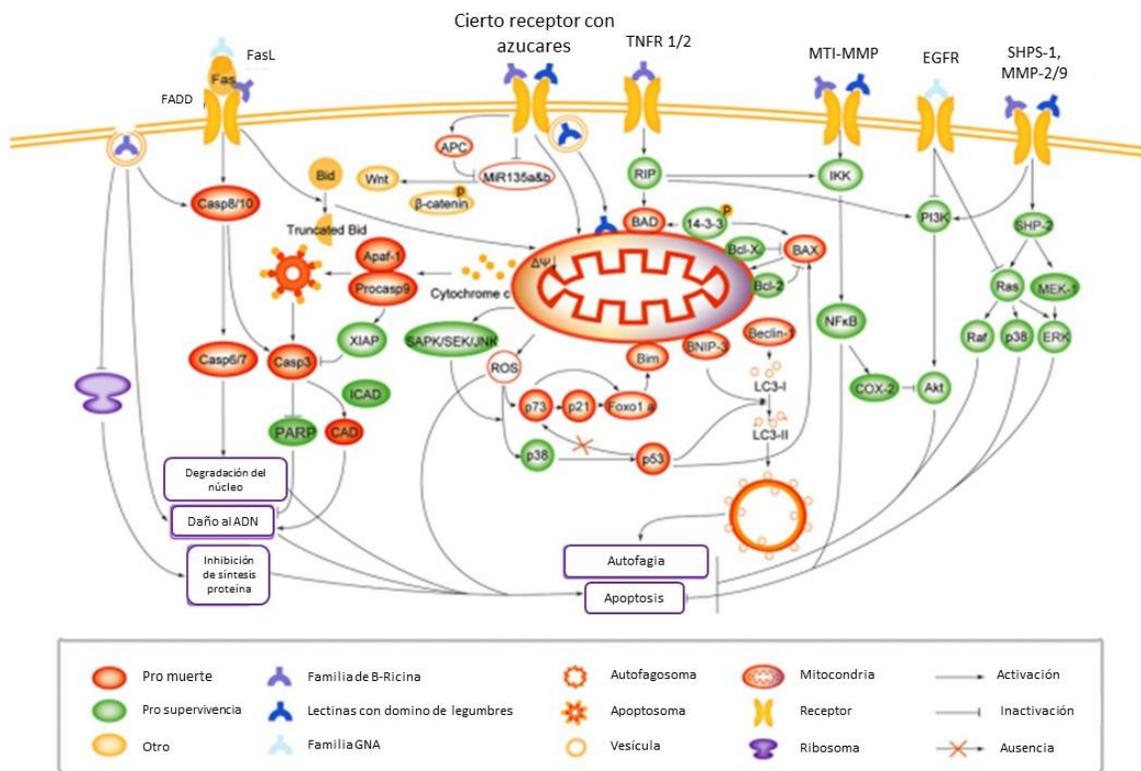


Figura 2. Las lectinas vegetales inducen la muerte de células cancerosas a través de la red de señalización de muerte celular programada. Tomado de Fu Lei-Lei et al., 2011.

Por otro lado, a nivel clínico, la terapia con lectinas de muérdago (FME) es el tratamiento complementario utilizado en pacientes con melanoma maligno en Alemania y Suiza. Un estudio con pacientes con melanoma primario (MM) en estado II y III tratados con FME como terapia adyuvante mostró mayor supervivencia, menor grado de metástasis cerebral y reducción del tumor en los pacientes tratados. (Augustin et al., 2005).

La familia de lectinas de leguminosas es una de las clases más investigadas debido a sus importantes actividades biológicas. En especial el estado de Sonora es rico en abundancia de especies de leguminosas. Por ejemplo, *Olneya tesota* (Palo fierro), *Prosopis glandulosa* Torrey (mezquite), *Acacia farnesiana* (vinorama), *Acacia occidentalis* Rose (Tésota) *Pithecellobium sonorae* S. Watson (Tamarindo), entre otras (Lagarda Diaz et al., 2017; Solis-Garza et al., 2017; Huldani et al., 2022).

En este trabajo se trabajó con la lectina PF2 de Palo fierro, por lo que la siguiente sección se abordaran algunas de sus características.

## Lectina de Palo Fierro PF2

La lectina PF2 es una proteína extraída de las semillas de una leguminosa desértica endémica del Desierto de Sonora, comúnmente conocida como Palo fierro (*Olneya tesota*) (Figura 3). PF2 es una proteína tetramérica con subunidades de 33 kDa que reconoce carbohidratos complejos, como los presentes en fetuína (Vazquez-Moreno et al., 2000).



Figura 3. Palo fierro (*O. tesota*). Fuente: CONANP y CONABIO.

La secuencia del extremo amino-terminal y algunas secuencias internas de la lectina PF2 muestran una alta similitud con la lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA), con una identidad del 90.7% con PHA-E y 88.9% con PHA-L (Acedo-Espinoza et al., 2020). Tanto PF2 como PHA forman tetrámeros y tienen subunidades de masa similar, sin

embargo, presentan diferentes especificidades de reconocimiento a carbohidratos, PF2 reconoce oligosacáridos con estructuras complejas del tipo triantenario tetrasialilado, mientras que PHA-E y PHA-L reconocen estructuras del tipo biantenarias y tetrantenarias, respectivamente (Figura 4) (Vázquez-Moreno et al., 2000). La afinidad por carbohidratos que tienen estas lectinas es de gran importancia para conocer el potencial que tienen como agentes anticancerígenos. En ese sentido, el conocimiento relacionado con el patrón de glicosilación de células tumorales es un aspecto clave para comprender el efecto de las lectinas en células tumorales. En el siguiente apartado se abordará la glicosilación y sus cambios en células tumorales

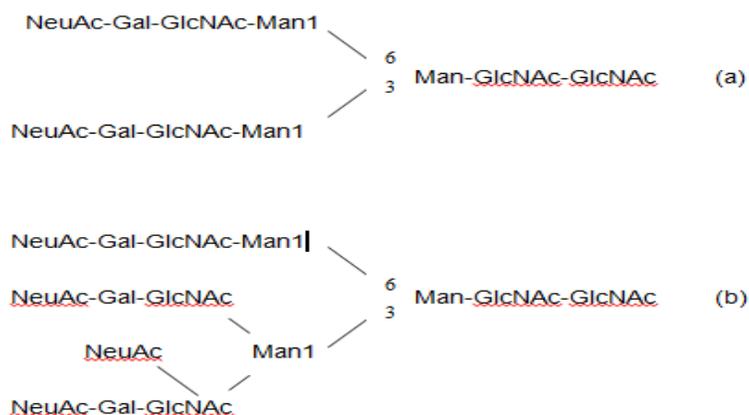


Figura 4. Estructuras de los oligosacáridos complejos de la fetuina reconocidos por (a) PHA-E y por PF2 (b). (Urbano-Hernández, 2007).

## Glicosilación

La glicosilación es el proceso de unión mediante enlaces glucosídicos entre carbohidratos, proteínas, lípidos o moléculas de ADN, y a esta formación se conoce como glicoconjugados. Las glicoproteínas y glicolípidos están involucrados en procesos biológicos como la secreción de proteínas, adhesión, migración e

interacción huésped-patógeno. Una incorrecta glicosilación en los sitios específicos de los glicoconjugados conduce a ciertas patologías, como síndromes metabólicos, diabetes, neurodegeneración, aterosclerosis y cáncer. Comprender el papel de las diferentes estructuras de glicanos en presencia de células cancerosas y normales ayudaría a la producción de compuestos farmacológicos dirigidos a la gran biodiversidad de glicanos específicos (Kyoung Song et al., 2020).

La glicosilación proteica es la glicosilación más abundante en los sistemas biológicos. Este proceso confiere estabilidad ante las modificaciones fisicoquímicas del medio y contribuye al plegamiento de proteínas (Freire et al., 2002). Además, interviene en diferentes procesos biológicos, como la diferenciación celular, la interacción ligando-receptor y la invasión del cáncer (Hanisch, 2001; Hang y Bertozzi, 2005). Los oligosacáridos presentes en las superficies celulares pueden ser objeto de estudio para generar aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, la lectina anti-H de *Ulex europaeus* se usa para identificar glicanos de los tipos sanguíneos A, B y O en la especie humana (Jimenez-Movilla, 2005). Los diez monosacáridos más comunes que forman glicoconjugados son D-galactosa, D-manosa, L-fucosa, N-acetil-D-galactosamina, D-xilosa, N-acetil-D-glucosamina, ácido D-glucurónico, ácido L-idurónico y ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico (Tabla 1) (Díaz Fernández, 2020). Se sabe que, al unirse a proteínas, están involucrados en una amplia gama de funciones esenciales en la biología de las células (Cuello, 2020).

Tabla 1. Estructura química de los monosacáridos comunes que forman los glicanos. Modificado de Díaz-Fernández, 2020.

<p><b>Galactosa</b></p>	<p><b>D-glucosa</b></p>	<p><b>Manosa</b></p>	<p><b>L-fucosa</b></p>
<p><b>L-acetilgalactosamina</b></p>	<p><b>N-acetilglucosamina</b></p>	<p><b>D-xilosa</b></p>	<p><b>Ácido glucurónico</b></p>
<p><b>Ácido idurónico</b></p>		<p><b>Ácido siálico</b></p>	

Los glicoconjugados más abundantes son las glicoproteínas. Se estima que más del 50% de todas las proteínas humanas están glicosiladas (Alberto Aguilar, 2016; Apweiler et al., 1999). Existen dos tipos de glicoproteínas, dependiendo de la interacción del carbohidrato con el aminoácido: las O-glicoproteínas y las N-glicoproteínas. En las O-glicoproteínas, el carbohidrato se une al grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos serina y treonina de la proteína. En las N-glicoproteínas, el carbohidrato se une al grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparagina de la proteína. El residuo de asparagina puede aceptar un oligosacárido solo si forma parte de una secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. De esta manera, los sitios potenciales de glicosilación se pueden localizar conociendo la secuencia de los aminoácidos (Engelking, 2015).

En el cáncer, las glicoproteínas de la superficie celular experimentan cambios estructurales dramáticos durante la progresión tumoral. Estas moléculas resultantes alteran propiedades importantes de las células cancerosas, facilitando su migración

o afectando su reconocimiento por las células del sistema inmune, lo que favorece la progresión del cáncer. La glicosilación desregulada de proteínas se ha relacionado con varias enfermedades, incluidas aquellas en las que las células anormales se dividen sin control (Bertozzi y Sasisekharan, 2009).

Algunas glicoproteínas son biomarcadores para tipos de cáncer. Por ejemplo, el antígeno AC 19-9 es marcador para cáncer de páncreas, el antígeno AC 15-3 para cáncer de mama, el antígeno prostático PSA para cáncer de próstata, entre otros. El antígeno carcinoembrionario (CEA) se encuentra altamente N-glicosilado en cáncer colorrectal, de vejiga, de mama, de páncreas y de pulmón (Moertel et al., 1993; Hammarström, 2009). Por otro lado, la lectina PHA-L es un marcador selectivo para células de cáncer de mama, ya que se une específicamente a este tipo de células y no a células sanas (Kailemia et al., 2016).

La alteración más aberrante que se presenta en células de cáncer en función de la glicosilación es la incorporación de ácidos siálicos. En el padecimiento de cáncer se observa una sobreexpresión de glicoproteínas ricas en ácidos siálicos. Los residuos de ácidos siálicos aportan numerosas cargas negativas a las proteínas, protegiéndolas de la acción de las proteasas. Además, el ac. siálico es un importante indicador en el aclaramiento de proteínas, se ha reportado que su presencia indica si las glicoproteínas continúan en circulación o son removidas (López Laredo, 2005).

Se ha reportado que las células cancerosas incrementan la sialilación terminal total de la superficie de los tri o tetra N-glicanos ramificados, principalmente en etapas iniciales de la carcinogénesis. Los ácidos siálicos son usualmente encontrados en los residuos terminales de O y N- glicanos de glicoproteínas y glicolípidos (Toscano, 2006). Dado que la lectina PF2 reconoce carbohidratos complejos como los presentes en la fetuína, una glicoproteína rica en ácido siálico. PF2 puede dirigirse a células cancerosas ricas en glicoproteínas aberrantes con ácido siálico. Sin embargo, es necesario estudiar los receptores de las células cancerígenas a las cuales que se desee dirigir la lectina y también la especificidad de unión.

## **Leucemia Mieloblástica Aguda**

La leucemia aguda es una forma de cáncer caracterizada por una proliferación clonal de progenitores hematopoyéticos inmaduros, conocidos como mieloblastos, que pierden su capacidad de diferenciación y de respuesta a los reguladores de proliferación. La ocupación de la médula ósea por los mieloblastos produce un bloqueo en la producción de células sanguíneas, lo que resulta en una deficiencia de glóbulos rojos (anemia), plaquetas (trombocitopenia) y glóbulos blancos (especialmente neutrófilos, es decir, neutropenia) (Estey, 2006; Suela-Rubio, 2008).

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia maligna caracterizada por la proliferación anormal de células mieloides que se infiltran en la médula ósea, la sangre periférica y otros tejidos (De Kouchkovsky y Abdul-Hay, 2016; Stone et al., 2004). La LMA causa insuficiencia medular e infiltración extramedular de células cancerosas en el bazo, el hígado, la piel, las encías y el sistema nervioso central, lo que provoca la formación de nuevos focos neoplásicos (Leyto-Cruz, 2018; Aguilar López et al., 2010). Es una enfermedad especialmente agresiva, con una tasa de supervivencia a los cinco años que no supera el 40% de los casos a pesar del tratamiento. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas herramientas que predigan eficazmente el pronóstico de la enfermedad al momento del diagnóstico y el tratamiento (Suela-Rubio, 2008).

Entre las consecuencias de la LMA se encuentra la formación de proteínas quiméricas que perturban el proceso normal de maduración de los precursores mieloides, como los monocitos, y ocasionan mutaciones en genes relacionados con la proliferación y diferenciación celular (Patel et al., 2012; Weinstein et al., 2003). Estudios basados en modelos de leucemogénesis en animales han mostrado una activación de vías proinflamatorias, así como errores en la diferenciación hematopoyética. Además, se han identificado mutaciones en genes relacionados con la metilación del ADN, como DNMT3A, TET2, IDH-1 e IDH-2, que pueden encontrarse en el 40% de los casos de LMA (De Kouchkovsky y Abdul-Hay, 2016).

Entre los diversos factores moleculares identificados, se pueden mencionar las mutaciones en algunos genes. Las mutaciones relacionadas con la activación de la señalización de FLT3 favorecen la proliferación de blastos. Por otro lado, las mutaciones en el gen supresor tumoral TP53 se encuentran en aproximadamente el 8% al 14% de los casos de LMA y están asociadas con casos documentados de resistencia a la quimioterapia (Haferlach et al., 2008; Döhner et al., 2005).

## **Tratamientos**

El tipo de terapia más apropiada se determina en función de los objetivos planteados con el tratamiento, el tipo de tumor, su extensión y las condiciones del paciente, como su estado funcional, edad y patología. La radioterapia se basa en el efecto producido por las radiaciones ionizantes. En dosis altas, la radioterapia destruye las células cancerosas o ralentiza su crecimiento al dañar su ADN. Las células cancerosas cuyo ADN está irreparablemente dañado dejan de dividirse o mueren. Cuando las células dañadas mueren, se descomponen y el cuerpo las elimina. La radioterapia se utiliza como tratamiento exclusivo en aproximadamente el 30% de los casos de cáncer y, en su mayoría, se aplica en combinación con otras terapias en alguna fase de la enfermedad. La radioterapia es costosa, requiere máquinas complejas e implica la participación de numerosos profesionales médicos. Además de destruir o ralentizar el crecimiento de las células cancerosas, también puede afectar a las células sanas del paciente. El daño a las células sanas puede ser irreversible e incluso causar efectos secundarios (Alberro y Rosas, 1997; NIH, 2019).

La quimioterapia es un tipo de tratamiento que utiliza fármacos para destruir las células cancerosas. Tiene un papel limitado en el tratamiento primario del cáncer localizado, siendo fundamental en el tratamiento de los tumores diseminados, en los cuales la cirugía y la radioterapia tienen un valor limitado (Cajaraville et al., 2002).

El tratamiento del cáncer diseminado incluye varias situaciones clínicas. Los cánceres que se consideran de amplia diseminación son la mayoría de las neoplasias hematológicas, como las leucemias y algunos linfomas. En estos casos, la quimioterapia se utiliza como tratamiento primario con la intención curativa o de prolongar la supervivencia. Los cánceres que, aunque parecen localizados, pueden haber desarrollado micrometástasis clínicamente indetectable, requieren terapia sistémica en un intento de erradicar la metástasis y aumentar el porcentaje de curación después de la cirugía o la radioterapia (Balmer y Finley, 1998; ACS, 2016).

La quimioterapia ocasiona daños a las células sanas y produce efectos secundarios, como úlceras en la boca, náuseas, vómitos, caída del cabello, pérdida de apetito, sequedad en los ojos, diarrea y daños al corazón, lo que acarrea otras complicaciones clínicas. En ocasiones, la quimioterapia puede causar más daño que la misma enfermedad (ACS, 2016). El estudio de terapias biológicas ha permitido plantear nuevas alternativas en la cura del cáncer, ayudando a reducir los efectos secundarios.

La terapia biológica, también conocida como bioterapia, modificación de la respuesta biológica o inmunoterapia, son distintos los términos utilizados para denominar enfoques terapéuticos anticancerosos que pretenden modificar o potenciar las defensas naturales y la respuesta inmune del paciente frente al tumor. La terapia biológica ha surgido como la cuarta modalidad terapéutica del cáncer, impulsada por el conocimiento de la biología tumoral, el control de la proliferación y la diferenciación de las células normales y neoplásicas. El desarrollo de la biotecnología y la terapia génica, que han generado moléculas o mecanismos activos en procesos biológicos, ha contribuido al avance de esta nueva estrategia terapéutica (Biological Response Modifiers, 1997).

En este sentido, las plantas han sido una fuente valiosa de moléculas con importantes propiedades biotecnológicas. En el cáncer, la acción inhibitoria de productos naturales derivados de plantas ha sido confirmada en diferentes modelos de tumores animales y ha permitido enfocarse en la búsqueda de estrategias de prevención que involucren el uso cotidiano de estos productos naturales en la dieta.

En particular, las lectinas de plantas han recibido especial atención debido a sus diversas actividades biológicas, entre las cuales se encuentra la actividad anticancerígena (Lagarda-Diaz et al., 2017).

## **Células tumorales**

Una célula sana (CS) puede convertirse en una célula cancerosa (CC), pero una CC no puede convertirse en una CS. Las CC tienen cuatro características esenciales: son clonales, cada tumor maligno se origina a partir de una única célula que prolifera y da lugar a un clon de células malignas; autonomía, el crecimiento y desarrollo de las CC no está regulado adecuadamente por los moduladores hormonales y bioquímicos normales; anaplasia, las células tumorales experimentan una pérdida de diferenciación celular. En general, cuanto mayor sea el grado de anaplasia de un tumor, mayor será su potencial metastásico y más intensa será su diseminación y metástasis, (Mitrus et al., 2012; Cajaraville et al., 2002).

Las células cancerosas, cuya carga genética ha cambiado, pueden morir o ser eliminadas en los ganglios linfáticos. Sin embargo, en ocasiones, estas células malignas continúan vivas y se reproducen. Las células malignas presentan características diferentes, ya sea en su forma o en sus núcleos, como ser más grandes o pequeños. Estas células son incapaces de desempeñar las funciones correspondientes a las células del tejido al que pertenecen. Además, se multiplican rápidamente debido a la falta de un mecanismo de control del crecimiento. Por lo general, son inmaduras, ya que se multiplican rápidamente y no tienen suficiente tiempo para crecer completamente antes de dividirse. Al formarse un gran número de CC, se acumulan, ejercen presión o bloquean los vasos sanguíneos, lo que impide que realicen su trabajo. Dado que no se limitan al espacio de origen, se dice que son invasivas y tienden a migrar a otras áreas a través de la sangre o los ganglios linfáticos (Cajaraville et al., 2002; SEOM, 2019).

Las células cancerosas inhiben la apoptosis, un fenómeno que lleva a la muerte celular. La disminución del número de células ocurre principalmente por apoptosis, un mecanismo normal que mantiene la homeostasis tisular. La apoptosis es desencadenada por diversos estímulos que convergen en vías moleculares comunes y culminan con la activación de un grupo de cisteínas proteasas llamadas caspasas, encargadas de la degradación celular hasta formar pequeños corpúsculos (cuerpos apoptóticos) que son fagocitados por otras células (Elmore, 2007). Con base en lo anterior, surge la teoría de que las células tumorales tienen un potencial ilimitado de replicación, conocido como inmortalidad.

El estudio de las células cancerosas, tanto a nivel celular, molecular y genético, ha permitido mejorar significativamente el manejo de los diversos aspectos clínicos de esta enfermedad, como el crecimiento tumoral, la metástasis y los antecedentes que permiten predecir la sensibilidad a diferentes tipos de terapia. Varios de los efectos secundarios de los tratamientos convencionales del cáncer están asociados con cambios en las propiedades mecánicas de las células (Pachenari et al., 2014; Suresh et al., 2004).

## **Propiedades Mecánicas**

Las propiedades mecánicas de las células están relacionadas con las fuerzas exteriores que se ejercen sobre ellas. Estas propiedades mecánicas incluyen elasticidad, plasticidad, maleabilidad, ductilidad, dureza, tenacidad y fragilidad. Los parámetros evaluados en las células son la elasticidad, deformación y tensión, y también sirven como indicadores para evaluar la progresión de algunas enfermedades. Se han desarrollado herramientas para la nanobiomecánica, como pinzas ópticas, aspiración de micropipetas, citometría de torsión magnética, microscopía de fuerza atómica y microfluídica, que se utilizan para caracterizar las propiedades mecánicas de las células sanas y enfermas (Kee y Robinson, 2013; Lekka, 2016).

Ya existen una serie de estudios que se enfocan únicamente en las propiedades mecánicas de las células afectadas y sanas, encontrando descubrimientos muy prometedores. En el caso de la Anemia Falciforme, una enfermedad que afecta a los glóbulos rojos, se observó una mayor rigidez y citoadherencia en las células enfermas en comparación con las sanas, lo que provoca obstrucción en las venas y limitación de oxígeno en órganos y tejidos. Lim et al. (2006) estudiaron el efecto de la hidroxiurea, un medicamento antitumoral, y encontraron que los glóbulos rojos afectados presentan las mismas características mecánicas que los sanos después de estar en contacto con el fármaco durante 6 meses. Las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos infectados con malaria tienen una rigidez mayor que los glóbulos sanos, así como un aumento en su citoadherencia, y a medida que la enfermedad avanza, estos dos parámetros aumentan. Esto demuestra la relación entre las propiedades biomecánicas y la enfermedad de la malaria (Lim et al., 2006).

Por su parte Chen et al., 2020 utilizaron microscopía de fuerza atómica (AFM) para medir las propiedades viscoelásticas de las células de cáncer de ovario. Se encontró que la elasticidad y la viscosidad de las células de cáncer de ovario OVCAR-3 y HO-8910 son significativamente más bajas que las de las células epiteliales de control de la superficie ovárica humana (HOSEpiC). Además, se observó un aumento significativo en la elasticidad de las células OVCAR-3 y HO-8910 después del tratamiento con el compuesto anticancerígeno echinomicina (Ech), mientras que no se encontraron cambios en las células HOSEpiC después del tratamiento con Ech. También, se observó un aumento en la elasticidad (calculado con el modelo Hertz a partir de los datos de AFM) asociado con una disminución en la invasión de las células OVCAR-3 y HO-8910 después del tratamiento con Ech. Estos hallazgos demuestran claramente la asociación entre las propiedades viscoelásticas y la invasión de las células de cáncer de ovario. De esta manera, las propiedades mecánicas de las células podrían servir como indicador en la progresión de enfermedades y del diagnóstico temprano del cáncer (Chen et al., 2020).

Existe una estrecha relación entre la progresión del cáncer y el cambio de las propiedades mecánicas de las células (Ciasca et al., 2016). Estas propiedades

mecánicas se utilizan para determinar el potencial tumorigénico y metastásico de las células, y están fuertemente asociadas con la transformación celular, la migración y la invasión (Kim et al., 2016). Por lo tanto, es posible detectar biomecánicamente las células enfermas. Las propiedades biomecánicas en células cancerígenas pueden servir como biomarcadores para evaluar la progresión del cáncer. Estudios anteriores han encontrado características patofisiológicas distintivas, como la mayor elasticidad de las células cancerígenas en comparación con las células sanas (Rodríguez, 2013).

Desde el punto de vista oncológico, las células sanas y malignas presentan características diferentes, como diferencias en el crecimiento, morfología, interacción célula-célula, glicosilación, así como cambios en la estructura del citoesqueleto (Lekka, 1999). Estos aspectos que distinguen a las células malignas de las sanas presumiblemente han ocasionado cambios en sus propiedades mecánicas. Estudios recientes en fisiopatología de diversas enfermedades sugieren que su origen puede estar relacionado con alteraciones en las propiedades estructurales o mecánicas de las células, así como en la mecano-transducción, que convierte los estímulos mecánicos en señales químicas a través de la distorsión de la membrana (Lim, 2006). Si una célula malinterpreta una señal mecánica o se encuentra en un entorno anormal, su ciclo normal se interrumpe y surge la enfermedad (Rodríguez, 2013). El conocimiento de las características y propiedades de las células sanas y enfermas, seguido de su comparación, permitirá identificar las propiedades mecánicas alteradas, lo que a su vez facilitará la comprensión física de este fenómeno y el desarrollo de fármacos que ayuden a restaurar las propiedades normales de las células y promuevan su curación.

## **Microfluídica**

La microfluídica es la ciencia que estudia el comportamiento de los fluidos a escala micro y nanométrica y una de sus aplicaciones es el estudio de las propiedades mecánicas de células. La microscopía de fuerza atómica es la técnica de oro para

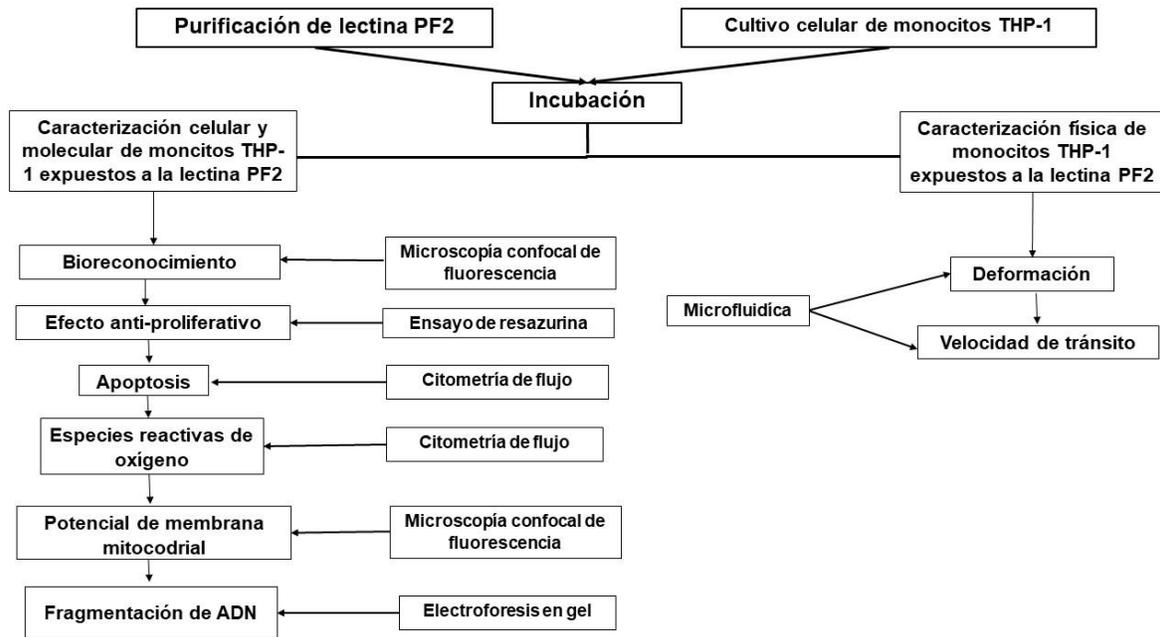
medir propiedades mecánicas en las células, pero necesita equipo costoso y se ocupa de sondas específicas. También, el aspirador de micropipeta mide las propiedades viscoelásticas de las células completas al succionar. Sin embargo, ambos métodos están limitados por su bajo rendimiento ya que cada experimento consiste en una célula. Los dispositivos microfluídicos pueden detectar células raras y ayudar al diagnóstico de enfermedades (Yao Chen et al., 2023).

Los microfluidos son una tecnología versátil y prometedora que pueden ser utilizados para el avance en el estudio de enfermedades como el cáncer, así como para detección y aislamiento de células tumorales circundantes (Kozminsky, et al., 2016). Esto debido a las varias aplicaciones que tiene esta tecnología, así como su alta eficiencia, bajo costo de producción, fácil manufactura (Hou., et al 2011). El funcionamiento de los microfluidos para el estudio de células está basado en aprovechar las diferencias en propiedades físicas y químicas entre las células. Esto mediante un campo de fuerzas en el microfluido dependiente de las diferencias en las propiedades de las células como tamaño, densidad y compresibilidad.

La microfluídica brinda a los médicos y biólogos celulares importantes resultados para que comprendan la citometría en los campos del diagnóstico de enfermedades y el análisis en la incorporación de moléculas y detección de fármacos.

# CAPITULO 3

## ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



## MATERIALES

Semillas de palo fierro (*Olneya tesota*), solución salina, inhibidor de proteasas, papel filtro, columna cromatográfica de agarosa-fetuina, glicina-HCl (0,02 M, pH 2,5), PBS (solución salina tamponada con fosfato,  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  20 mM, NaCl al 0,9 % y  $\text{NaN}_3$  al 0,02 %, pH 7,2) y membranas de diálisis, filtros de proteínas de baja unión de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore). Monocitos humanos THP-1 derivados de un paciente con leucemia monocítica aguda ATCC (Manassas, VA, EE. UU.), medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), suero fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich) y antibiótico al 1 % (100 U/mL de penicilina y 100 g/mL de estreptomicina) (Thermofisher Scientific). Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich), lectina PF2, dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich), columna Sephadex G25. Resazurina (Sigma-Aldrich). Kit de detección de apoptosis de anexina V FITC con PI (BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.). Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCHF-DA) (Sigma-Aldrich). Rodamina 123 (Rho 123) (Sigma-Aldrich). Tampón de lisis TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA sódico 1 mM, pH 7,5, Triton X-100 al 0,25 % y ARNasa A al 0,2 %), proteinasa K (Sigma-Aldrich), agarosa, tinción Gel-Red (Biotium, EE. UU.). Chip de polidimetilsulfoxido, tripsina (Sigma-Aldrich), ácido etilendiaminotetraacético EDTA (Sigma-Aldrich), solución salina.

# MÉTODOS

## Purificación de lectina PF2.

La lectina PF2 fue purificada de acuerdo con lo establecido por Vázquez-Moreno et al.2000. Las semillas de *O. tesota* se pulverizaron y desengrasaron con hexano. El extracto crudo se inyectó en una columna cromatográfica de agarosa-fetuina. Las fracciones con proteínas que no se unieron a la columna se lavaron con PBS. Las proteínas retenidas se obtuvieron con glicina-HCl (0,02 M, pH 2,5) y se neutralizaron con Trizma base 1 M, pH 8. Las fracciones se dializaron contra agua a 4 °C, se liofilizaron y se almacenaron a -10 °C hasta su uso.

## Cultivo de la línea celular THP-1

Los monocitos humanos THP-1 derivados de un paciente con leucemia monocítica aguda se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA, EE. UU.). Los monocitos THP-1 se cultivaron a  $5 \times 10^5$  células/ml en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % (Sigma-Aldrich) y antibiótico al 1 % (100 U/ml de penicilina y 100 g de /ml de estreptomina) (Thermofisher Scientific) a 37 °C en condiciones humidificadas con 5 % de CO<sub>2</sub>.

## Tratamientos de monocitos THP-1 con la lectina PF2

Para evaluar los efectos de PF2 en las células THP-1, las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de PF2 (200, 100, 50, 25 y 12,5 µg. /mL) en medio RPMI con FBS al 1%. Previamente las soluciones de lectina fueron filtradas a través de un filtro con un corte de 0.22 µm 0. (Millipore). La concentración de proteína fue estimada por medición de la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

# **Caracterización celular y molecular de monocitos THP-1 expuestos a la lectina PF2**

## **Bio-reconocimiento**

Previo al experimento, la lectina PF2 fue marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se mezclaron 0,5 ml de FITC (0,4 mg/ml de DMSO) con 2 mg de lectina PF2. Después de una incubación de 3 h en la oscuridad a temperatura ambiente, el complejo de lectina FITC-PF2 se pasó a través de una columna Sephadex G25 equilibrada con PBS. La actividad de PF2 en las fracciones lavadas se verificó mediante ensayos de hemaglutinación.

Para el ensayo de bio-reconocimiento, las células THP-1 se sembraron en microplacas de 48 pozos a una densidad de 10000 células/ml por pozo en medio RPMI al 1 % de FBS y se incubaron con 10 µg/ml de lectina PF2-FITC durante 1 h. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS y se observaron en un microscopio confocal (Nikon TiEclipse C2+, Japón). Las imágenes fluorescentes se capturaron con un láser de 488 nm con un aumento de 20x.

## **Actividad antiproliferativa**

Las células THP-1 con una viabilidad superior al 97% fueron sembradas en microplacas de 96 pozos a una densidad de 5000 células/pozo e incubadas con diferentes concentraciones de PF2 durante 3 h. Las células no tratadas se usaron como control negativo. Se utilizó el ensayo colorimétrico de resazurina para determinar la viabilidad celular frente a un control no tratado (Giordano et al., 2004). Después de la incubación, se realizaron lecturas a 570 nm y 600 nm en un lector de placas Multi-Modal de Microplacas Synergy HTX. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado y se obtuvieron los porcentajes medios de viabilidad celular  $\pm$  SD. Los datos obtenidos se sustituyeron en la ecuación para determinar el porcentaje de viabilidad celular:

$$\frac{(O_2 \cdot A_1) - (O_1 \cdot A_2)}{(O_2 \cdot P_1) - (O_1 \cdot P_2)} \times 100$$

Ecuación 1. Cálculo de porcentaje de viabilidad celular por método de resazurina

Donde: P<sub>1</sub> (570nm): Control (Sin lectina)

P<sub>2</sub>(600nm): Control (Sin lectina)

A<sub>1</sub> (570nm):Tx (□ Lectina)

A<sub>2</sub>(600nm): Tx (□ Lectina)

O<sub>1</sub>(600nm):117 216

O<sub>2</sub> (570nm): 80 586

## Inducción de apoptosis

La inducción de apoptosis por lectina la PF2 en células THP-1 se evaluó utilizando el KIT de detección de apoptosis de anexina V FITC con yoduro de propidio PI (BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células THP-1 se sembraron en una microplaca de 48 pozos y se incubaron con diferentes concentraciones de PF2 durante 3 h. Después, las células fueron recuperadas por centrifugación a 800 rpm por 7 min y se realizaron tres lavados con PBS. Posteriormente, las células se incubaron con PI y anexina en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las muestras se analizaron usando un citómetro de flujo BD FACS Verse TM (BD Biosciences, NY). Se realizaron tres experimentos independientes realizados por triplicado. La tinción de anexina V e yoduro de propidio (PI) se evaluó por FITC-A y PE-A, respectivamente. Los datos obtenidos fueron los porcentajes de células con tinción positiva para anexina V y PI. Los valores de IC50 se calcularon considerando los porcentajes de células viables.

## **Determinación de especies reactivas de oxígeno (ensayo ROS).**

La detección de especies reactivas de oxígeno (ERO) también se realizó por citometría de flujo. Se sembraron células THP-1 ( $1 \times 10^4$  células/pocillo) en placas de 48 pozos bajo las mismas condiciones y tratamientos previos. Después de la incubación con la lectina, las células fueron recuperadas por centrifugación, se lavaron con PBS y se incubaron con  $10 \mu\text{M}$  de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCHF-DA) durante 30 min a temperatura ambiente. El DCHF-DA es desacetilado por la esterasa intracelular y convertido en 2',7'-diclorohidrofluoresceína no fluorescente (H2-CDF), que se oxida rápidamente al compuesto altamente fluorescente 2',7'-diclorohidrofluoresceína (DCF) en presencia de ROS. La fluorescencia se cuantificó usando un citómetro de flujo BD FACS Verse TM (BD Biosciences, NY). Para los ensayos de detección de ROS, se consideraron dos réplicas técnicas y los resultados se expresaron como niveles relativos de acumulación de ROS.

## **Análisis del potencial de membrana mitocondrial**

Se sembraron monocitos THP1 en placas de 48 pocillos a una densidad de 10.000 células por pocillo con las mismas condiciones y tratamientos previos. Los monocitos fueron recolectados, lavados con PBS e incubados con  $1 \mu\text{g/mL}$  de rodamina 123 (Rho 123) durante 15 min a  $37^\circ\text{C}$ . Rho 123 se utilizó como una sonda fluorescente para evaluar el potencial de membrana de las mitocondrias. La acumulación de Rho 123 en las mitocondrias esta relacionada con la viabilidad celular. La fluorescencia se analizó por microscopía confocal (Nikon TiEclipse C2+, Japón) con láseres de 488 nm. Las imágenes obtenidas con una resolución de  $1024 \times 1024$  píxeles y un aumento de 20X se analizaron con el software de imágenes NIS-Element.

## **Ensayo de fragmentación de ADN**

La fragmentación del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa siguiendo el procedimiento de Park y Paul (1998). Se trataron aproximadamente 8000 células con 10 µg/mL de lectina PF2 durante 6 h. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se sedimentaron por centrifugación. Las células recuperadas fueron incubadas con buffer de lisis TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA sódico 1 mM, pH 7,5, Triton X-100 al 0,25 % y ARNasa A al 0,2 %), durante 20 min a 37 °C. Después se añadira proteinasa K al 0,2 % (Sigma Chemical) y se incubó durante 20 min más. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,8 % y teñidas con Gel-Red (Biotium, EE. UU.). La visualización del ADN se realizó bajo luz ultravioleta en un transiluminador UVP (Upland, CA) con el sistema de imágenes Kodak Gel Logic 100.

# **Caracterización física de monocitos THP-1 expuestos a la lectina PF2**

## **Fabricación de chip microfluídico**

Los chips fueron elaborados en el laboratorio Nacional de soluciones biomiméticas para diagnóstico y terapia de la UNAM con el protocolo que se describe a continuación. Los moldes maestros para el chip de microfluídica se fabricaron mediante el proceso de litografía laser sin mascara, con resina fotosensible IP-S sobre un sustrato de vidrio recubierto con una película de Óxido de indio y estaño (ITO), el chip se hizo de una resina de polidimetilsiloxano (PDMS). El diseño consistió en un canal central de constricción de 8  $\mu\text{m}$  de ancho y 250  $\mu\text{m}$  de largo, además el canal de relajación de 250  $\mu\text{m}$  de largo y 30  $\mu\text{m}$  de ancho hacia la salida, la profundidad del chip fue de 30  $\mu\text{m}$ . Los canales de PDMS se unieron a un portaobjetos de vidrio después del tratamiento con plasma de aire usando un limpiador de plasma.

## **Tamaño de Diámetro celular**

La distribución del diámetro celular de monocitos THP-1 se obtuvo mediante el análisis de micrografías en el software imageJ. Las imágenes de las células se obtuvieron mediante microscopía óptica (Olympus IX71). Para cada experimento se revisó la viabilidad celular mediante azul de tripano.

## **Configuración experimental del chip microfluídico.**

El chip microfluídico se rellenó con Etanol al 70% y se dejó 15 minutos en luz UV para ser esterilizado. Después se montó en un microscopio invertido (Olympus IX71), la entrada del chip se conectó a una bomba de jeringa y la salida a una manguera con un reservorio final. Como primer paso y para evitar adherencia, se hizo pasar por el chip una solución de EDTA y Tripsina al 0.5%, a una velocidad de

flujo de 5 ml/h. El experimento consistió en incubar alrededor de 5000 células THP-1 con 50 µg/mL de PF2 con medio RPMI al 1% SFB durante 3 h. Como control y se utilizaron células no tratadas con la lectina. Posteriormente, los monocitos se lavaron con solución salina comercial y se colectaron en una jeringa de 15 mL y se introdujeron en el chip a una velocidad de flujo de 1 mL/h. Un teléfono inteligente con función de video en cámara lenta fue colocado en los oculares del microscopio y se capturaron imágenes a una velocidad de 240 fotogramas por segundo (fps).

## **Análisis de Video**

Mediante el programa Traker se analizaron los videos de las células transitadas por el chip. Se calculó el índice de deformación en la entrada del canal de constricción, el tiempo de entrada y la velocidad de tránsito de los monocitos THP-1 en diferentes secciones a lo largo del canal.

### **Índice de deformación de monocitos THP-1**

El grado de deformación de una célula puede cuantificarse usando un índice de deformación, que se utiliza para caracterizar cambios en vesículas o células sanguíneas bajo un flujo (Luo et al., 2015). El índice de deformación se calculó a partir de los datos de forma de la célula como:

$$ID = a/b$$

Donde a y b son largo y ancho de la célula (Figura 5) (Hymel, et al., 2020). Cada índice de deformación se calculó en la entrada del canal de constricción, en el momento que la célula entraba completamente en la sección de constricción. Se sometieron las células THP-1 a una incubación de 3 h con 50 µg/ml de lectina PF2 y el control con medio de cultivo solamente. Después se realizaron lavados a ambas y se introdujeron al chip en solución salina.

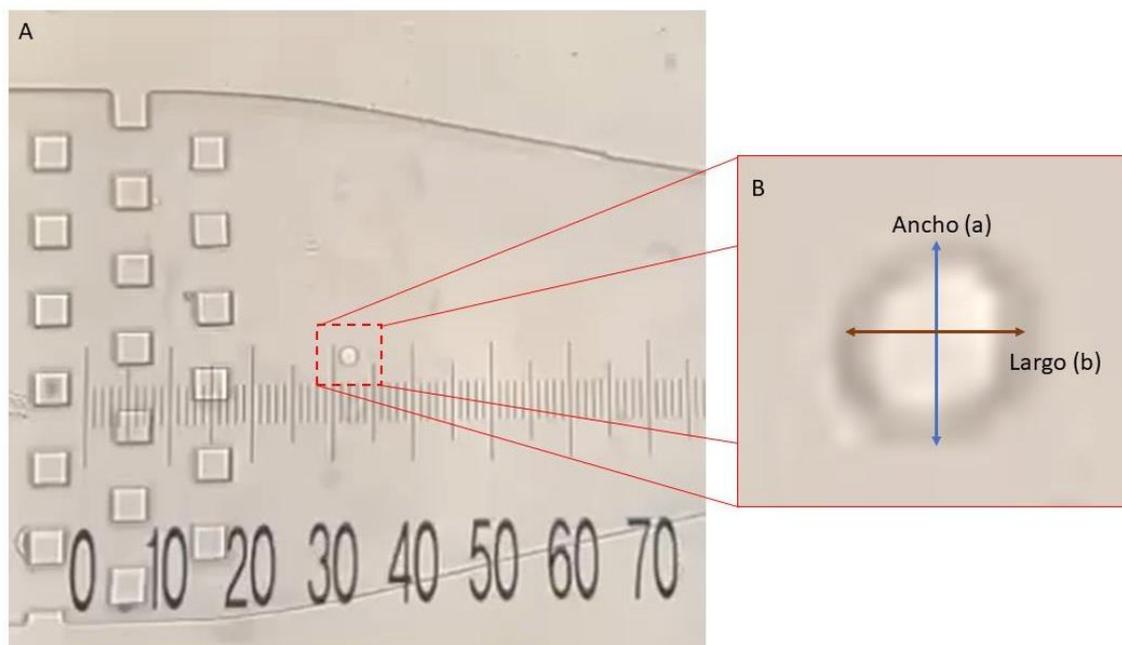


Figura 5. A. Célula THP-1 en la región de relajación en el canal de microfluídica, antes de entrar a la región de constricción. B. Secciones de largo y ancho para tomar en cuenta en el cálculo del índice de deformación.

### **Tiempo de entrada de las células THP-1 en el canal de constricción.**

El tiempo de entrada de la célula completa en el canal de constricción se calculó a partir de los videos analizados en Tracker. El tiempo cero se tomó a partir que aparece enfocada la célula en el primer fotograma en la entrada del canal. El tiempo final se tomó al entrar la célula completa al canal de constricción. En la figura 6 se muestra la llegada de la célula a la región de constricción y como entra completamente al canal.

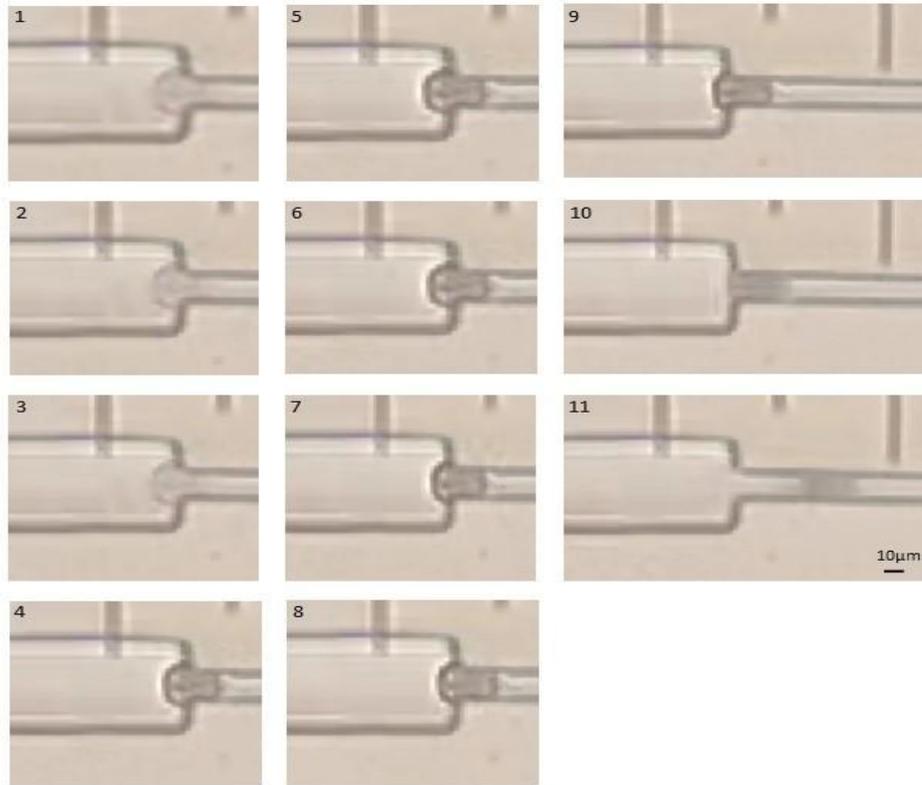


Figura 6. Fotogramas (1-11) extraídos de uno de los videos capturados de las células THP-1 tratadas con 50  $\mu\text{g/ml}$  de PF2 conforme entra a la región de constricción del canal microfluídico.

## Perfil de velocidades de los monocitos THP-1 al transitar por el canal de constricción.

Los datos del movimiento de las células en el canal de constricción se recopilaron de los videos del teléfono inteligente a partir de los fotogramas analizados en Traker. Para el análisis de los perfiles de velocidad, solo se consideró el canal de constricción, el cual tiene una longitud de 250  $\mu\text{m}$  y se dividió en 5 secciones. La velocidad se calculó en cada sección delimitada por cada 62.5  $\mu\text{m}$ . Como se muestra en la figura 7, se dividió el canal en 5 segmentos. Para el cálculo de las velocidades consistió en:

$$\frac{X_f - X_i}{t_f - t_i}$$

$X_f$  y  $X_i$ : posición final y posición inicial respectivamente en la dimensión de x  
 $t_f$  y  $t_i$ : tiempo final y tiempo inicial respectivamente de las células transitadas entre ambas secciones delimitadas.

La velocidad se registró como V1, V2, V3, V4 y V5 que fue calculada en cada segmento respectivo. Se calculo la velocidad de las células tratadas con 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de lectina PF2 por 3 h y las células sin tratar.

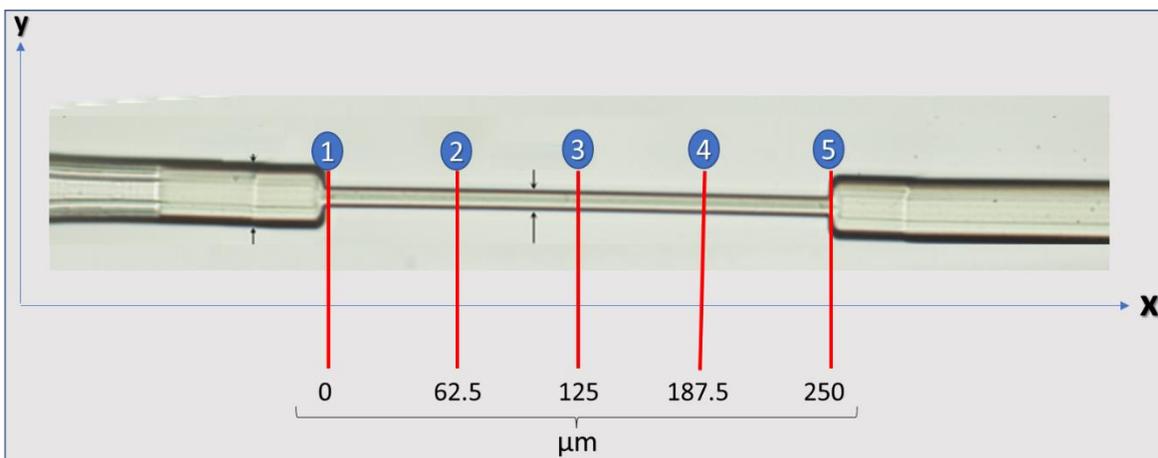


Figura 7. Definición de la sección transversal para calcular el perfil de velocidad de las células THP-1 en el canal de constricción utilizando cada segmento del 1 al 5.

## **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza unidireccional seguido de la prueba de Tukey-Kramer a  $p \leq 0.05$  utilizando el paquete estadístico NCSS versión 12 (NCSS, LLC, Kaysville, UT, EE.UU.).

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad, se están explorando nuevos posibles medicamentos contra el cáncer que tengan efectos secundarios reducidos. La terapia biológica se presenta como una alternativa, ya que utiliza las defensas del cuerpo en conjunto con productos naturales derivados de plantas. Las lectinas son un ejemplo de estos productos y poseen una naturaleza versátil con diversas aplicaciones biomédicas, antibacterianas, antifúngicas, insecticidas y anticancerígenas (Suela-Rubio, 2008; Lagarda-Díaz et al., 2017).

En este trabajo, se realizaron evaluaciones bioquímicas para determinar el efecto anticancerígeno de la lectina PF2 en células THP-1. Para ello, se estudió la actividad antiproliferativa mediante un ensayo de resazurina, se evaluó la inducción de apoptosis, necrosis y especies reactivas de oxígeno mediante citometría de flujo, y se determinó el daño al ADN genómico mediante electroforesis de agarosa para ácidos nucleicos. Además, se comprobó el bio-reconocimiento de PF2 hacia THP-1 y el daño al potencial de membrana mitocondrial de células THP-1 en contacto con PF2 mediante microscopía confocal de fluorescencia. Los resultados obtenidos muestran la capacidad de unión de PF2 hacia células THP-1. Además, se realizaron evaluaciones biofísicas mediante el uso de un dispositivo microfluídico, lo que permitió comprobar cómo la lectina PF2 modifica las propiedades mecanobiológicas de las células THP-1.

#### Purificación de lectina PF2

En colaboración con el laboratorio de bioquímica de proteínas y glicanos en CIAD, se purificó la lectina PF2 a partir de semillas de Palo fierro (*Olneya tesota*). La purificación de la lectina PF2 se realizó mediante cromatografía de afinidad, siguiendo la metodología propuesta por los colaboradores del laboratorio (Vázquez-Moreno et al., 2000). Para cada experimento, se preparó una disolución de 2 mg de

proteína en 1 ml de PBS. A continuación, se realizaron las diluciones necesarias para obtener concentraciones de 200, 150, 100, 50, 25 y 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la lectina PF2, que serían utilizadas.

## Caracterización celular y molecular de monocitos THP-1 expuestos a la lectina PF2

### La lectina PF2 reconoce los monocitos THP-1

En este estudio, utilizamos PF2-FITC para visualizar la interacción de la lectina PF2 con los monocitos THP-1 mediante microscopía confocal de fluorescencia. La lectina PF2 pudo reconocer las estructuras de glicanos presentes en las células THP-1. La figura 8 mostró proyecciones representativas de la localización celular de la lectina PF2 en las células THP-1. Además, las imágenes muestran la internalización de PF2 en las células THP-1.

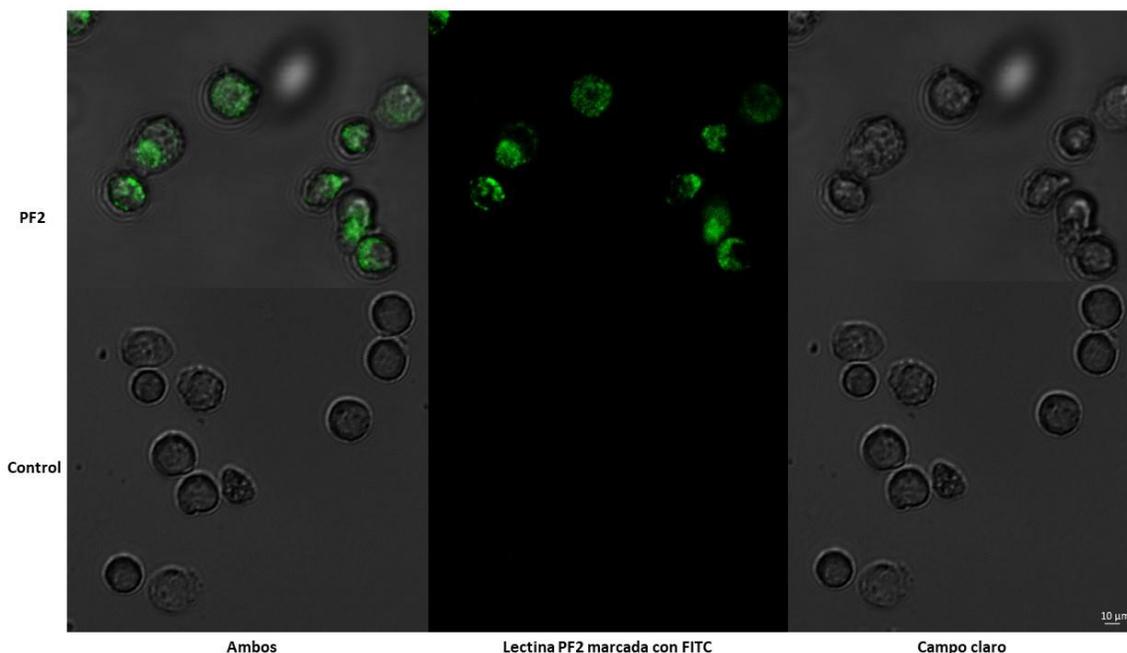


Figura 8. Micrografías de fluorescencia confocal se obtuvieron con un microscopio confocal 20X. PF2 se incubó con 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de PF2 marcado con FITC y el control negativo se incubó con PBS. La emisión de fluorescencia verde corresponde al reconocimiento de los monocitos THP-1 por la lectina FITC-PF2.

Se ha descrito previamente que PF2 se une a carbohidratos complejos del tipo tetrasialilado triantenario (Vazquez Moreno et al., 2000). Además, se ha observado que la lectina PF2 reconoce una serie de proteínas solubles y de membrana en el intestino medio de *Z. subfasciatus* durante su desarrollo larvario. Algunos de los objetivos de la lectina PF2 encontrados en *Z. subfasciatus* incluyen  $\alpha$ -amilasa, protón ATPasa tipo V, arginina quinasa, prohibitina, poliubiquitina, actina, helicasa de ARN dependiente de ATP, subunidad alfa de ATP sintasa, peptidasa de procesamiento mitocondrial,  $\alpha$ -tubulina, receptor de odorante y citocromo c oxidasa. Se sugiere que estas proteínas podrían ser objetivos potenciales que intervienen en la toxicidad de la lectina (Lagarda Díaz et al., 2012; Lagarda Díaz et al., 2014; Lagarda Díaz et al., 2017; Lagarda Díaz et al., 2020). Por lo tanto, PF2 podría estar interactuando con receptores ortólogos humanos en las células THP-1. Sin embargo, se requerirían más estudios para identificar los receptores de PF2 en las células THP-1.

Dado que la expresión de estructuras de glicano es un proceso dinámico que varía durante las etapas de desarrollo celular y que se producen alteraciones en la abundancia de carbohidratos específicos y patrones de glicosilación en las células cancerosas, sería interesante explorar si la lectina PF2 puede detectar glicoconjugados específicos en monocitos cancerosos que están ausentes en monocitos no cancerosos. De hecho, las lectinas vegetales se han utilizado para distinguir entre células cancerosas y células normales (Konozy et al., 2022). Se ha descubierto que algunas lectinas actúan como biomarcadores para el diagnóstico de cáncer, mientras que otras ejercen actividad antiproliferativa después de unirse a los respectivos receptores del glucocáliz. Por ejemplo, se ha descubierto que la aglutinina I de *Ricinus communis* (RCA-1) se une a las células de cáncer de mama de manera proporcional al estadio de la metástasis tumoral (Zhou et al., 2015). Las lectinas con especificidad hacia los epítomos glicosilados se han utilizado en el entorno clínico como herramientas de detección de patologías. Jacalina es una lectina de unión específica a galactosa aislada de *Artocarpus integrifolia*. Esta lectina acomoda los antígenos T y Tn en su sitio de unión extendido y, por lo tanto, se ha utilizado como un buen candidato para la detección histoquímica de células

cancerosas. La detección de células tumorales mediante lectinas es una herramienta viable para el diagnóstico (Jeyaprakash et al., 2002; Tachibana et al., 2006). Por tanto, merece la pena estudiar el cribado de la actividad antiproliferativa de las lectinas.

## **PF2 inhibe la proliferación e induce la apoptosis de las células THP1**

Los tratamientos con la lectina PF2 redujeron significativamente la viabilidad celular en comparación con el control, lo que sugiere que la lectina PF2 tiene un efecto citotóxico en las células THP-1 dependiente de la concentración. La figura 9 muestra el porcentaje de viabilidad de las células THP-1 tratadas con la lectina después de 24 horas de exposición.

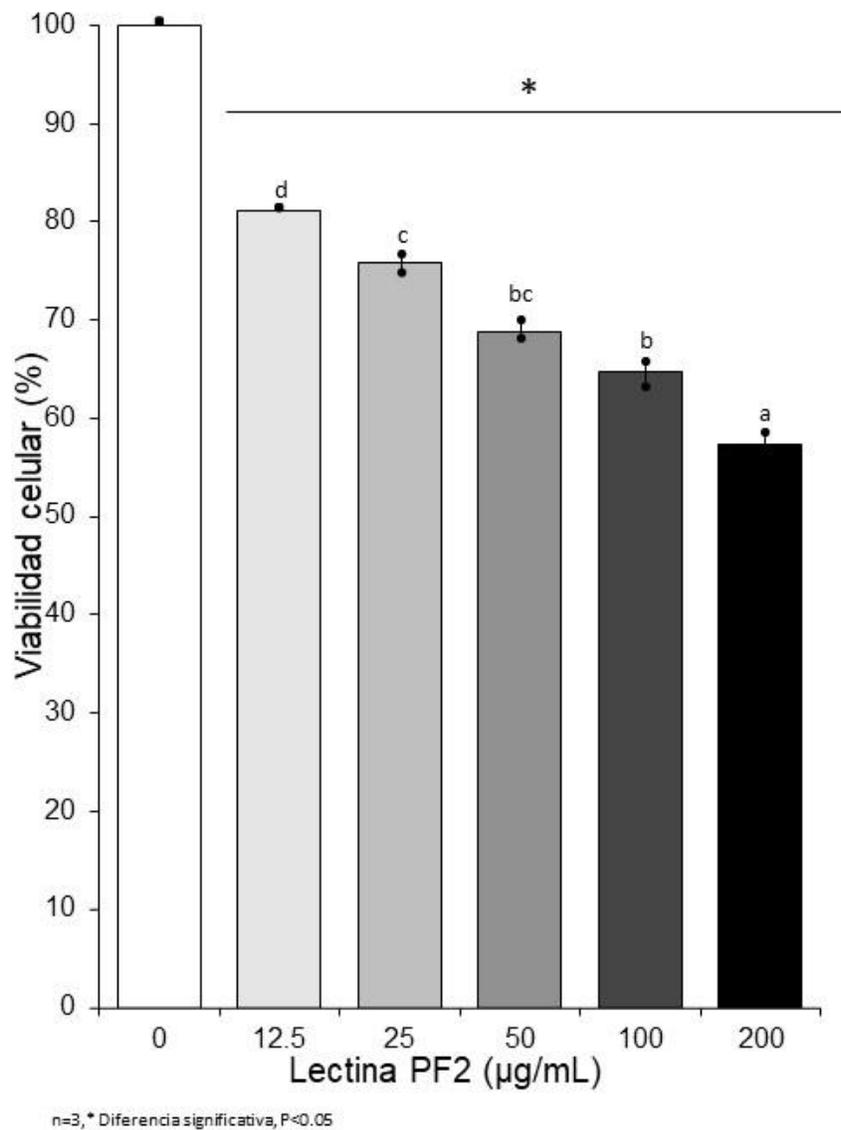


Figura 9. La viabilidad de las células THP-1 tratadas con concentraciones crecientes de PF2 durante 24 h. La viabilidad celular se presenta como el porcentaje de células viables normalizadas a células no tratadas (control) (al 100%). Las barras representan las medias de los porcentajes de viabilidad celular y la desviación estándar de los triplicados. Literales diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

Para comprender el mecanismo implicado en la citotoxicidad de la lectina PF2, decidimos evaluar la inducción de muerte celular programada en células THP-1 tratadas con la lectina mediante citometría de flujo utilizando yoduro de propidio PE-

A y anexina V FITC-A como fluoróforos. El marcaje de las células con estos fluoróforos generó distintos patrones de fluorescencia que fueron detectados por citometría de flujo y se organizaron en cuatro cuadrantes (Q) representando diferentes poblaciones celulares:

Q1: representa células no viables que han perdido la integridad de la membrana.

Q2: células en apoptosis tardía.

Q3: células en apoptosis temprana

Q4: células viables.

Como se muestra en la Figura 10, el tratamiento de células THP-1 con la lectina PF2 condujo aumentos significativos en las poblaciones de células apoptóticas tempranas y tardías en comparación con las células no tratadas. Específicamente, con la concentración más alta de lectina de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la población de células no viables alcanzó su valor más alto y el porcentaje de células viables cayó por debajo del 30%. El valor de IC<sub>50</sub> calculado para la lectina PF2 fue de  $117,43 \pm 19,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

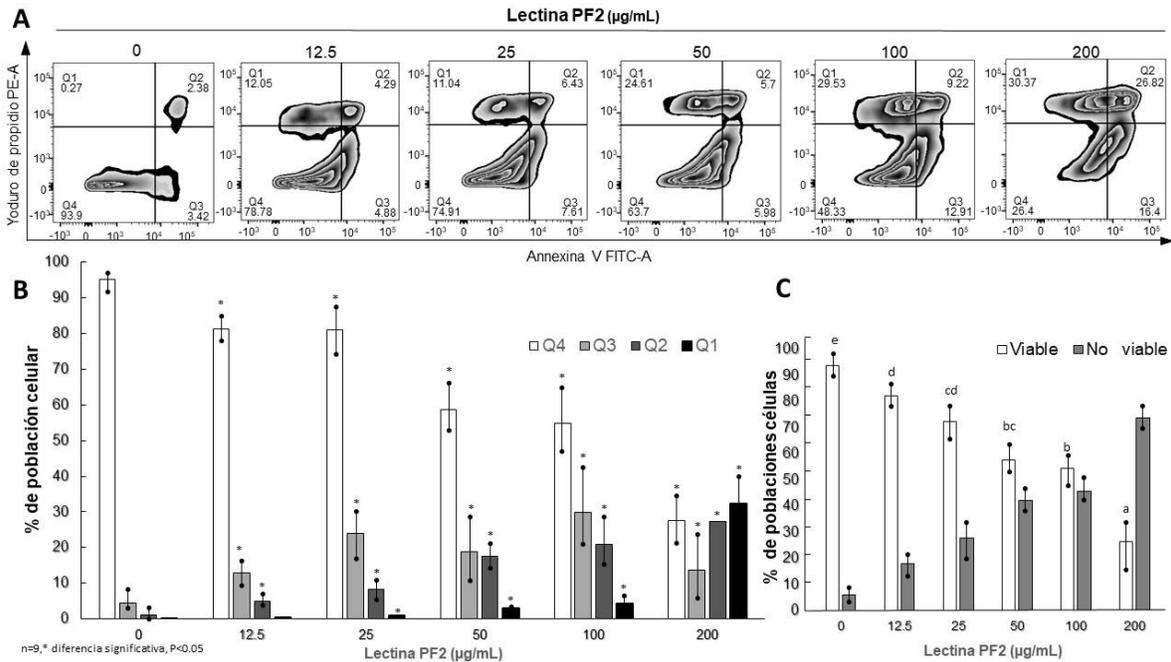


Figura 10. Análisis de citometría de flujo de monocitos THP1 expuestos a lectina PF2 utilizando marcaje fluorescente con anexina V-FITC y yoduro de propidio. El control negativo consta de células tratadas con PBS. A. Diagramas de cebrá representativos. B. Porcentajes de población celular en cada uno de los cuadrantes de los diagramas de puntos de citometría de flujo. C. Porcentajes de células viables y no viables. Las barras representan las medias  $\pm$  DE (n=3). Diferentes literales entre cuadrantes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) contra el control no tratado.

Los resultados mostraron que PF2 afectó la viabilidad de los monocitos THP-1. Las moléculas anticancerígenas potenciales deben cumplir con el requisito principal de ser citotóxicas para las células cancerosas, las cuales han desarrollado mecanismos para prevenir la muerte celular. Este es el primer estudio que revela la citotoxicidad de la lectina PF2 en las células cancerosas. Se ha informado que ciertas lectinas desencadenan citotoxicidad, apoptosis o necrosis en las células cancerosas (Faheina Martins et al., 2012; Konozy et al., 2022). Por ejemplo, las lectinas específicas de quitina aisladas de *Benincasa hispida* (BhL) y *Datura innoxia* (DiL9) detuvieron la proliferación de las células de cáncer de páncreas humano (Singh et al., 2016). De manera similar, la lectina DLasiL de *Dioclea sclerocarpa*

exhibió una potente actividad anticancerígena al detener el crecimiento en líneas celulares de tumores de ovario y próstata (Gondim et al., 2017). Una lectina de unión a manosa purificada del tubérculo *Pinellia pedatisecta* condujo a la muerte de líneas celulares de carcinoma hepatocelular y de pulmón (Lu et al., 2012). Además, una lectina de *Pinellia ternata* inhibió el sarcoma y la proliferación de células HeLa (Zuo et al., 2012). El valor de IC50 de PF2 ( $117.43 \pm 19.5 \mu\text{g/mL}$ ) se comparan con otras lectinas vegetales en varias líneas celulares cancerosas (ver Tabla 2, revisada por Jiang et al., 2015). Se requieren estudios adicionales para abordar la relación entre especificidad y toxicidad de las lectinas vegetales.

Tabla 2. Valores IC50 de lectinas de leguminosas contra líneas celulares de cáncer.

<b>Lectina</b>	<b>Linea celular de cancer</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>
<i>Astragalus monghlicus</i> lectina (AMM)L	HeLa, K562, and MG63	0.08
<i>Bauhinia unguolata</i> lectina (BUL)	HT-29	0.16
<i>Calliandra surinamensis</i> lectina (Casul)	K562	0.67
	T-47D	0.58
<i>Dioclea lasiocarpa</i> lectina (DLasiL)	A2780	0.0065
	A549	0.01037
	MCF-7	0.127
	PC3	0.027
<i>Dioclea violacea</i> lectina (DVL)	Rat C6 glioma	0.58
<i>Glycine max</i> lectina (SBL)	Hela	0.06
	Hep2	0.02
	HepG2	0.04
	MDA MB	0.04
	U373 MG	0.051
<i>Lotus corniculatus</i> lectina (LCL)	THP-1	0.039
	HOP62	0.05
	HCT116	0.06
<i>Moringa oleifera</i> lectina (cMoL)	B16-F10	2.58
<i>Sophora alopecuroides</i> lectina (SAL)	HeLa	0.249
<i>Phaseolus acutifolius</i> lectina (TLF)	3T3/v-mos	0.27
<i>Phaseolus acutifolius</i> lectina (TBL)	Sw480	0.84
	C33-A	0.4
<i>Phaseolus vulgaris</i> lectina (PHA)	Tumor linfoide	7.0
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Frijol comun lectina (WKBL)	HONE1	0.672
	HepG2	0.6
	MCF7	0.127
<i>Olneya tesota</i>	THP-1	0.117

Para elucidar parcialmente el mecanismo por el cual PF2 ejerce un efecto anti-proliferativo en las células THP-1, estudiamos la vía de muerte celular de células THP-1 tratadas con PF2, así como la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), daño en el gDNA, y la despolarización de la membrana mitocondrial. La vía principal por la cual la lectina PF2 induce la muerte celular en las células THP-1 es la apoptosis, confirmada por la liberación de fosfatidilserina hacia el exterior de las membranas celulares, lo que permite la unión de la anexina V marcada con FITC, detectada por citometría de flujo. En este estudio, todas las poblaciones celulares mostraron una variación significativa en comparación con el control en presencia de PF2, lo que confirma el efecto apoptótico de esta lectina en las células estudiadas. A concentraciones de 12,5 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , la población más grande de células apoptóticas cayó en apoptosis temprana. Esto indica que la lectina PF2 induce la muerte de las células THP-1 a través de un proceso programado. Además, se observó un mayor número de células necróticas en la concentración más alta de 200  $\mu\text{g/mL}$ . Por lo tanto, la vía de inducción de muerte celular también está influenciada por la concentración de lectina utilizada. La naturaleza de los inductores de muerte celular puede ser diversa. Por ejemplo, el mismo inductor puede activar tanto la necrosis como la apoptosis dependiendo de la concentración, el tiempo de incubación, el tipo de célula cancerosa y la etapa de desarrollo celular (Thompson, 1979).

### **La lectina PF2 induce la fragmentación del ADN, la producción de ROS y la pérdida potencial de la membrana mitocondrial en las células THP-1**

Con el fin de determinar los eventos que conducen a la apoptosis inducida por PF2 en THP-1, se monitoreó la integridad del ADN genómico y la acumulación de ROS. En la Figura 11 se muestra que PF2 induce la degradación del ADN en las células THP-1 incluso a concentraciones tan bajas como 10  $\mu\text{g/mL}$ , lo que se evidencia por una apariencia similar a una escalera en un gel de agarosa, en lugar de una mancha de banda indicativa de una descomposición aleatoria del ADN, como ocurre en la necrosis. El ADN de las células tratadas con PBS permaneció intacto, y se utilizaron

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y dexametasona como controles positivos, ya que son inductores conocidos de la fragmentación del ADN y la apoptosis.

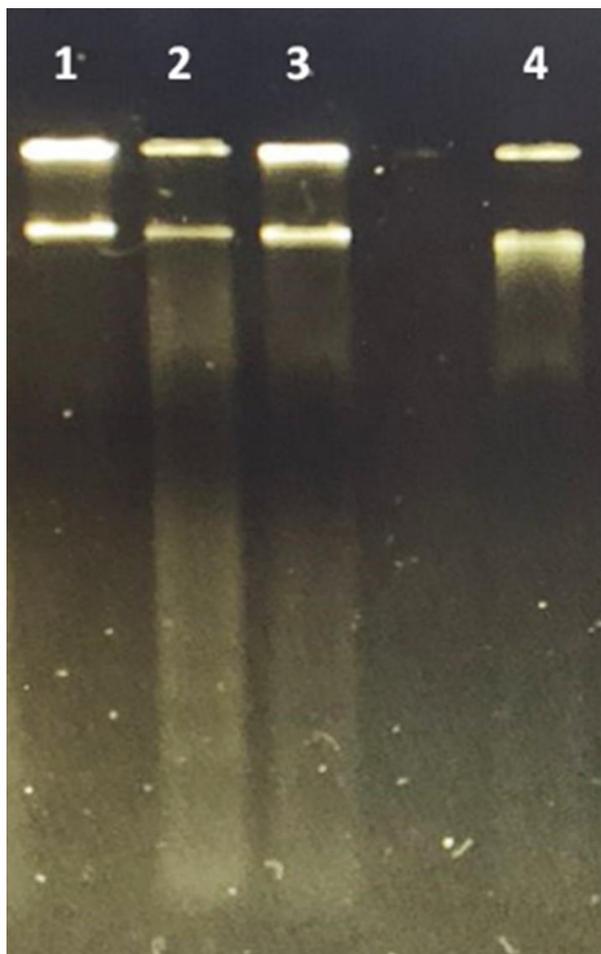


Figura 11. Análisis de fragmentación del ADN genómico en células THP-1 tratadas con PF2 durante 6 h. Línea 1 = ADN de células tratadas con PBS (control negativo); línea 2 = ADN de células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM; línea 3 = ADN de células tratadas con dexametasona 10 mM; línea 4 = ADN de células tratadas con 10 µg/mL de lectina PF2.

Las ROS desempeñan un papel importante en la inducción de la apoptosis en varios tipos de células. En el caso de las células THP-1, se observó un aumento en la acumulación de ROS dependiente de la concentración al incubarlas con diferentes concentraciones de lectina PF2 (Figura 12). A una concentración de 200 µg/mL, la

lectina PF2 indujo un aumento en los niveles de ROS en comparación con las células no tratadas.

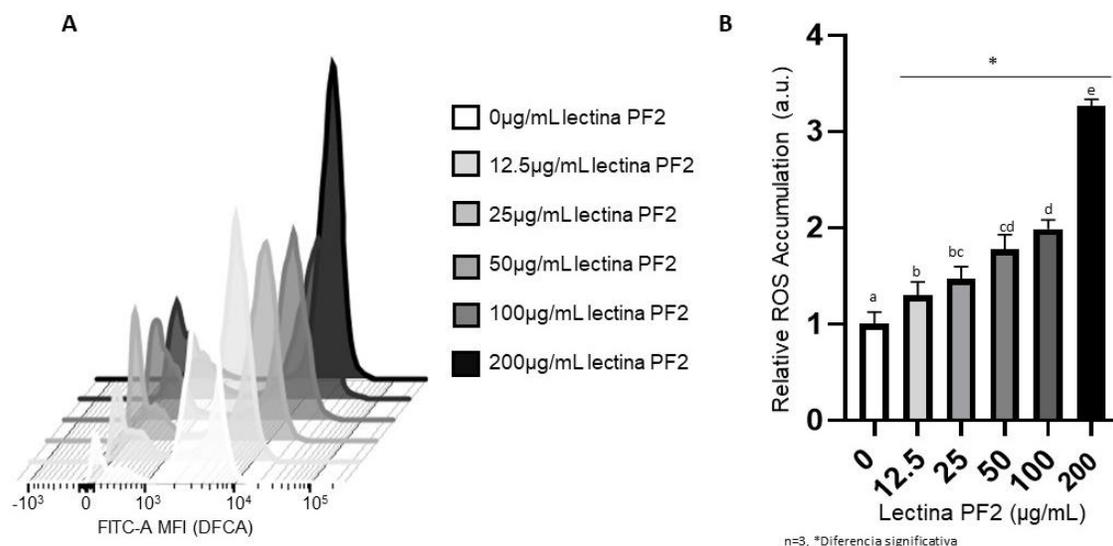


Figura 12. Acumulación relativa de ROS en monocitos THP-1 expuestos a diferentes concentraciones de lectina PF2. A. Medición de ROS por citometría de flujo seguida de la reacción de diclorofluoresceína fluorescente (DFCA). B. Histogramas representativos de unidades de intensidad de fluorescencia (MFI) media  $\pm$  SD de DFCA (en el canal FITC-A). Los valores se expresan como IMF en  $1 \times 10^4$ . Acumulación relativa de ROS considerando los niveles basales de ROS como punto de comparación. Literales diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

En la vía intrínseca de la apoptosis, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial se considera un evento temprano en el proceso apoptótico. La rodamina 123 (Rho 123) es un colorante de carbocianina catiónico que se acumula en las mitocondrias con un potencial de membrana funcional. Se observó que las células tratadas con lectina PF2 mostraron un potencial de membrana mitocondrial significativamente más bajo, expresado en unidades arbitrarias de fluorescencia, en comparación con las células no tratadas (Figura 13).

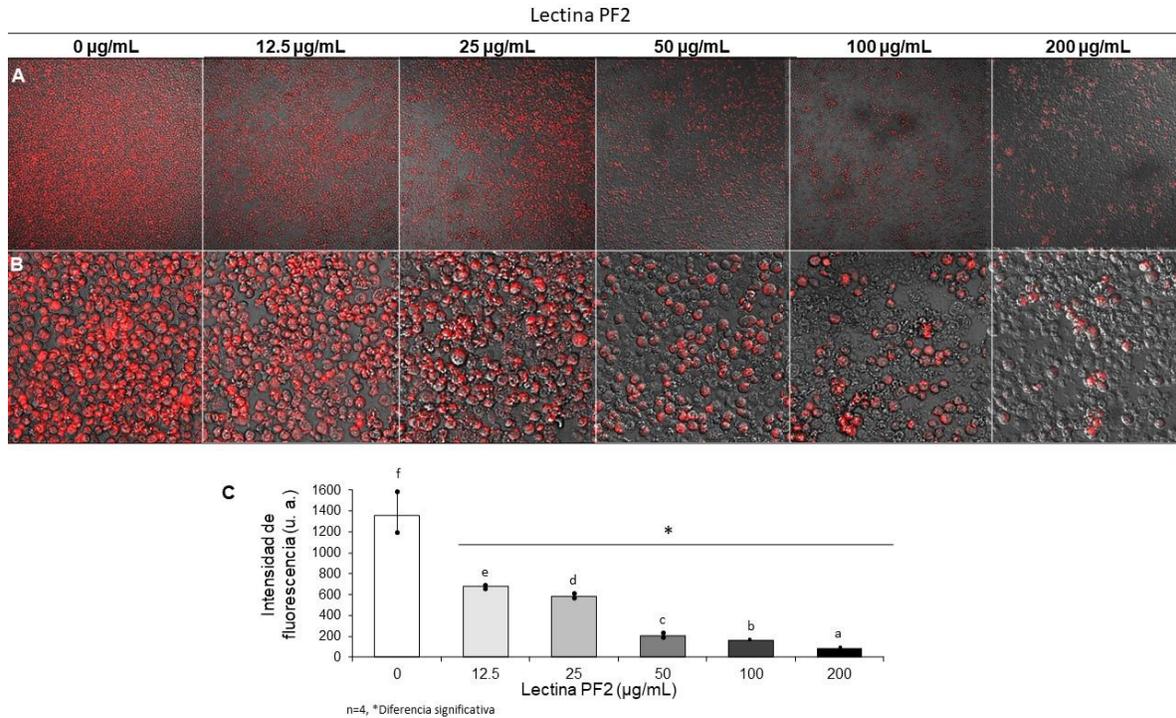


Figura 13. Efecto de la lectina PF2 sobre el potencial de membrana mitocondrial THP-1. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de monocitos THP-1 teñidos con rodamina 123 con un aumento de 20x (A) y 40x (B). Unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia (C). Una disminución en la intensidad de la fluorescencia indica la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Las barras representan las medias  $\pm$  DE (n=4). Literales diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

La evidencia encontrada hasta el momento en este trabajo, incluyendo la acumulación de ROS, la fragmentación del ADN y la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial sugiere una activación intrínseca de la apoptosis. Sin embargo, sería necesario evaluar la expresión de la caspasa 9 y el factor de necrosis tumoral para corroborar estos hallazgos. Los niveles excesivos de ROS pueden afectar la integridad de la membrana celular, alterar las proteínas y la dinámica del citoesqueleto, y causar daños en el ADN, lo que se conoce como estrés oxidativo (Molavian et al., 2016). Muchos medicamentos contra el cáncer demuestran ser citotóxicos para las células cancerosas debido a su capacidad para

aumentar drásticamente la generación de ROS a niveles dañinos (Gorrini et al., 2013).

Nuestros resultados sugieren que la citotoxicidad de PF2 está mediada por la producción intracelular de ROS. De hecho, se sabe que las ROS participan en las primeras etapas de la apoptosis e inducen la despolarización de la membrana mitocondrial. Las ROS pueden causar daños graves en moléculas celulares fundamentales como lípidos, proteínas y ADN (Ravindran et al., 2011). A concentraciones 10 veces más bajas que la IC50, la lectina PF2 promovió la fragmentación de la cadena de ADN genómico en las células THP-1, que es un evento característico de la apoptosis. La literatura ha demostrado que la lectina Con A de las leguminosas induce apoptosis en macrófagos PU5-1.8 de ratones, con fragmentación del ADN a 25 µg/mL y liberación de citocromo-c (Suen et al., 2000). El citocromo-c se libera intracelularmente tras la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial. PF2 promovió la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial en las células THP-1 de manera dependiente de la concentración, similar al efecto observado para la lectina Con A en las células MOLT-4 (Faheina Martins et al., 2012). Después de corroborar el efecto citotóxico de la lectina PF2 en las células THP-1, continuamos plasmando los resultados y discusiones obtenidos de las evaluaciones biofísicas en este trabajo.

## **Caracterización física de monocitos THP-1 expuestos a la lectina PF2**

### **Chip microfluídico**

Los dispositivos microfluídicos se fabricaron mediante un molde maestro utilizando el proceso de litografía láser sin máscaras, con resina fotosensible IP-S sobre un sustrato de vidrio recubierto con una película de ITO. Se fabricaron moldes de resina epóxica y se utilizaron para crear réplicas de PDMS que se sellaron en cubreobjetos de vidrio. El volumen de PDMS utilizado para las réplicas de los moldes fue de

aproximadamente 2 a 3g. Se realizaron orificios de entrada y salida en los chips de PDMS, que se sellaron permanentemente en los cubreobjetos de vidrio (Figura 14).

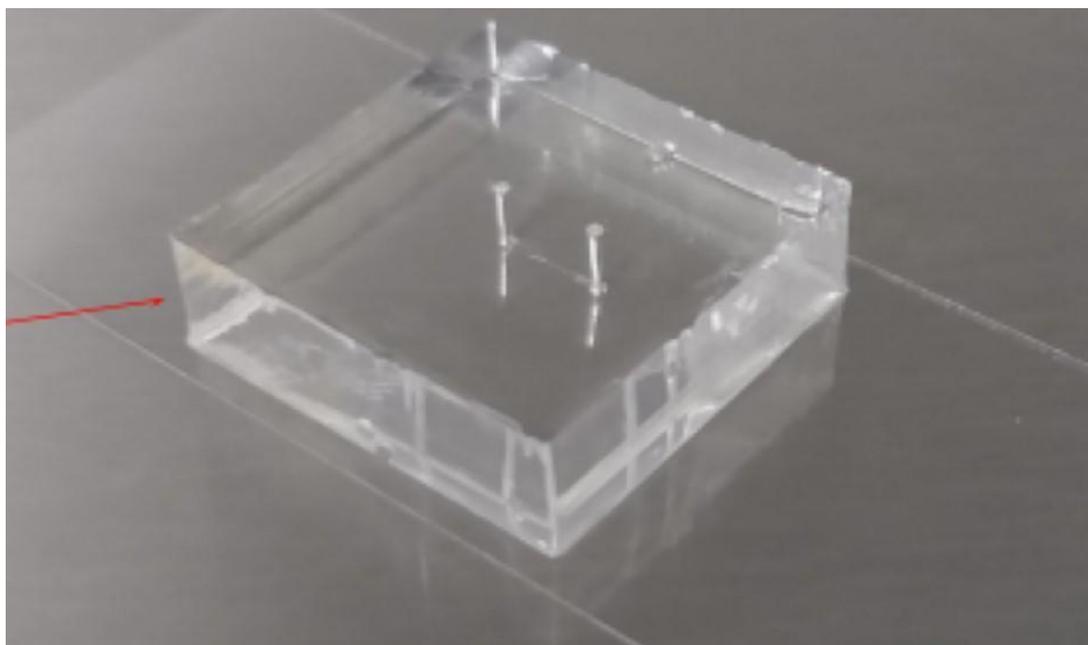


Figura 14. Chip de Poli Dimetil Sulfóxido (PDMS) sellado en cubreobjetos de vidrio y sus orificios de entrada y salida.

Los canales en el interior del chip microfluídico se lograron fabricar con las medidas planteadas para ejercer una fuerza de deformación a una sola célula y poder calcular su deformación morfológica bajo un flujo hidrodinámico controlado. El dispositivo se observa en la figura 15 por microscopía óptica. El chip se conectó al reservorio de células THP-1 tratadas con PF2 y sin tratar. Además, el chip se manipulo con delicadeza por lo frágil del material y en ocasiones se montó sobre otro portaobjetos.

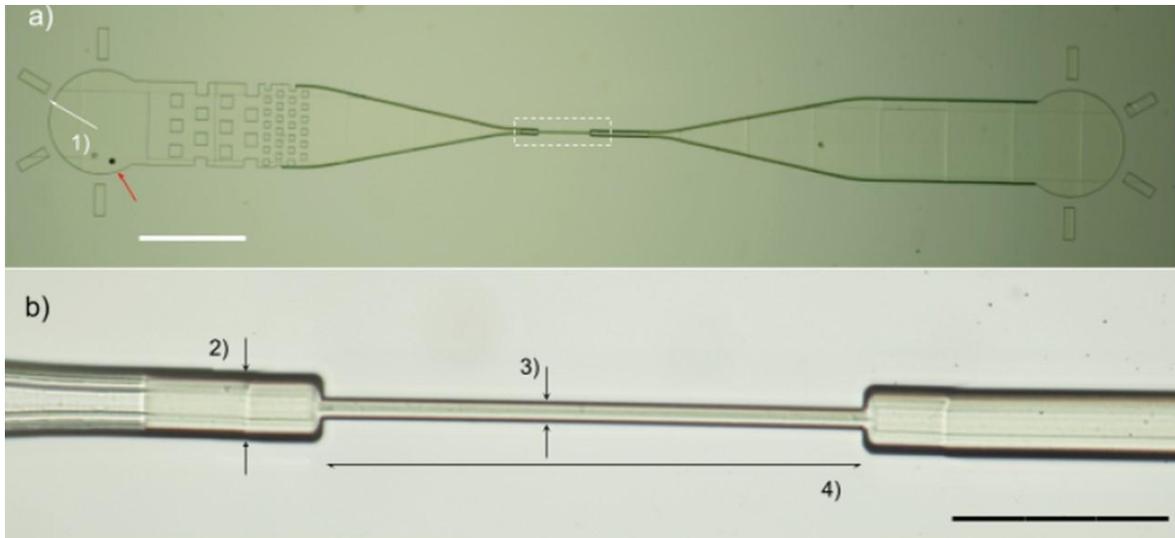


Figura 15. Chip microfluídico. Canal de constricción visualizado por microscopía óptica. a) Vista general, la flecha roja indica una burbuja embebida en la zona de entrada. Barra de escala blanca de 500  $\mu\text{m}$ . b) Detalle del canal central, barra negra de escala de 100  $\mu\text{m}$ . 1) Radio de entrada de 250  $\mu\text{m}$ , 2) ancho de 30  $\mu\text{m}$ , 3) ancho de 8  $\mu\text{m}$ , 4) largo de 250  $\mu\text{m}$ .

## Diámetro celular

La morfología de las células THP-1 se observó antes de ser inyectadas en el chip de microfluídica mediante microscopía óptica. Las micrografías se analizaron utilizando ImageJ y se obtuvo un rango de diámetros celulares entre 11 y 23  $\mu\text{m}$  (Figura 16). Se determinó un diámetro promedio de aproximadamente 18  $\mu\text{m}$ . Además, se realizaron una serie de medidas en dos dimensiones en cada célula, denominadas altura y longitud inicial. En la tabla 3 se muestran las características de las células utilizadas en esta investigación.

Tabla 3. Características del tamaño de las células THP-1.

	Promedio ( $\mu\text{m}$ )	SD
Largo (x)	17.4239783	2.08890045
Ancho (y)	19.0434967	3.046879

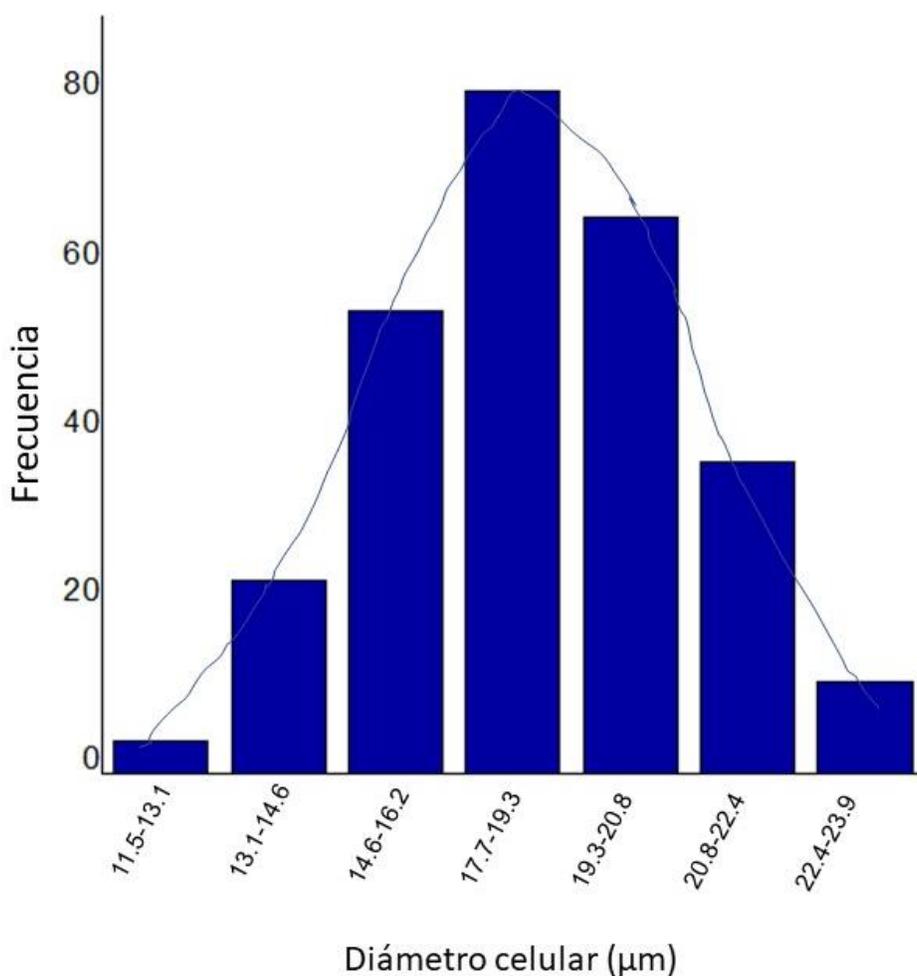


Figura 16. Histograma de distribución de tamaños de las células THP-1 tomando el diámetro celular en condiciones esféricas.

Las células THP1 se inyectaron al chip microfluídico para evaluar algunas propiedades físicas como índice de deformación, tiempo de entrada al canal de constricción y perfil de velocidad. Inicialmente, las células THP-1 fueron tratadas

con 10  $\mu\text{g/mL}$  y 117,43  $\mu\text{g/ml}$  esta última por ser la IC50 calculada en experimentos anteriores. Sin embargo, no hubo cambios significativos en las propiedades físicas con la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  y con la IC50 las células se aglomeraron en la entrada del canal microfluídico impidiendo el tránsito. Por lo tanto, se usó la concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  de la lectina PF2 por 3 h para obtener los parámetros físicos de las células THP-1.

### **Índice de deformación, tiempo de entrada y perfiles de velocidad de los monocitos THP-1 en el canal de constricción.**

El índice de deformación se calculó en la entrada del canal de constricción, en el momento que la célula entraba completamente en la sección de constricción. Las células THP-1 se incubaron por 3 h con 50  $\mu\text{g/ml}$  de lectina PF2 y el control con medio de cultivo solamente. Después se realizaron lavados con solución salina y se introdujeron al chip. La sección transversal del canal microfluídico y el caudal se mantuvieron constantes para las células con y sin lectina PF2, de modo que el número de Reynolds de ambas muestras se puede considerar constante.

Algunos medicamentos van encaminados a desestabilizar filamentos de actina en las células de cáncer y por consiguiente cambios en la biomecánica celular para hacer más difícil la propagación de células cancerosas, fenómeno llamado metástasis. En ese sentido, muchos fármacos buscan aumentar la rigidez de células tumorales y por consiguiente evitar la metástasis. En ese sentido, la lectina PF2 mostró un efecto contrario al aumentar el índice de deformación en las células THP-1 con respecto al control (Figura 17). Lo anterior indica que PF2 puede ocasionar un estímulo en células THP-1 que ocasione un incremento en la deformación. Resultados similares se han reportado para fármacos anticancerígenos. Por ejemplo, en las células de cáncer de ovario OVCAR-3 se observó un aumento significativo en la elasticidad después del tratamiento con el compuesto anticancerígeno equinomicina (Ech) (Mengdan Chen et al., 2020). Un comportamiento similar se observó en células de cáncer de mama MCF-7 expuestas

a paclitaxel durante 24 horas (Kaffas et al. 2013). Por el contrario, hay fármacos que pueden disminuir la elasticidad en células tumorales. Por ejemplo, en células de cáncer de ovario resistentes al cisplatino (OVCAR5-CisR) se observó una disminución en su elasticidad después de un tratamiento con el fármaco (Sharma et al., 2012). También, se reporta la muerte celular inducida por quimioterapia (doxorubicina y dexametasona) aumenta la rigidez de las células de leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloide aguda (Yallapu et al., 2015).

Asimismo, se determinó el tiempo de entrada de las células en el canal de constricción y se observó que las células tratadas con PF2 les tomo más tiempo entrar al canal de constricción (Figura 18). Estos resultados pueden estar relacionados con la citoadherencia de la célula con la lectina PF2 al material que provoque una mayor deformación y un mayor tiempo de entrada al canal de constricción. Sin embargo, para explicar el motivo por el cual las células son más deformables es necesario realizar estudios a nivel molecular del citoesqueleto de las células y medir la adherencia de las células con el polidimetilsulfoxido para dilucidar cualquier tipo de interacción entre ellos. Es importante mencionar el papel que juegan las propiedades mecánicas en las células hematopoyéticas, como los monocitos. Ya que la deformación en monocitos es de gran importancia debido a su capacidad de transitar por capilares sanguíneos de tamaño angosto. Mediante este chip se podría determinar la deformación entre células normales y de cáncer para establecer parámetros de diagnóstico.

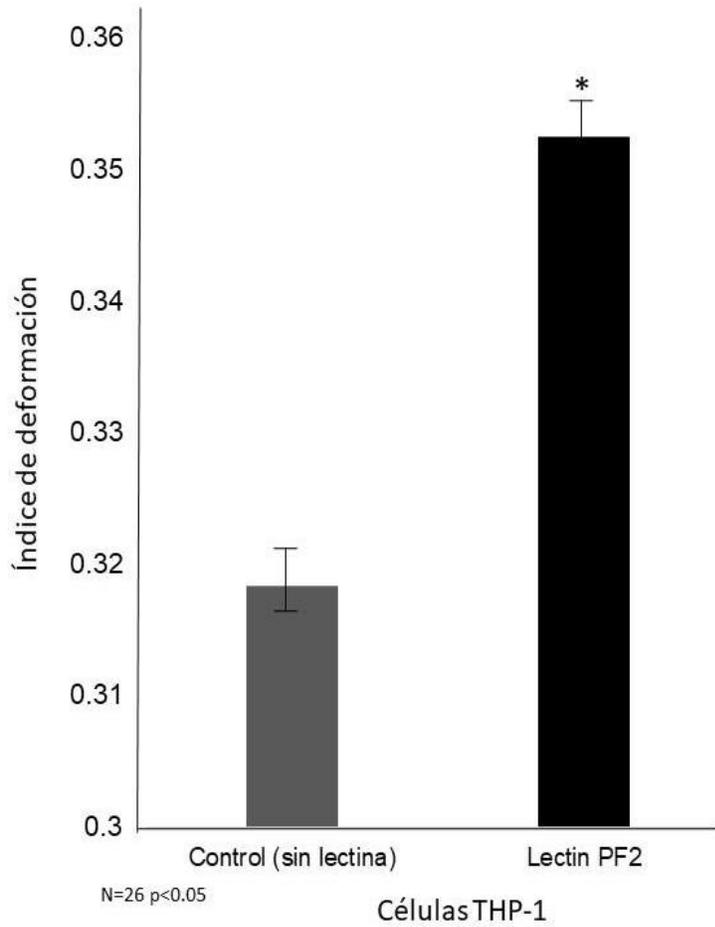


Figura 17. Promedio del índice de deformación de las células THP-1 al entrar completamente al canal de constricción. Las células fueron tratadas con 50  $\mu\text{g/ml}$  de lectina PF2 por 3 h y el control con medio de cultivo. \*Diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

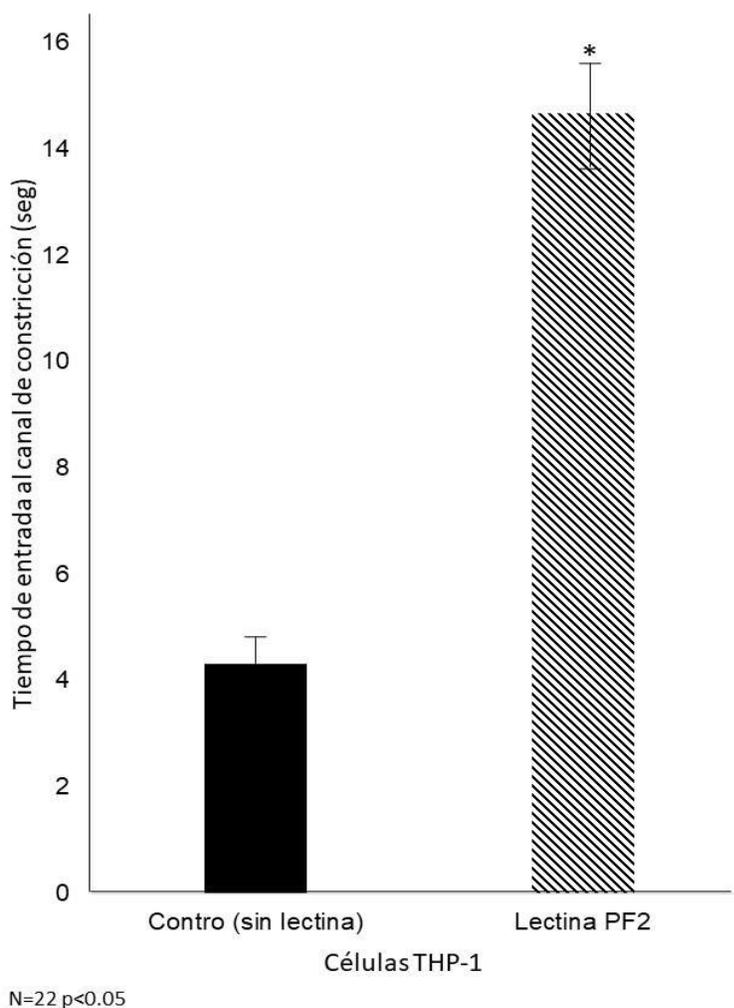


Figura 18. Promedio del tiempo de entrada de las células en la región de constricción. Células tratadas con 50  $\mu\text{g/ml}$  de lectina PF2 por 3h y control sin lectina. \*Diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

Algunos estudios se han centrado en el tiempo de entrada y el tiempo de tránsito de las células en un canal de constricción, y el análisis ha definido criterios que tipifican líneas celulares específicas. Las diferencias en propiedades mecánicas se evalúan mediante la comparación de perfiles de velocidad, que es una nueva medida de la capacidad mecánica (Ren et al., 2017). En este estudio, se comparó la velocidad de las células THP1 transitadas por el canal de constricción y se encontró que la lectina PF2 reduce la velocidad de tránsito de las células THP-1 por el canal de constricción

en el dispositivo microfluídico en comparación con las células no tratadas ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 19). Además, en las diferentes secciones transversales se calcularon las velocidades promedio. La mayor diferencia de velocidad se encontró en la sección V2 y V5 de la longitud del canal de 62.5 y 250  $\mu\text{m}$  respectivamente (Figura 20).

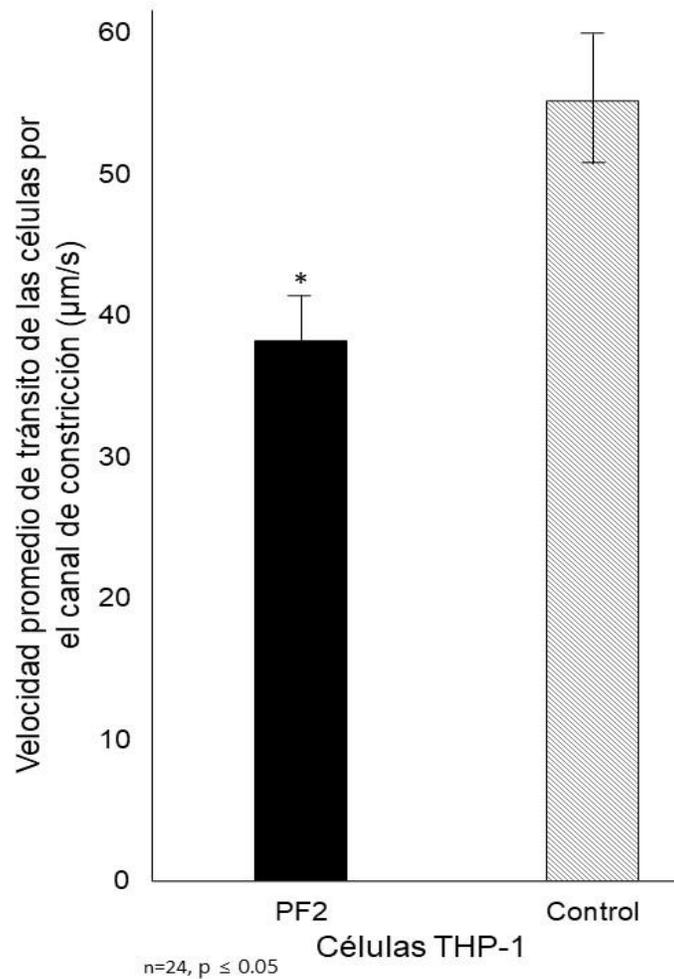


Figura 19. Promedio de las velocidades de las células THP-1 transitadas por el canal de constricción incubadas por 3 h con 50  $\mu\text{g/ml}$  de la lectina PF2 y control.

\*Diferencia significativa  $p < 0.05$

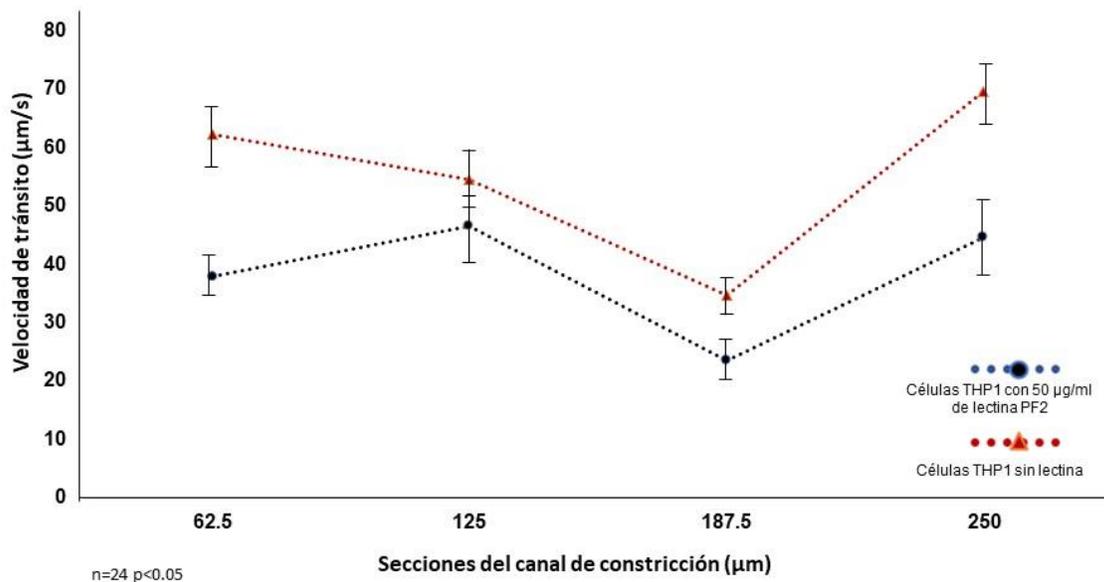


Figura 20. Gráfica de velocidades de las células THP-1 por el canal de constricción tratadas con 50 μg/mL de lectina PF2 y control sin tratamiento en diferentes puntos de la dimensión x. Perfiles de velocidad de sección transversal del canal de constricción.

El perfil de velocidad de las células depende de la presión del fluido, el caudal y la geometría de las células. Mediante el estudio de la velocidad promedio en cada sección y la diferencia de velocidad entre los diferentes segmentos, podemos diferenciar características mecánicas. Por ejemplo, en un estudio con células de cáncer de mama MDA-MB-231 muestran una relación entre la velocidad y la deformación. El estudio sugiere que células más deformables alcanzan velocidades más altas en los canales de constricción (Ren, 2017). Sin embargo, en nuestro trabajo no se encontró ese comportamiento ya que las células THP-1 tratadas con PF2 mostraron una velocidad menor que las células no tratadas. Por lo tanto, es necesario complementar la investigación de las propiedades mecánicas de las células THP-1 con otras técnicas para dilucidar bien el mecanismo de acción de la lectina PF2 en THP-1, por ejemplo, mediante microscopía de fuerza atómica.

## CONCLUSIÓN

En este trabajo se mostró el potencial anticancerígeno de la lectina PF2 hacia monocitos THP-1. PF2 indujo la muerte celular mediante vía apoptótica caracterizada por la fragmentación del ADN, la despolarización de la membrana mitocondrial y el aumento de la producción de ROS. Dado que las células cancerosas a menudo evitan la apoptosis al silenciar proteínas y marcadores apoptóticos, el hecho de que PF2 induzca la apoptosis en las células THP-1 sugiere que esta lectina puede desempeñar un papel fundamental en la patogénesis molecular de la leucemia. Además, PF2 promovió cambios en las propiedades mecánicas de monocitos THP-1, lo cual es un campo escasamente explorado para lectinas. Por lo tanto, este trabajo no solo contribuye al descubrimiento de moléculas de origen natural con actividad antitumoral si no también al estado del arte de las propiedades biomecánicas de células tumorales. En ese sentido es importante llevar a cabo futuras investigaciones para avanzar en la viabilidad terapéutica de los tratamientos contra el cáncer basados en lectinas con un enfoque multidisciplinario.

## PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

- Identificar los receptores glicosilados de los monocitos THP-1 reconocidos por la lectina PF2.
- Realizar estudios citotóxicos y biomecánicos en monocitos de sangre periférica.
- Realizar estudios a nivel transcrito y genómico de la expresión de la familia de las caspasas, metaloproteinasas MMP, ruta Bcl-Bax y ruta Ras-Raf. Con la finalidad de dilucidar el mecanismo completo de la lectina PF2.
- Realizar estudios de la activación de las rutas de citocinas en monocitos THP1 en contacto con la lectina PF2.
- Diseñar y fabricar un sensor usando la lectina PF2 inmovilizada en un dispositivo microfluídico para el diagnóstico oportuno de cáncer mediante la interacción lectinas-N-glicoproteínas.

## REFERENCIAS

- Abbott KL, Aoki K, Lim J-M, Porterfield M, Johnson R, O'Regan RM, Wells L, Tiemeyer M, Pierce M. (2008). Targeted glycoproteomic identification of biomarkers for human breast carcinoma. *J Proteome Res.* 7(4):1470–1480.
- Acedo-Espinoza, E., Lagarda-Díaz, I., Cabrera, R., Guzman-Partida, A. M., Maldonado-Arce, A., Ortega-Nieblas, M. M., Chan-Chan, L., & Vázquez-Moreno, L. (2021). Insights into the Structural Features, Conformational Stability and Functional Activity of the *Olneya tesota* PF2 Lectin. *Protein and peptide letters*, 28(4), 403–413. <https://doi.org/10.2174/0929866527666200813204303>
- Aguilar López L, León Cantú RE, Pérez Lozano U, Montañó Figueroa EH, Terreros Muñoz E, Martínez Murillo C. (2010). *Guía de Práctica Clínica; Diagnóstico y tratamiento de la leucemia mieloide aguda.*
- Alberro JA, Rosas J. (1997). Técnicas no farmacológicas en el tratamiento del cáncer: cirugía y radioterapia. En: Cajaraville G, Napal V, Sevilla E, Valverde E. *Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria*, editores. *El paciente oncohematológico y su tratamiento. Módulos de actualización multidisciplinar.* Madrid: Editores Médicos, SA. Módulo 8, p. 1-40.
- Alberto Aguilar Dulce. (2016). *Identificación de proteínas fucosiladas en cancer de ovario.* Tesis maestría. Centro de investigación y de estudios avanzados del instituto politécnico nacional.
- Alberts, B. (2008). *Biología molecular de la célula* (5.a ed., Vol. 1). Recuperado de <https://es.slideshare.net/ElizabethSegovia/biologa-molecular-de-la-clula-5-edicin-alberts-espaol>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Ra, M, Roberts, K. y col. *Molecular Biology of the Cell.* (2002). Garland Science Taylor & Francis Group.
- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Gen. Subj*; 1473: 4–8.
- Augustin, M., Bock, P. R., Hanisch, J., Karasmann, M., & Schneider, B. (2005). Safety and efficacy of the long-term adjuvant treatment of primary intermediate- to high-risk malignant melanoma (UICC/AJCC stage II and III) with a standardized fermented European mistletoe (*Viscum album* L.) extract. Results from a multicenter, comparative, epidemiological cohort study in Germany and Switzerland. *Arzneimittel-Forschung*, 55(1), 38–49. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296823>
- Balmer C, Finley RS. (1998). *Principles of Cancer Treatment.* En: Finley RS, Balmer C, editores. *Concepts in Oncology Therapeutics.* 2ª ed. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists. P. 15-32.
- BantelH, Engels IH,VoelterW, Schulze-OsthoffK,Wesselborg S. (1999). Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 59:2083–90.
- Bertozzi, C. R., & Sasisekharan, R. (2009). *Glycomics.* In A. Varki (Eds.) et. al., *Essentials of Glycobiology.* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6), 167-223. [https://doi.org/10.1016/s0098-2997\(00\)00007-8](https://doi.org/10.1016/s0098-2997(00)00007-8)

- Bhutia, S. K., Panda, P. K., Sinha, N., Praharaj, P. P., Bhol, C. S., Panigrahi, D. P., Mahapatra, K. K., Saha, S., Patra, S., Mishra, S. R., Behera, B. P., Patil, S., & Maiti, T. K. (2019). Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. In *Pharmacological Research* (Vol. 144, pp. 8–18). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.04.001>
- Bianchi, Micaela. (2016). "Mecanotransducción celular. Correlación entre las propiedades mecánicas y la organización-dinámica de proteínas de adhesión focal en células vivas". Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Biological Response Modifiers. En: Fischer DS, Tish Knobf M, Durivage HJ. (1997). *The cancer chemotherapy handbook*, 5ª ed. St.Louis: Mosby, Inc. P. 219-59.
- Büll, C., Stoel, M.A., den Brok, M.H., Adema, G.J. (2014). Sialic acids sweeten a tumor's life. *Cancer research* 74, 3199-3204.
- Cajaraville G., Carreras M. J., Massó J., Tamés M. J. (2002). *Oncología. Farmacia hospitalaria*, 1:1171 - 1226.
- Camunas-Soler, J., Alemany, A., Ritort, F. (2017). Experimental measurement of binding energy, selectivity, and allostery using fluctuation theorems. *Science* 355, 412-415.
- Castillo-Villanueva, Adriana, & Abdullaev, Fikrat. (2005). Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de investigación clínica*, 57(1), 55-64. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-83762005000100007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762005000100007&lng=es&tlng=es).
- Chan, Y. S., Xia, L., & Ng, T. B. (2016). White kidney bean lectin exerts anti-proliferative and apoptotic effects on cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.094>
- Chang, L. y Goldman, R. D. (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5, 601.
- Chen, M., Zeng, J., Ruan, W., Zhang, Z., Wang, Y., Xie, S., Wang, Z. y Yang, H. (2020). Examen de la relación entre las propiedades viscoelásticas y la invasión de las células de cáncer de ovario por microscopía de fuerza atómica. *Beilstein journal of nanotechnology* , 11 , 568–582. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.45>
- Chen, M., Zeng, J., Ruan, W., Zhang, Z., Wang, Y., Xie, S., Wang, Z. y Yang, H. (2020). Examen de la relación entre las propiedades viscoelásticas y la invasión de las células de cáncer de ovario por microscopía de fuerza atómica. *Beilstein journal of nanotechnology*, 11 , 568–582. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.45>
- Chen, M.; Zeng, J.; Ruan, W.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Xie, S.; Wang, Z.; Yang, H. Beilstein. (2020), Examination of the relationship between viscoelastic properties and the invasion of ovarian cancer cells by atomic force microscopy. *J. Nanotechnol.* 11, 568–582. doi:10.3762/bjnano.11.45
- Ciasca, G., Papi, M., Minelli, E., Palmieri, V., y De Spirito, M. (2016). Cambios en las propiedades mecánicas celulares durante el inicio o la progresión del cáncer colorrectal. *World journal of gastroenterology* , 22 (32), 7203–7214. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i32.7203>
- Cruz, P.H., Campos, E.P., Martínez, L.M., Ortiz, B., Martínez, G. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Revista de Educación Bioquímica* 24, 21-27.

- Cuello, H. A. (2020). Participación de la glicosilación aberrante en glioma y neuroblastoma. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes. <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2367>
- De Mejía, E.G., Prisecaru, V.I. (2005). Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. *Critical reviews in food science and nutrition* 45, 425-445.
- Díaz Fernández Ana. (2020). Detección de cambios en la glicosilación de la PSA asociados al cáncer de próstata: Selección de aptámeros y diseño de aptasensores electroquímicos. Tesis Doctorado. Universidad de Oviedo. Oviedo, España.
- Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, et al. (2005). Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*;106(12):3740-3746.
- El Kaffas A, Bekah D, Rui M, Kumaradas JC, Kolios MC. (2013). Investigating longitudinal changes in the mechanical properties of MCF-7 cells exposed to paclitaxol using particle tracking microrheology. *Phys Med Biol*, 58(4):923–936. [PubMed: 23340402]
- El-Aassar, M. R., Hafez, E. E., El-Deeb, N. M., & Fouda, M. M. G. (2014). Microencapsulation of lectin anti-cancer agent and controlled release by alginate beads, biosafety approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.031>
- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, pp. 495-516 <http://dx.doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. In *Toxicologic Pathology*. Vol. 35, Issue 4, pp. 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Engelking, L.R. (2015) Glycoproteins and glycolipids. In *textbook of veterinary physiological chemistry*. Elsevier, 130-135 . Doi:10.1016/b978-0-12-391909-0.50020-7.
- Estey E, Dohner H. (2006). Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 368(9550):1894-907.
- Faheina-Martins GV, da Silveira AL, Cavalcanti BC, Ramos MV, Moraes MO, Pessoa C, Araújo DA. (2012) Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. *Toxicol In Vitro*, 26:1161–9.
- Fei Fang, E., Ho Wong, J., Lin, P., & Bun Ng, T. (2010). Biochemical and Functional Properties of a Lectin Purified from Korean Large Black Soybeans &#x2014; A Cultivar of *Glycine Max*. *Protein & Peptide Letters*, 17(6), 690–698. <https://doi.org/10.2174/092986610791190309>
- Freire T, Robello C, Casaravilla C, Errico DA, Medeiros A, Carmona C, Osinaga E. (2002). Antígenos mucínicos de Oligosilación simple: nuevas similitudes entre células cancerosas y parásitos. *Actas Fisiol*, 8:89-107.
- Fu, L. L., Zhou, C. C., Yao, S., Yu, J. Y., Liu, B., & Bao, J. K. (2011). Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(10), 1442–1449. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.07.004>
- Fuchs, E. y Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annual review of biochemistry* 63, 345-382.

- Fulda S, Debatin KM. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25:4798–811.
- Gallego Rubio, M. (2014). "Lectinas inactivadoras de ribosomas: aplicaciones y usos mas importantes". Maestría. Universidad de Valladolid.
- Goldman, R. (2000). Intermediate Filaments Possible function as cytoskeletal connecting links between the nucleus and the cell Surface., *Ann NY Acad Sci*, 455:1-17.
- Gupta, N., Bisen, P. S., & Bhagyawant, S. S. (2018). Chickpea Lectin Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation and Induces Apoptosis Through Cell Cycle Arrest. *Protein & Peptide Letters*, 25(5), 492–499. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180406142900>
- Guzman-Partida, A. M., Robles-Burgueño, M. R., Ortega-Nieblas M., Vázquez-Moreno, L. (2004) Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. *Biochimie*, 86, 335-342.
- Hadjalirezaei, S., Picco, G., Beatson, R., Burchell, J., Stokke, B.T., Sletmoen, M. (2017). Interactions between the breast cancer-associated MUC1 mucins and C-type lectin characterized by optical tweezers. *PloS one* 12, e0175323.
- Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. (2008). Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*, 22(8):1539-1541.
- Hammarström S. (1999). The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*, 9(2):67–81. doi:<http://dx.doi.org/10.1006/scbi.1998.0119>.
- Hang HC, Bertozzi CR. (2005). The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorg Med Chem*, 13:5021-5034.
- Hansch FG. (2001). O-glycosylation of the mucin type. *Biol Chem*, 382:143-149.
- Hernandez Díaz P., Martín Gonzalez O., Rodriguez de Pablos Velez Y., Ganem Baez C. (1999). Aplicación de las lectinas. *Rev cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 15(2):91-5
- Hoessli DC, Ahmad I. (2008). Mistletoe lectins: carbohydrate-specific apoptosis inducers and immunomodulators. *Curr Org Chem*, 12:918–25
- Hou W., W. C. Lee, M. C. Leong, S. Sonam, S. R. K. Vedula, and C. T. Lim. (2011). "Microfluidics for applications in cell mechanics and mechanobiology," *Cell. Mol. Bioeng.*, vol. 4, no. 4, pp. 591–602. doi: 10.1007/s12195-011-0209-4.j.coche.2016.01.005.
- Howard, J. (2001). *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*. Sinauer Associates Sunderland.
- Huang, C.; Li, N.M.; Gao, P.; Yang, S.; Ning, Q.; Huang, W.; Li, Z.P.; Ye, P.J.; Xiang, L.; He, D.X.; et al. (2017) In vitro and in vivo evaluation of macromolecular prodrug GC-FUA based nanoparticle for hepatocellular carcinoma chemotherapy. *Drug Deliv*, 24, 459–466.
- Huerta-ocampo, J. Á., Barrera-pacheco, A., Mendoza-, C. S., Espitia-rangel, E., Mock, H., Paulina, A., & De, B. (2014). Salt stress-induced alterations in the root proteome of *Amaranthus cruentus* L. *Journal of Proteome Research*, 13(8):3607-3627. doi:10.1021/pr500153m

- Huldani, H., Rashid, A.I., Turaev, K.N. et al. (2022). Concanavalin A as a promising lectin-based anti-cancer agent: the molecular mechanisms and therapeutic potential. *Cell Commun Signal* 20, 167. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00972-7>
- Hymel, S. J., Lan, H., & Khismatullin, D. B. (2020). Elongation Index as a Sensitive Measure of Cell Deformation in High-Throughput Microfluidic Systems. *Biophysical journal*, 119(3), 493–501. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.06.027>
- Jimenez Movilla Maria. (2005). Análisis de la composición, estructura y función de las glicoproteínas de la zona pelúcida con especial referencias a la especie humana. Tesis Maestría. Universidad de Murcia. Murcia, España.
- Kailemia MJ, Park D, Lebrilla CB. (2017). Glycans and glycoproteins as specific biomarkers for cancer. *Anal Bioanal Chem*, Jan;409(2):395-410. doi: 10.1007/s00216-016-9880-6. Epub 2016 Sep 3. PMID: 27590322; PMCID: PMC5203967.
- Kailemia, M. J., Park, D., & Lebrilla, C. B. (2017). Glycans and glycoproteins as specific biomarkers for cancer. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409(2), 395–410. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9880-6>
- Kee YS, Robinson D N. (2013). Aspiración de micropipetas para estudiar las respuestas mecanosensoriales celulares y la mecánica. En: Eichinger L, Rivero F, editores. *Protocolos de Dictyostelium discoideum*. Vol. 983. Totowa, Nueva Jersey: Humana Press. pp. 367–382. ((Métodos en biología molecular)).
- Kim, TH, Gill, NK, Nyberg, KD, Nguyen, AV, Hohlbauch, SV, Geisse, NA, Nowell, CJ, Sloan, EK y Rowat, AC (2016). Las células cancerosas se vuelven menos deformables y más invasivas con la activación de la señalización  $\beta$ -adrenérgica. *Revista de ciencia celular* , 129 (24), 4563–4575. <https://doi.org/10.1242/jcs.194803>
- Konozy, E. H. E., & Osman, M. E. fadil M. (2022). Plant lectin: A promising future anti-tumor drug. In *Biochimie*, Vol. 202, pp. 136–145. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.08.002>
- Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. (2016). Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J*, 6(7):e441
- Kozminsky M., Y. Wang, and S. Nagrath, (2016). “The incorporation of microfluidics into circulating tumor cell isolation for clinical applications,” *Curr. Opin. Chem. Eng.*, vol. 11, pp. 59–66. doi: 10.1016/ H.
- Kyoung Song, Dae Bong Moon, Na Young Kim, and Young Kee Shin. (2020). Glycosylation Heterogeneity of Hyperglycosylated Recombinant Human Interferon- $\beta$  (rhIFN- $\beta$ ). *ACS Omega* 5 (12), 6619-6627. DOI: 10.1021/acsomega.9b04385
- Lagarda-Diaz, I., Geiser, D., Guzman-Partida, A., Winzerling, J., Vazquez-Moreno, L. (2014). Recognition and binding of the PF2 lectin to  $\alpha$ -amylase from *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) larval midgut. *Journal of Insect Science* 14.
- Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A., & Vazquez-Moreno, L. (2017). Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1242. <https://doi.org/10.3390/ijms18061242>
- Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A., & Vazquez-Moreno, L. (2017). Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1242. <https://doi.org/10.3390/ijms18061242>

- Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A.M., Candia-Plata, M.D., Vazquez-Moreno, L. (2009). Glycoproteomics of the Midgut Larval of *Zabrotes Subfasciatus* Associated to the Insecticidal Mechanism of Pf2 Lectin from *Olneya Tesota*. *Glycobiology* 19, 1348-1348.
- Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A.M., Urbano-Hernandez, G., Ortega-Nebblas, M.M., Robles-Burgueno, M.R., Winzerling, J., Vazquez-Moreno, L. (2009). Insecticidal Action of PF2 Lectin from *Olneya tesota* (Palo Fierro) against *Zabrotes subfasciatus* Larvae and Midgut Glycoconjugate Binding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 689-694.
- Lagarda-Diaz, I., Robles-Burgeño, M.R., Guzman-Partida, A.M., Geiser, D., Winzerling, J., Vazquez-Moreno, L. (2012). Binding of PF2 lectin from *Olneya tesota* to gut proteins of *Zabrotes subfasciatus* larvae associated with the insecticidal mechanism. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 2398-2402.
- Lal R, Amsdorf MF. (2010). Multidimensional atomic force microscopy for drug discovery: A versatile tool for defining targets, designing therapeutics and monitoring their efficacy. *Life Sci*, 86(15– 16):545–562. [PubMed: 20359578]
- Lam, S. K., & Ng, T. B. (2011). Lectins: production and practical applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(1), 45-55
- Lei-lei Fu, Cheng-cheng Zhou, Shun Yao, Jia-ying Yu, Bo Liu, Jin-ku Bao. (2011). Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Volume 43, Issue 10, Pages 1442-1449,
- Lekka M. (2016). Discriminación entre células normales y cancerosas usando AFM. *BioNanoScience* , 6, 65–80. <https://doi.org/10.1007/s12668-016-0191-3>
- Lekka, P. (1999). Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *Eur Biophys*, 28, 312-316.
- Leyto-Cruz F. (2018). Leucemia mieloide aguda. *Revista hematológica mexicana*. 19(1):24-40.
- Lim, G. Y. (2006). Biomechanics approaches to studying human diseases. *ELSEVIER*, 25, 111-118.
- Lityn, A., Ska, M., Przybył, M., Pohec, E., Hoja-Èukowicz, D., Ciołczyk, D., Laidler, P., Gil, D., Pi, ( A, Lityn, A., Ska, M., Przybył, E., Pohec, D., & Hoja-Èukowicz, ). (n.d.). Comparison of the lectin-binding pattern in different human melanoma cell lines.
- López Laredo Alma Rosa. (2005). Caracterización de los oligosacáridos de las lectinas de *Olneya tesota* PF2 y su isoforma más abundante (IF2) y establecer la relación con la función de reconocimiento. Tesis maestría. Centro de Investigación en alimentación y desarrollo. Sonora, México.
- Luo, Z., Güven, S., Gozen, I., Chen, P., Tasoglu, S., Anchan, R. M., ... & Demirci, U. (2015). Deformation of a single mouse oocyte in a constricted microfluidic channel. *Microfluidics and nanofluidics*, 19, 883-890.
- Mazalovska M, Kouokam JC. (2020). Plant-Derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools. *Biomed Res Int*, 15;2020:1631394. doi: 10.1155/2020/1631394. PMID: 32509848; PMCID: PMC7245692.
- Mitrus, I., Bryndza, E., Sochanik, A. y col. (2012). Modelos en evolución de origen y progresión tumoral. *Tumor Biol*. 33, 911–917. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0389-0>

- Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen C. (1993). An evaluation of the carcinoembryonic antigen (CEA) test for monitoring patients with resected colon cancer. *JAMA*, 270(8):943–947.
- Morales-Amparano, M. B., Ramos-Clamont Montfort, G., Baqueiro-Peña, I., Robles-Burgueño, M. del R., Vázquez-Moreno, L., & Huerta-Ocampo, J. Á. (2019). Proteomic response of *Saccharomyces boulardii* to simulated gastrointestinal conditions and encapsulation. *Food Science and Biotechnology*, 28(3), 831–840. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0508-9>
- Nasi, A., Picariello, G., & Ferranti, P. (2009). Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. *Journal of Proteomics*, 72(3), 527–538. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.02.001>
- NIH. (2017). Types of Cancer Treatment. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>
- OMS. (2016). Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Ortega-Nieblas, M., Vázquez-Moreno, L., y Robles-Burgueño, MR (1996). Calidad de la proteína y factores antinutricionales de las semillas de leguminosas silvestres del desierto de Sonora. *Revista de Química Agrícola y Alimentaria*, 3130-3132. <https://doi.org/10.1021/jf9506139>
- Ortega-Nieblas, M. M. (1993). Estudios de algunas semillas de leguminosas del desierto de Sonora. Factores antinutricionales y calidad de sus proteínas y aceites. Hermosillo, Sonora: CIAD, A. C.
- Pachenari M, Seyedpour SM, Janmaleki M, Shayan SB, Taranejoo S, Hosseinkhani H. (2014). Mechanical properties of cancer cytoskeleton depend on actin filaments to microtubules content: investigating different grades of colon cancer cell lines. *Journal of biomechanics*, 22;47(2):373-9.
- Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. (2012). Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 366(12):1079-1089
- Peel S, Bulmer JC. (1996). Lectins histochemistry of pregnant rat uterine tissues. *J Anat*, 188(Pt 1):197-205.
- Pinedo, M., Genoula, M., Silveyra, M.X., De Oliveira Carvalho, A., Regente, M., Del Río, M., Ribeiro Soares, J., Moreira Gomes, V., De La Canal, L. (2017). Anti-Neuroblastoma Properties of a Recombinant Sunflower Lectin. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 92.
- Procópio, T.F., de Siqueira Patriota, L.L., de Moura, M.C., da Silva, P.M., de Oliveira, A.P.S., do Nascimento Carvalho, L.V., de Albuquerque Lima, T., Soares, T., da Silva, T.D., Coelho, L.C.B.B. (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, 419-429.
- Pryme IF, Bardocz S, Puztai A, Ewen SWB. (2006). Suppression of growth of tumor cell lines in vitro and tumors in vivo by mistletoe lectins. *Histol Histopathol*, 21:285–99
- Rosenberg SA. (2000). Principios de tratamiento del cáncer: cirugía oncológica. En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editores. *Cáncer. Principios y Práctica de Oncología*. 5ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana, SA y Arán Ediciones, SA, p. 295-306.
- SEOM. (2019). ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica  
 ©<https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla?showall=1>

- Sharma S, Santiskulvong C, Bentolila LA, Rao J, Dorigo O, Gimzewski JK. (2012). Correlative nanomechanical profiling with super-resolution F-actin imaging reveals novel insights into mechanisms of cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Nanomedicine*, 8(5):757–766.
- Sharon, N., Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14, 53r-62r.
- Shen, L., Luo, Z., Wu, J., Qiu, L., Luo, M., Ke, Q., & Dong, X. (2017). Enhanced expression of  $\alpha$ 2,3-linked sialic acids promotes gastric cancer cell metastasis and correlates with poor prognosis. *International Journal of Oncology*, 50(4), 1201–1210.
- Singh, H., & Sarathi, S. P. (2012). Insight of Lectins-A review. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 3, 1-9.
- Solis-Garza, G., Robles-López, H., & Castellanos-Villegas, A. E. (2017). Estructura y composición de la vegetación ribereña en zonas áridas. el caso de los ríos bacanuchi y sonora en el noroeste de México. *Biotecnia*, 19(2), 3–12. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v19i2.378>
- Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. (2004). Acute myeloid leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*, 98-117.
- Strelkov, S. V., Herrmann, H. y Aebi, U. (2003). Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* 25, 243-251.
- Suela Rubio, J. (2008). Estudio Genómico De La Leucemia Mieloide Aguda. Doctorado. Universidad Autónoma de Madrid.
- Suresh S. (2007). Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Materialia*, 1;55(12):3989-4014.
- Toscano, M. (2006). Interacción entre proteínas y glicanos en la regulación fisiológica de las células T. División Inmunogenética, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. 66: 357-362
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350–4354.
- Urbano-Hernandez, G. (2007). Identificación de estructuras glicosídicas reconocidas por la lectina PF2 en fetuina y tejidos linfoides, *Ciencias de los Alimentos*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora, Mexico.
- Vázquez-Moreno, L., Ortega-Nieblas, M., Robles-Burgueño, M.R., Ramos-Clamont, G. (2000). Purification of complex carbohydrate specific lectins from *Olneya tesota* seeds using tandem affinity chromatography. *Int. J. Bio-chromatogr.* 5, 83-90.
- Wang K, Wang X, Hou Y, Zhou H, Mai K, He G. (2019). Apoptosis of cancer cells is triggered by selective crosslinking and inhibition of receptor tyrosine kinases. *Commun Biol*, 2:1–11.
- Weinstein, JN, Collisson, EA, Mills, GB, Shaw, KR, Ozenberger, BA, Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C., Stuart, JM y Cancer Genome Atlas Research Network. (2013). El proyecto de análisis de cáncer del cáncer del genoma del Atlas. *Nature genetics* , 45 (10), 1113–1120. <https://doi.org/10.1038/ng.2764>
- Wray, W., Bouliskas, T., Wray, V.P., Hancock, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 118, 197–203.

- Yallapu, M. M., Katti, K. S., Katti, D. R., Mishra, S. R., Khan, S., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2015). The roles of cellular nanomechanics in cancer. *Medicinal research reviews*, 35(1), 198–223. <https://doi.org/10.1002/med.21329>
- Yao Chen, Kefan Guo, Lin Jiang, Shu Zhu, Zhonghua Ni, Nan Xiang. (2023). Microfluidic deformability cytometry: A review, *Talanta*, Volume 251, 123815, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123815>.
- Yau, T., Dan, X., Ng, C.C.W., Ng, T.B. (2015). Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules* 20, 3791-3810.

# ANEXOS

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 262 (2022) 110770



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cbpb](http://www.elsevier.com/locate/cbpb)



Research Article

## Characterization and expression of prohibitin during the mexican bean weevil (*Zabrotes subfasciatus*, Boheman, 1833) larvae development

Diana Villegas-Coronado<sup>a</sup>, Ana María Guzman-Partida<sup>a,\*</sup>, Emmanuel Aispuro-Hernandez<sup>a</sup>, Luz Vazquez-Moreno<sup>a</sup>, José Ángel Huerta-Ocampo<sup>b</sup>, José Andre-i Sarabia-Sainz<sup>c</sup>, Nayelli Guadalupe Teran-Saavedra<sup>c</sup>, Christian Minjarez-Osorio<sup>d</sup>, Reina Castro-Longoria<sup>d</sup>, Amir Maldonado<sup>e</sup>, Irlanda Lagarda-Diaz<sup>f,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, 83304, Mexico

<sup>b</sup> CONACYT-Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, 83304, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Investigación en Física, Universidad de Sonora, Hermosillo, 83190, Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, 83000, Mexico

<sup>e</sup> Departamento de Física, Universidad de Sonora, Hermosillo, 83000, Mexico

<sup>f</sup> CONACYT- Departamento de Física, Universidad de Sonora, Hermosillo, 83000, Mexico



### ARTICLE INFO

Edited by: Chris Moyes

#### Keywords:

Prohibitin  
*Zabrotes subfasciatus*  
Insect larvae  
Structural features  
Transcript levels  
Histological detection

### ABSTRACT

Prohibitin (PHB) is a highly conserved eukaryotic protein complex involved in multiple cellular processes. In insects, PHB has been identified as a potential target protein to insecticidal molecules acting as a receptor of PF2 insecticidal lectin in the midgut of *Zabrotes subfasciatus* larvae (bean pest) and Cry protein of *Bacillus thuringiensis* in *Leptinotarsa decemlineata* (Colorado potato beetle). This study aimed to characterize the structural features of *Z. subfasciatus* prohibitin (ZsPHB) by homology modeling and evaluate its expression and tissue localization at different stages of larval development both at the transcript and protein levels. The samples were collected from eggs and larvae of different developmental stages. The immunodetection of ZsPHB was done with anti-PHB1 and confirmed by LC-MS/MS analysis. Gene expression analysis of ZsPHB1 and ZsPHB2 was performed by RT-qPCR, and immunohistochemistry with FITC-labeled anti-PHB1. Results showed that ZsPHBs exhibit distinctive characteristics of the SPFH protein superfamily. The transcript levels suggest a coordinated expression of ZsPHB1 and ZsPHB2 genes, while ZsPHB1 was detected in soluble protein extracts depending on the stage of development. Histological examination showed ZsPHB1 is present in all larval tissues, with an intense fluorescence signal observed at the gut. These results suggest a physiologically important role of PHB during *Z. subfasciatus* development and show its regulation occurs at the transcriptional and post-transcriptional levels. This is the first characterization of PHB in *Z. subfasciatus*.

## Antiproliferative Potential of *Olneya tesota* PF2 Lectin in Human Acute Monocytic Leukemia Cells

Diana Villegas-Coronado,<sup>[a]</sup> Jesús Adriana Soto-Guzman,<sup>[b]</sup> Juan Manuel Martínez-Soto,<sup>[b]</sup> Nayelli Guadalupe Teran-Saavedra,<sup>[a]</sup> Ana Maria Guzman-Partida,<sup>[c]</sup> Luz Vazquez-Moreno,<sup>[c]</sup> Ana Gloria Villalba-Villalba,<sup>[d]</sup> Amir Maldonado,<sup>\*[e]</sup> and Irlanda Lagarda-Díaz<sup>\*[d]</sup>

Acute monocytic leukemia is a type of myeloid leukemia that develops in monocytes. The current clinical therapies for leukemia are unsatisfactory due to their side effects and nonspecificity toward target cells. Some lectins display antitumor activity and may specifically recognize cancer cells by binding to carbohydrate structures on their surface. Therefore, this study evaluated the response of the human monocytic leukemia cell lines THP-1 to the *Olneya tesota* PF2 lectin. The induction of apoptosis and reactive oxygen species production in PF2-treated cells was evaluated by flow cytometry, and the

lectin-THP-1 cell interaction and mitochondrial membrane potential were evaluated by confocal fluorescence microscopy. PF2 genotoxicity was evaluated by DNA fragmentation analysis via gel electrophoresis. The results showed that PF2 binds to THP-1 cells, triggers apoptosis and DNA degradation, changes the mitochondrial membrane potential, and increases reactive oxygen species levels in PF2-treated THP-1 cells. These results suggest the potential use of PF2 for developing alternative anticancer treatments with enhanced specificity.



### UNIVERSIDAD DE SONORA DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES DEPARTAMENTO DE FÍSICA

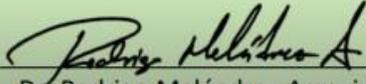
Otorgan la presente

CONSTANCIA

**A: Diana Laura Villegas Coronado**

Por su asistencia al curso-Taller “Fundamentos, Técnicas y Aplicaciones del Cultivo Celular en la Investigación”, el cual se llevó a cabo de manera mixta virtual-presencial del 18 de abril al 20 de mayo de 2022, con una duración de 60 horas.

  
Dra. Irlanda Lagarda Díaz  
Instructora

  
Dr. Rodrigo Meléndrez Amavizca  
Director de la División de Ciencias  
Exactas y Naturales

  
Dra. Lerma Hanaíy Chan Chan  
Instructora





Se otorga por medio de la **Licenciatura en Biología** y el **Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora**, la presente

## CONSTANCIA A:

**Diana Villegas Coronado, A. M. Guzmán Partida, E. Aispuro Hernández, L. Vázquez Moreno, J. A. Huerta Ocampo, J. A. Sarabia Sainz, N. G. Terán Saavedra, C. Minjarez Osorio, R. Castro Longoria, A. Maldonado, I. Lagarda Diaz**

Por su valiosa participación impartiendo la Ponencia **"Expresión de prohibitina durante el desarrollo de larvas del gorgojo del frijol *Zabrotes subfasciatus*, Boheman, 1833"** el día **jueves 06 de octubre de 2022** en el **XVII Congreso Estudiantil de Biología de la Universidad de Sonora**, realizado en Hermosillo, Sonora, México.

**Dr. Enrique De la Re Vega**  
Jefe del Departamento de  
Investigaciones Científicas y  
Tecnológicas

**Dr. Alf Enrique Meling López**  
Coordinador de la Licenciatura  
en Biología

**Adlai Alejandro Sanabria Ortega**  
Presidente del Comité Organizador  
del XVII Congreso Estudiantil de  
Biología





Hermosillo, Sonora a 07 de febrero del 2021

Villegas-Coronado Diana L., Martínez-Soto Juan M., Soto-Guzman Adriana J., Silva-Campa Erika, Guzmán-Partida Ana M., Vázquez-Moreno Luz, Maldonado-Arce Amir D., Lagarda-Díaz Irianda

Universidad de Sonora

Estimado(s) Colega(s),

A nombre del Comité Organizador del XIV Coloquio Bienal en Ciencia de Materiales "Responsabilidad Social en la Ciencia de los Materiales", a efectuarse del 10 al 12 de marzo de 2021 por medio de la plataforma ZOOM.

Le informamos que su trabajo titulado:

**"Estudio anti-proliferativo de la lectina PF2 de *Oñeya tesoto* sobre la línea celular monocitaria de leucemia aguda humana THP-1"**

ha sido aceptado para su presentación en modalidad Ponencia Virtual con No. CBCM-PV29. La sesión de ponencias virtuales está programada para el día jueves 11 de marzo de 12:30 a 13:30 h por medio de la plataforma ZOOM.

*Las instrucciones para la preparación de la ponencia virtual se encuentran en la página del coloquio:*  
[www.coloquiodipm.uson.mx](http://www.coloquiodipm.uson.mx)

Agradeciendo anticipadamente su participación, aprovechamos la ocasión para enviar un cordial saludo.

Atentamente

Comité Organizador  
XIV Coloquio Bienal en Ciencia de Materiales



El Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo,

otorga el presente

## RECONOCIMIENTO

a

**Villegas-Coronado D., Lagarda-Díaz I., Guzmán-Partida A. M.,  
Vázquez-Moreno L., Aispuro-Hernández E., Huerta-Ocampo J. Á.**

Por su valiosa participación en el Simposio de Cátedras CONACYT en Hermosillo, con la ponencia en modalidad cartel "**Expresión de prohibitina en el desarrollo del gorgojo de frijol *Zabrotes subfasciatus* Boheman, 1833 (Coleoptera: Bruchidae)**"

Hermosillo, Sonora; 4 de diciembre de 2019

**Aarón Fernando González Córdova**  
Coordinador de Vinculación

**Miguel Ángel Martínez Téllez**  
Coordinador de Investigación

**José Ángel Huerta Ocampo**  
Presidente del comité organizador



GOBIERNO DE  
MÉXICO



CONACYT



Centro de Investigación  
en Alimentación y Desarrollo

EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO  
OTORGA EL PRESENTE

# RECONOCIMIENTO

A

**DIANA VILLEGAS-CORONADO,  
JUAN MANUEL MARTÍNEZ-SOTO,  
JESÚS ADRIANA SOTO-GUZMAN,  
ANA MARÍA GUZMAN-PARTIDA,  
LUZ VAZQUEZ-MORENO,  
JOSÉ ANDRE-I SARABIA-SAINZ,  
NAYELLI GUADALUPE TERAN-SAAVEDRA,  
AMIR MALDONADO,  
IRLANDA LAGARDA-DIAZ**

Por su valiosa participación con la presentación presencial del póster científico "La lectina PF2 de *Oleaya tesota* exhibe efectos apoptóticos y peligro celular en la línea celular de monocitos humanos derivados de un paciente con leucemia monocítica aguda (THP1)", durante el Simposio "Divulgando el quehacer de las y los comisionados Conacyt"

PABLO WONG GONZÁLEZ  
DIRECTOR GENERAL

18 Y 19 DE OCTUBRE, HERMOSILLO, SONORA, MÉXICO





Universidad de Sonora  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Departamento de Agricultura y Ganadería



otorga la presente:

# CONSTANCIA

*A: Diana Laura Villegas Coronado*

Por asistir al TALLER de:

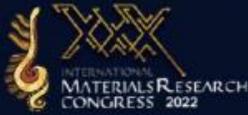
**“ Cultivos Celulares ”**

Dentro del evento SEMANA DEL ADN 2022, que se impartió a estudiantes de la Licenciatura en Ciencias Genómicas de la Universidad de Sonora. Modalidad presencial con duración de 4 horas.

Hermosillo, Sonora, 11 de mayo de 2022.

**Dr. Aarón Alberto Martínez Higuera**  
Coordinador Académico de el  
Programa de LCG

**Dr. Andrés Ochoa Meza.**  
Jefe del Departamento de  
Agricultura y Ganadería



The Organizing Committee  
Acknowledges the Participation of

**Diana Villegas-Coronado**

in the

**XXX International Materials Research Congress  
& International Conference on Advanced Materials**

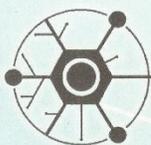
held in Cancun, Mexico  
from August 14th to 19th, 2022

**Patricia del C. Zambrano Robledo**  
SMMater President

Sociedad Mexicana  
de Materiales A.C.

INTERNATIONAL RESEARCH SOCIETY  
ON ADVANCED MATERIALS





ESCUELA NACIONAL  
DE  
BIOFÍSICA MOLECULAR



Otorga la presente **constancia** a

**Diana L. Villegas-Coronado, Ana M. Gúzman-Partida, Emmanuel Aispuro-Hernández, Luz Vázquez-Moreno, Christian Minjarez, Reina Castro-Longoria, José A. Huerta-Ocampo, Nayelli Terán-Saavedra, Irlanda Lagarda-Díaz**

Por la presentación del POSTER “*Expresión Génica e Inmunofluorescencia de Prohibitina en Zabrotes subfasciatus*” en la **XX Escuela Nacional de Biofísica Molecular** celebrada del 10 – 13 de diciembre de 2019 en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México.

Dr. Armando Ayala Corona  
Jefe del Departamento de Física

Dr. Rodrigo Melendrez Amavizca  
Director de la División de Ciencias  
Exactas y Naturales



ESCUELA NACIONAL  
DE  
BIOFÍSICA MOLECULAR



Otorga la presente **constancia** a

**Villegas-Coronado Diana L., Martínez-Soto Juan M., Soto-Guzman Adriana J., Silva-Campa Erika, Guzmán-Partida Ana M., Vázquez-Moreno Luz, Maldonado Amir, Lagarda-Díaz Irlanda**

Por la presentación del Trabajo “*Estudio antiproliferativo de la lectina PF2 de Olneya tesota sobre la línea celular monocitaria de leucemia aguda humana THP-1*” en la **XXI Escuela Nacional de Biofísica Molecular** celebrada del 8 – 11 de diciembre de 2020 en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México.



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# LA UNIVERSIDAD DE SONORA

Otorga el presente

## RECONOCIMIENTO

A través de la  
División de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Investigación en Física  
de la unidad regional centro

A:

Villegas-Coronado Diana, Martínez-Soto Juan Manuel, Soto-Guzman Jesús Adriana, Guzman-Partida Ana María, Vazquez-Moreno Luz, Sarabia-Sainz José Andre-I, Teran-Saavedra Nayelli Guadalupe,  
Por haber presentado el poster:

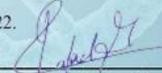
Olneya tesota lectin PF2 against human monocyte cell line derived from a patient with acute monocytic leukemia (THP1)

en la XXV Reunión Universitaria de Investigación en Materiales RUM 2022, realizada los días 9, 10 y 11 de noviembre de 2022.

Hermosillo, Sonora a 11 de noviembre de 2022.

  
Dr. Jorge Gaspar Armenta  
Jefe del Departamento de  
Investigación en Física



  
Dr. Rafael García Gutiérrez  
Presidente del Comité Organizador  
RUM 2022

## Antiproliferative Potential of *Olneya tesota* PF2 Lectin in Human Acute Monocytic Leukemia Cells

Diana Villegas-Coronado a, Jesús Adriana Soto-Guzman b, Juan Manuel Martínez-Soto b, Nayelli Guadalupe Teran-Saavedra a, Ana María Guzman-Partida c, Luz Vazquez-Moreno c, Ana Gloria Villalba- Villalba d, Amir Maldonado e\*, Irlanda Lagarda-Diaz d\*

a Departamento de Investigaciones en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora 83000, Mexico.

b Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Hermosillo, 83000, Mexico.

c Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, 83304, Mexico.

d CONACyT-UNISON, Departamento de Física, Universidad de Sonora, Hermosillo, 83000, Mexico.

e Departamento de Física, Universidad de Sonora, Hermosillo, 83000, Mexico.

\*irlanda.lagarda@unison.mx

\*amir.maldonado@unison.mx

Acute monocytic leukemia is a type of myeloid leukemia that develops in monocytes. The current clinical therapies for leukemia are unsatisfactory due to their side effects and nonspecificity toward target cells. Some lectins display antitumor activity and may specifically recognize cancer cells by binding to carbohydrate structures on their surface. Therefore, this study evaluated the response of the human monocytic leukemia cell line THP-1 to the *Olneya tesota* PF2 lectin. The induction of apoptosis and reactive oxygen species production in PF2-treated cells was evaluated by flow cytometry, and the lectin-THP-1 cell interaction and mitochondrial membrane potential were evaluated by confocal fluorescence microscopy. PF2 genotoxicity was evaluated by DNA fragmentation analysis via gel electrophoresis. The results showed that PF2 binds to THP-1 cells, triggers apoptosis and DNA degradation, changes the mitochondrial membrane potential, and increases reactive oxygen species levels in PF2-treated THP-1 cells. These results suggest the potential use of PF2 for developing alternative anticancer treatments with enhanced specificity.

Keywords: Acute myeloid leukemia, THP-1 cells, PF2 lectin, Anticancer, Cytotoxic, Apoptosis.

### Introduction

Cancer is a major public health problem worldwide, causing an estimated 24.5 million incident cases and 9.6 million deaths reported globally [1]. Leukemia is a type of cancer that develops due to the malignant transformation of pluripotent hematopoietic stem cells that can give rise to both myeloid and lymphoid precursors. Leukemic blasts can undergo clonal expansion and proliferation, promoting alterations in the function and development of normal blood components and their replacement by malignant cells, which can ultimately lead to clinical symptoms [2].

Despite advances in leukemia treatments, a combination of chemotherapy, radiotherapy, and allogeneic stem cell transplantation remains the standard therapeutic regimen for eligible candidates. However, many patients are unable to tolerate such regimens and have a particularly poor prognosis [3]. Although chemotherapy has reduced morbidity and mortality rates [1], current chemotherapeutic agents have nontargeted systemic distribution and can damage healthy cells, possibly leading to side effects and other clinical complications and

even decreasing quality of life in terminal cancer patients. Hence, there is a need for the discovery of new anticancer drugs with higher specificity toward cancer cells and less severe harmful side effects [4–7].

Tumor cells often exhibit a glycosylation pattern rich in sialylated glycans, which differs from that observed in normal cells. Abnormal glycosylation plays a vital role in cancer cell proliferation, invasion, and migration [8,9]. Some lectins can bind to glycan structures on tumor cells and exert an antiproliferative effect. Lectins are proteins of nonimmune origin that can recognize and bind to simple or complex carbohydrates in a reversible and highly specific manner. A few lectins isolated from legume plants, such as those of the *Vicia* genus, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, and *Pisum sativum*, have been reported to display anticancer activity through induction of apoptosis-induced cell death [10–15]. Therefore, screening the antiproliferative potential of novel lectins with recognition specificity for cancer cells may lead to the development of targeted anticancer therapies.

The PF2 lectin, isolated from the seeds of the desert wild legume *Olneya tesota* (desert ironwood), is toxic to the *Zabrotes subfasciatus* beetle and displays recognition specificity for triantennary tetrasialylated glycans [16]. Furthermore, the expression of proteins recognized by PF2 varies according to the life cycle stage of the insect [17]. Interestingly, the sialylation levels and profiles of sialoglycoconjugates on the surface of and within THP-1 monocytes vary during differentiation into macrophages and subsequent polarization [18].

Considering that acute myeloid leukemia is characterized by alterations in the monocyte lineage and development, this study aims to explore the antitumor potential of PF2 by evaluating its capacity to recognize human acute leukemia cell and exert an antiproliferative effect and to advance the understanding of its mechanism of action using the monocytic THP-1 cell line as a model *in vitro*.

## Results and Discussion

### PF2 lectin recognizes THP-1 monocytes

The cellular distribution of PF2 lectin was explored using confocal microscopy. FITC-labeled PF2 was tested for its binding capacity to THP-1 cells. Figure 1 shows representative images of the cellular localization of PF2 lectin in THP-1 cells. PF2 lectin was internalized into THP-1 cells, demonstrating the presence of the tetrasialylated complex glycan structure type that is recognized by this lectin.

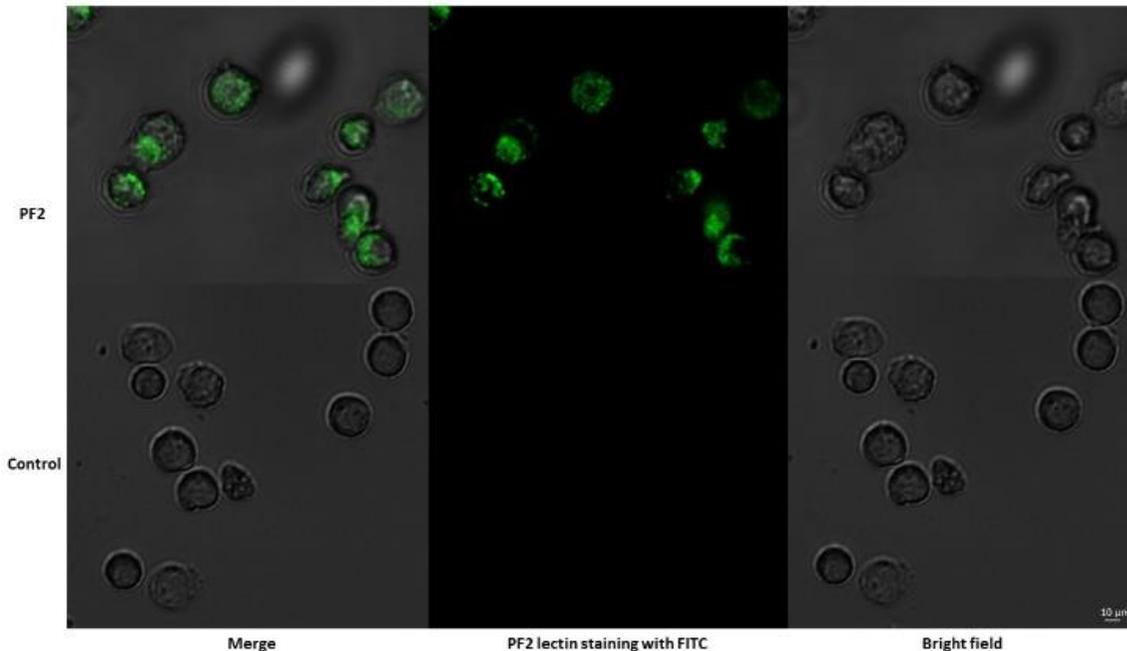


Figure 1. Confocal fluorescence image of THP-1 monocytes in the presence of PF2. Confocal fluorescence images were obtained with a confocal microscope with a 20X objective. THP-1 cells were incubated with 10 µg/mL FITC-labeled PF2, and the negative control cells were incubated with PBS. The emission of green fluorescence corresponds to THP-1 monocyte recognition by FITC-PF2 lectin.

In this study, we used fluorescently labeled FITC-PF2 to visualize the interaction between THP-1 monocytes and PF2 lectin by confocal fluorescence microscopy. PF2 lectin was able to recognize glycan structures found in THP-1 cells. PF2 has been described to bind to complex carbohydrates of the triantennary tetrasialylated type [19]. Additionally, PF2 lectin was able to recognize a number of soluble and membrane proteins in the *Z. subfasciatus* middle intestine during larval development. The PF2 lectin targets identified in *Z. subfasciatus* included  $\alpha$ -amylase, the V-type proton ATPase, arginine kinase, prohibitin, polyubiquitin, actin, ATP-dependent RNA helicase, ATP synthase subunit alpha, mitochondrial-processing peptidase,  $\alpha$ -tubulin, the odorant receptor, and cytochrome c oxidase [15, 16, 20, 21]. This suggests that these proteins could potentially mediate lectin toxicity. Thus, PF2 could interact with the orthologous receptors on human THP-1 cells. However, further studies are necessary to identify PF2 receptors on THP-1 cells.

Since the synthesis of glycan structures is a dynamic process that varies across cellular developmental stages, and alterations in the abundances of specific carbohydrates and in glycosylation patterns occur in cancer cells, it would be interesting to explore whether PF2 lectin can recognize specific glycoconjugates in

malignant monocytes that are absent on nonmalignant monocytes. In fact, plant lectins have been used to distinguish between cancer cells and normal cells [22]. Some lectins have been found to act as biomarkers for cancer diagnosis, while others exhibit antiproliferative activity after binding to their respective glycocalyx receptors. For instance, the binding of *Ricinus communis* agglutinin I (RCA-1) to breast cancer cells was found to be proportional to the stage of tumor metastasis [23]. Lectins with specificity toward glycosylated epitopes have been used in the clinical setting as pathology detection tools. Jacalin is a galactose-specific binding lectin isolated from *Artocarpus integrifolia*. This lectin accommodates both T and Tn antigens in its extended binding site and therefore has been used as a good candidate for histochemical detection of cancer cells. Lectin detection is a feasible approach for cancer detection because of the proficiency of lectin in binding to specific carbohydrates in cancer cells [24, 25]. Therefore, screening the antiproliferative activity of lectins is worthwhile.

PF2 inhibits the proliferation and induces the apoptosis of THP1 cells

PF2 lectin treatment significantly reduced cell viability with respect to that of control cells, suggesting that PF2 lectin exerts a cytotoxic effect on THP-1 cells in a linear concentration-dependent manner. Figure 2 shows the percentages of viable lectin-treated THP-1 cells after 24 h of exposure.

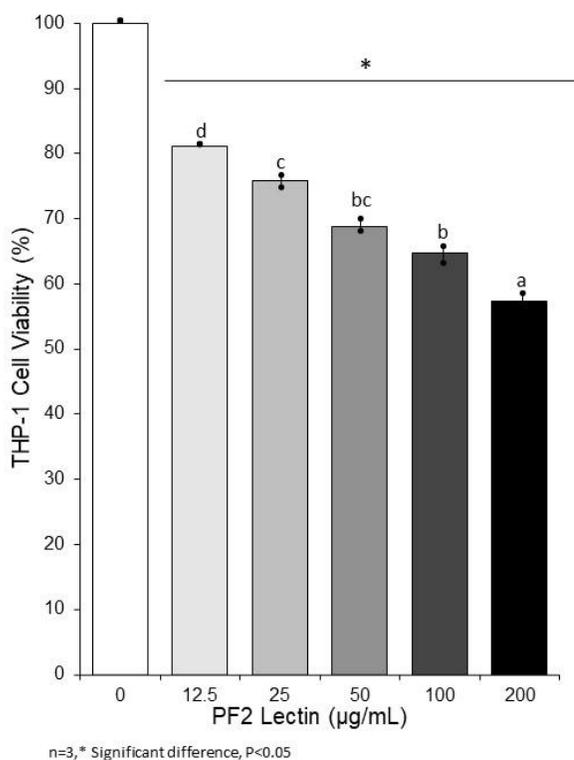


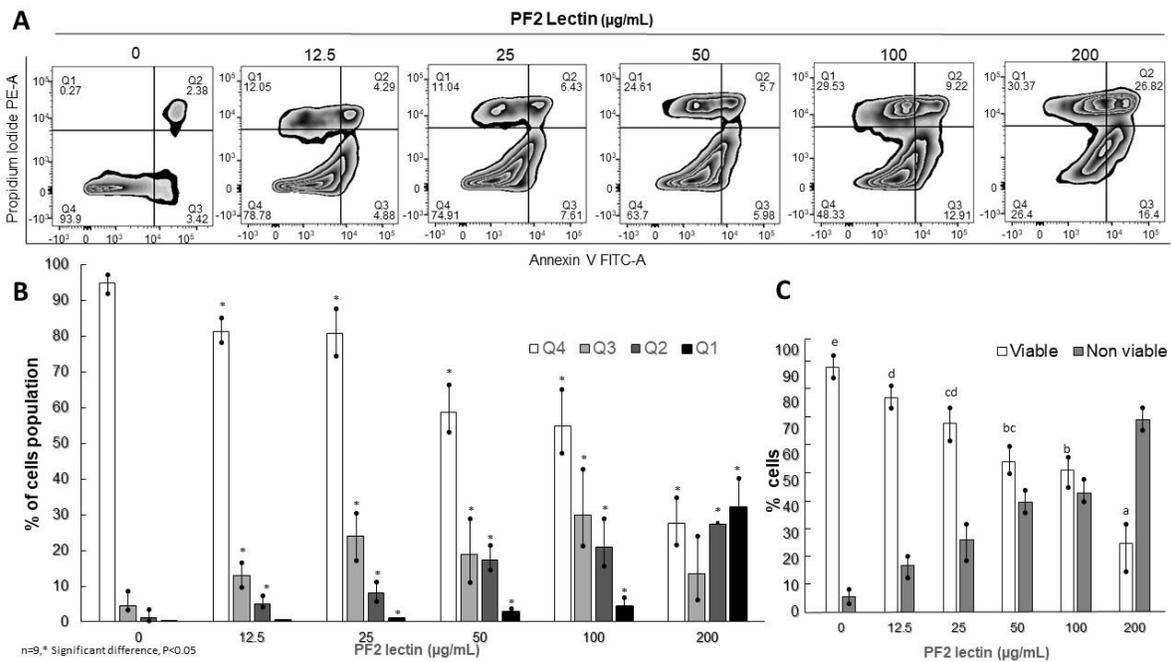
Figure 2. The viability of THP-1 cells was evaluated after treatment with increasing concentrations of PF2 for 24 h. Cell viability was quantified as the percentage of

viable cells normalized to the percentage of viable cells in the untreated (control) group (100%). The bars indicate the mean cell viability percentages, and the error bars indicate the standard deviations calculated from triplicates. The different letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

To understand the mechanism involved in the cytotoxicity of PF2 lectin, we evaluated the induction of programmed cell death in lectin-treated THP-1 cells by flow cytometry with propidium iodide PE-A and Annexin V-FITC-A. The labeling of cells with these fluorophores allows the generation of distinct fluorescence patterns that can be detected by flow cytometry and can then be organized and plotted in four quadrants (Q) representing different cell populations: Q1 contains nonviable cells, which have lost membrane integrity; Q2 contains the population of late apoptotic cells; Q3 contains early apoptotic cells; and Q4 contains viable cells.

As shown in Figure 3, treatment of THP-1 cells with PF2 lectin led to significant increases in the populations of early and late apoptotic cells with respect to untreated cells. In particular, after treatment with the highest tested lectin concentration of 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the population of nonviable cells peaked, and the percentage of viable cells fell below 30%. The calculated IC50 value for PF2 lectin was  $117.43 \pm 19.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

Numerous studies have shown that induction of apoptosis via the activation of multiple caspases is a common mechanism of various lectins. Therefore, the next step was to analyze the effect of PF2 treatment (117.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 3 h) on the expression of caspases that initiate apoptosis. No significant changes in the expression levels of caspase 8 and caspase 9 were triggered in cells by a 3-h incubation with PF2 (Figure S1). It is necessary to evaluate whether the expression of these caspases increases with varying exposure times.



**Figure 3.** Flow cytometric analysis of THP1 monocytes exposed to PF2 lectin using fluorescence labeling with annexin V-FITC and propidium iodide. The negative control group consisted of PBS-treated cells. **A.** Representative zebra plots. The quadrants contain nonviable (Q1), late apoptotic (Q2), early apoptotic (Q3), and viable (Q4) cells. **B.** Percentages of the cell population in each of the quadrants in the flow cytometry dot plots. **C.** Percentages of viable and nonviable cells. The bars indicate the means  $\pm$  SDs ( $n=3$ ). The different letters corresponding to the quadrants indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) compared with the untreated control.

Our results showed that PF2 affected THP-1 monocyte viability. Potential anticancer molecules must fulfill the main requirement of cytotoxicity toward cancer cells, which have developed mechanisms to prevent cell death. This is the first study revealing the cytotoxicity of PF2 lectin to cancer cells. Certain lectins have been reported to trigger cytotoxic effects, apoptosis, or necrosis in cancer cells [22, 26]. For example, chitin-specific lectins isolated from *Benincasa hispida* (BhL) and *Datura innoxia* (DiL9) arrested the proliferation of human pancreatic cancer cells [27]. Similarly, the DLasiL lectin from *Dioclea sclerocarpa* exhibited potent anticancer activity by arresting the proliferation of ovarian and prostate tumor cell lines [28]. A mannose-binding lectin purified from the tuber *Pinellia pedatisecta* led to cell death in lung carcinoma and hepatocellular carcinoma cell lines [29]. Additionally, a lectin from *Pinellia ternata* inhibited sarcoma cell and HeLa cell proliferation [30]. The IC50 value of PF2 ( $117.43 \pm 19.5 \mu\text{g/mL}$ ) in THP-1 cells is comparable to the values reported for the *Vicia palaestina* lectin ( $75 \mu\text{g/mL}$ ) [31], DiL9 lectin ( $1000 \mu\text{g/mL}$ ), BhL lectin ( $208 \mu\text{g/mL}$ ) [32] and other plant lectins in several cancer cell lines (Table

1) evaluated [33]. Further studies should address the specificity/toxicity relationships for potential anticancer drugs.

Table 1. IC50 values of legume lectins in cancer cell lines.

<b>Lectin</b>	<b>Cell line</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>
<b><i>Astragalus mongholicus</i> lectin (AMM)L</b>	HeLa, K562, and MG63	0.08
<b><i>Bauhinia unguolata</i> lectin (BUL)</b>	HT-29	0.16
<b><i>Calliandra surinamensis</i> lectin (Casul)</b>	K562	0.67
	T-47D	0.58
<b><i>Dioclea lasiocarpa</i> lectin (DLasiL)</b>	A2780	0.0065
	A549	0.01037
	MCF-7	0.127
	PC3	0.027
<b><i>Dioclea violacea</i> lectin (DVL)</b>	Rat C6 glioma	0.58
<b><i>Glycine max</i> lectin (SBL)</b>	HeLa	0.06
	Hep2	0.02
	HepG2	0.04
	MDA MB	0.04
	U373 MG	0.051
<b><i>Lotus corniculatus</i> lectin (LCL)</b>	THP-1	0.039
	HOP62	0.05
	HCT116	0.06
<b><i>Moringa oleifera</i> lectin (cMoL)</b>	B16-F10	2.58
<b><i>Sophora alopecuroides</i> lectin (SAL)</b>	HeLa	0.249
<b><i>Phaseolus acutifolius</i> lectin (TLF)</b>	3T3/v-mos	0.27
<b><i>Phaseolus acutifolius</i> (TBL)</b>	Sw480	0.84
	C33-A	0.4

<b><i>Phaseolus vulgaris</i> lectin (PHA)</b>	Lymphoid tumor	7.0
<b><i>Phaseolus vulgaris</i> cv. white kidney bean lectin (WKBL)</b>	HONE1	0.672
	HepG2	0.6
	MCF7	0.127
<b><i>Olnya tesota</i> (PF2)</b>	THP1	0.117

To partially elucidate the mechanism by which PF2 exerts an antiproliferative effect on THP-1 cells, we studied the pathway of cell death activated in PF2-treated cells, as well as the induction of gDNA damage, reactive oxygen species (ROS) accumulation, and mitochondrial membrane depolarization. The main pathway by which the PF2 lectin induces THP-1 cell death is the apoptosis pathway, as confirmed by the flipping of phosphatidylserine to the outside of the cell membrane, allowing the binding of FITC-Annexin V, which was detected by flow cytometry.

Regarding the investigations of apoptosis induction, we analyzed four distinct populations (Q1: nonviable, Q2: late apoptotic, Q3: early apoptotic, and Q4: viable) of THP-1 cells exposed to PF2 and compared them to the corresponding populations of untreated cells. In this work, the PF2 concentrations in all treated cell populations varied significantly from those in the control populations, confirming the apoptotic effect of this lectin on the cells studied. At concentrations ranging from 12.5 to 100 µg/mL, the largest population of apoptotic cells was early apoptotic cells. This indicates that PF2 lectin induces THP-1 cell death through a programmed process. A higher number of necrotic cells was also found after treatment with the highest concentration (200 µg/mL). Therefore, the cell death pathway induced is also a function of the lectin concentration used. The nature of cell death inducers can be diverse. For example, the same inducer can activate both necrosis and/or apoptosis depending on the concentration, incubation time, cancer cell type, and cell development stage [34].

PF2 lectin induces DNA fragmentation, ROS production and mitochondrial membrane potential loss in THP-1 cells

Figure 2 shows that PF2 induced gDNA degradation in THP-1 cells at concentrations as low as 10 µg/mL. This is evidenced by the ladder-like appearance of the bands on the agarose gel, instead of band smearing indicative of random DNA fragmentation as occurs in necrosis. DNA from PBS-treated cells remained intact, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and dexamethasone were used for comparison purposes since they are known inducers of DNA fragmentation and apoptosis.

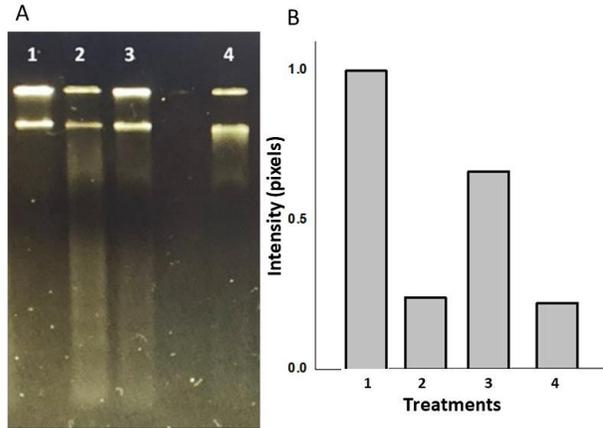


Figure 4. Degradation of gDNA. A. Analysis of genomic DNA fragmentation in THP-1 cells treated with PF2 for 6 h. Line 1= DNA from PBS-treated cells (negative control); Line 2 = DNA from 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells; Line 3 = DNA from 10 mM dexamethasone-treated cells; Line 4 = DNA from 10 µg/mL PF2 lectin-treated cells. B. Semiquantitative values of gDNA band intensities (pixels).

ROS play an important role in inducing apoptosis in various cell types. THP-1 cells incubated with different concentrations of PF2 lectin exhibited increased ROS accumulation in a concentration-dependent manner (Figure 5). At a concentration of 200 µg/mL, PF2 lectin induced an increase in ROS levels compared to untreated cells.

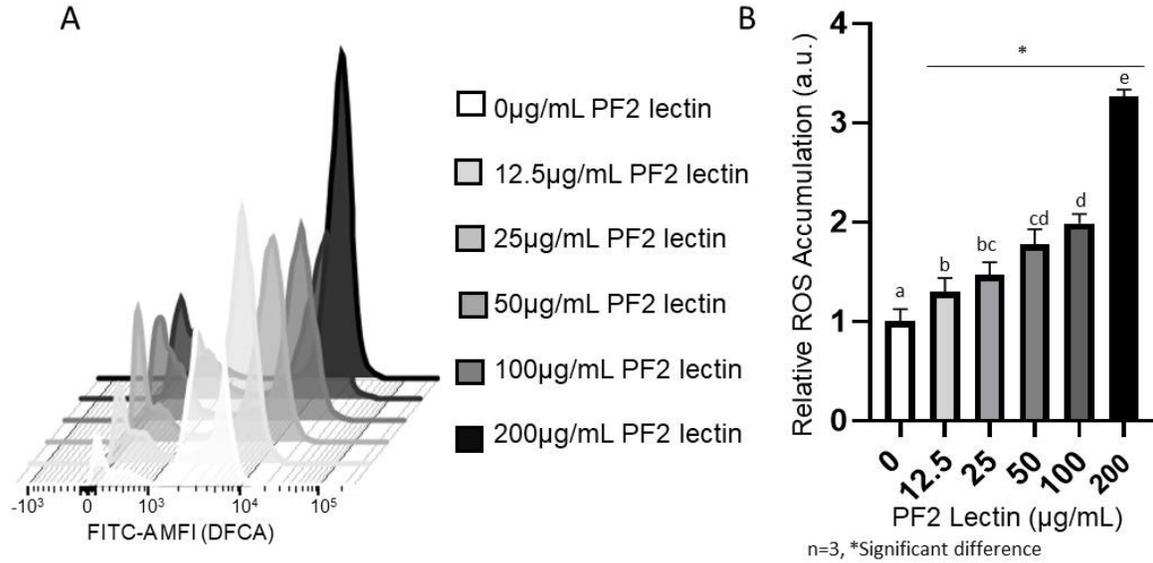


Figure 5. Relative ROS accumulation in THP-1 monocytes exposed to different concentrations of PF2 lectin. A. Flow cytometric quantification of ROS accumulation by the fluorescent dichlorofluorescein (DFCA) reaction. B. Representative histograms of the mean ( $\pm$  SD) fluorescence intensity (MFI) of DFCA (in the FITC-A channel). The data are expressed as the MFI values in  $1 \times 10^4$  cells. Relative ROS accumulation considering the basal ROS levels as a point of comparison. The different letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

In the intrinsic apoptosis pathway, loss of the mitochondrial membrane potential is considered an early event in the apoptotic process. Rho 123 is a cationic carbocyanine dye that accumulates in mitochondria with a functional membrane potential. Cells treated with PF2 lectin exhibited a significantly lower mitochondrial membrane potential, expressed as arbitrary fluorescence units, compared to untreated cells (Figure 6).

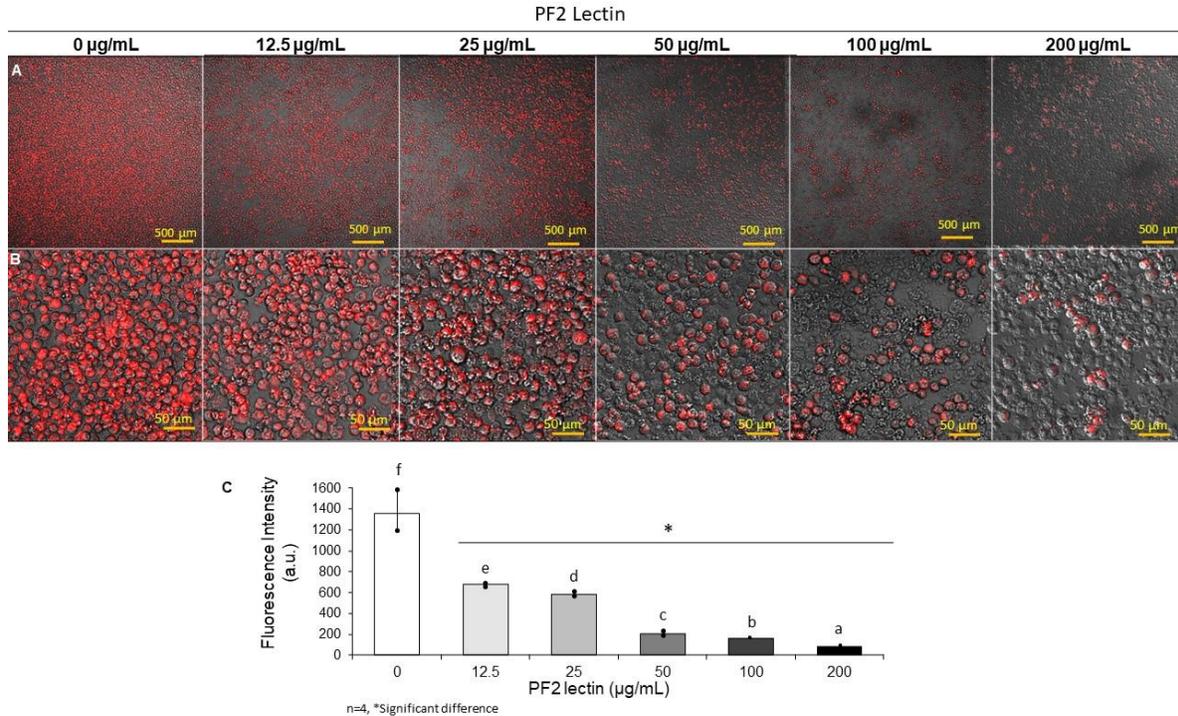


Figure 6. Effect of PF2 lectin on the THP-1 cell mitochondrial membrane potential. Fluorescence confocal micrographs of THP-1 monocytes stained with Rhodamine 123 at 20 $\times$  (A) and 40 $\times$  (B) magnification. Arbitrary units of fluorescence intensity (C). A decrease in the fluorescence intensity indicates loss of the mitochondrial membrane potential. The bars indicate the means  $\pm$  SDs (n=4). The different letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

The evidence found in this work, including ROS accumulation, DNA fragmentation, and mitochondrial membrane potential loss, suggests that PF2 treatment induces intrinsic activation of apoptosis, which can be intrinsically or extrinsically activated. Excessive ROS levels can impair the integrity of the cell membrane, affecting protein expression and cytoskeleton dynamics and causing DNA damage; a phenomenon, as a whole, called oxidative stress [35]. Many anticancer drugs prove to be cytotoxic to cancer cells due to their ability to drastically increase ROS generation to harmful levels [36]. Our results suggest that PF2 cytotoxicity is mediated by intracellular ROS production. Indeed, ROS are known to be involved in the early stages of apoptosis and induce mitochondrial membrane depolarization. ROS can cause serious damage to fundamental cellular molecules such as lipids, proteins, and DNA [37]. At concentrations 10-fold lower than the IC<sub>50</sub>, PF2 lectin promoted genomic DNA fragmentation, an event characteristic of apoptosis, in THP-1 cells. The literature indicates that the legume lectin ConA induces apoptosis in mouse PU5–1.8 macrophages, DNA fragmentation (after treatment at 25  $\mu\text{g/mL}$ ), and cytochrome-c release [38]. Cytochrome-c is released intracellularly upon loss of mitochondrial membrane integrity. PF2 promoted loss of the mitochondrial membrane potential in

THP-1 cells in a concentration-dependent manner, similar to the observed effect of the ConA lectin on MOLT-4 cells [26].

## Conclusions

Our work demonstrated that the anticancer potential of PF2 lectin is related to its antiproliferative activity against THP-1 cells and advanced the understanding of its mechanism of action, which suggests the induction of an apoptotic pathway characterized by DNA fragmentation, mitochondrial membrane depolarization, and increased production of ROS. Since cancer cells can evade apoptosis by silencing apoptotic proteins and markers, the observation that PF2 induces apoptosis in THP-1 cells suggests that this lectin may play a critical role in the molecular pathogenesis of leukemia. It is worthwhile to perform more in-depth study of the mechanisms involved in PF2-induced cell death and conduct future research to improve the therapeutic feasibility of lectin-based treatments for cancer.

## Experimental Section

### PF2 lectin purification

The plant samples were authenticated by Professor José Jesús Sánchez Escalante at Universidad de Sonora Herbarium. PF2 was purified by the method of Vazquez-Moreno et al. 2000 [18]. Briefly, *O. tesota* seeds were pulverized and defatted with hexane. The crude extract was injected into an agarose-fetuin chromatographic column. Unbound proteins in the fractions were removed by washing with PBS (phosphate-buffered saline, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9% NaCl, and 0.02% NaN<sub>3</sub> (pH 7.2)). The retained proteins were eluted with glycine-HCl (0.02 M (pH 2.5)) and neutralized with 1 M Trizma base (pH 8). The fractions were dialyzed against water at 4 °C, lyophilized, and stored at -10 °C until use.

### Cell culture conditions and treatments

THP-1 human monocytes, derived from a patient with acute monocytic leukemia, were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). THP-1 monocytes were cultured at 5×10<sup>5</sup> cells/mL in RPMI 1640 medium (Sigma–Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma–Aldrich) and 1% antibiotic solution (100 U/mL penicillin and 100 g/mL streptomycin) (Thermo Fisher Scientific) at 37 °C in humidified conditions with 5% CO<sub>2</sub>.

To evaluate the effects of PF2 on THP-1 cells, the FBS concentration in the medium was reduced to 1% to reduce interference by serum proteins, and the effects of PF2 lectin were assayed at five concentrations: 200, 100, 50, 25, and 12.5 µg/mL. The PF2 lectin solutions were passed through 0.22 µm low-binding protein filters (Millipore), and the protein concentrations were determined by absorbance

measurements at 280 nm with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

Assessment of THP-1 monocyte biorecognition by the PF2 lectin by confocal fluorescence microscopy.

The PF2 lectin was labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC). In brief, 0.5 mL of FITC (0.4 mg/mL DMSO) was mixed with 2 mg of PF2 lectin. After a 3 h reaction in the dark at room temperature, the FITC-PF2 lectin complexes were passed through a Sephadex G25 column equilibrated with PBS. The activity of PF2 in the eluted fractions was monitored by hemagglutination assays. FITC-PF2 lectin was incubated with THP-1 monocytes for 1 h. THP-1 cells were seeded in 48-well plates at a density of 5000 cells/500  $\mu$ L/well using RPMI containing 1% FBS and incubated with 10  $\mu$ g/mL FITC-PF2 lectin. After incubation, the cells were washed three times with PBS and observed under a confocal microscope (Nikon ECLIPSE Ti C2+, Japan). Fluorescence images were captured with a 488-nm laser at 20x magnification.

Antiproliferative effect of PF2 lectin on THP-1 monocytes

The antiproliferative effect of PF2 on THP-1 cells was determined by a resazurin assay. THP-1 cells with a viability rate of higher than 97% were seeded in 96-well plates at a density of 5000 cells per well and incubated with different concentrations of PF2 for 3 h. Untreated cells were used as a negative control. A resazurin colorimetric assay was used to quantify cell survival with respect to untreated control cells [39]. The absorbance was measured at 570 nm and 600 nm. Three independent experiments were performed and the mean cell viability percentages  $\pm$ SDs are reported.

Induction of apoptosis in THP1 monocytes

Apoptosis induction in THP-1 cells by PF2 lectin treatment was evaluated using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI (BioLegend, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, THP-1 cells were seeded in a 48-well cell culture plate and incubated with different concentrations of PF2 for 3 h. The cells were collected, centrifuged, and washed with PBS. Then, the cells were incubated with PI and Annexin V in the dark at ambient temperature for 10 min and analyzed using a BD FACSVerse™ flow cytometer (BD Biosciences, NY). Three independent experiments with triplicate samples were conducted. IC<sub>50</sub> values were calculated considering the percentages of viable cells.

## Reactive Oxygen Species (ROS) Assay

THP-1 cells ( $1 \times 10^4$  cells/well) were seeded in 48-well plates under the same conditions and with the previously described treatments. The monocytes were collected, washed with PBS, and incubated for 30 min with  $10 \mu\text{M}$  2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCHF-DA). This dye is deacetylated by intracellular esterases and converted to nonfluorescent 2',7'-dichlorohydrofluorescein (H2-CDF), which is rapidly oxidized to the highly fluorescent compound 2',7'-dichlorohydrofluorescein (DCF) in the presence of ROS. Fluorescence emission was quantified using a BD FACSVerser<sup>TM</sup> flow cytometer (BD Biosciences, NY). For the ROS detection assay, two technical replicates were established, and the results are expressed as relative ROS accumulation levels.

## Mitochondrial membrane potential analysis

THP1 monocytes were seeded in 48-well plates at a density of 10,000 cells per well under the same conditions and with the previously described treatments. The monocytes were collected, washed with PBS, and incubated with  $1 \mu\text{g/mL}$  rhodamine 123 (Rho 123) for 15 min at  $37^\circ\text{C}$ . Rho 123 was used as a fluorescent probe to evaluate the mitochondrial membrane potential. Rho 123 is accumulated by mitochondria in amounts related to cell viability. Finally, fluorescence was analyzed by confocal microscopy (Nikon ECLIPSE Ti C2+, Japan) with 488-nm lasers. Images were obtained with a  $1024 \times 1024$  pixel resolution at  $20\times$  magnification and analyzed with NIS-Elements imaging software.

## DNA fragmentation assay

DNA fragmentation was assessed by agarose gel electrophoresis following the procedure of Park and Paul (1998) [40]. Approximately 8000 cells were treated with  $10 \mu\text{g/mL}$  PF2 lectin for 6 h. Then, the cells were washed with PBS and pelleted by centrifugation. TE lysis buffer ( $10 \text{ mM}$  Tris-HCl,  $1 \text{ mM}$  sodium-EDTA (pH 7.5), 0.25% Triton X-100, and 0.2% RNase A) was added, and the solution was mixed by gentle vortexing and incubated for 20 min at  $37^\circ\text{C}$ . Then, 0.2% proteinase K (Sigma Chemical) was added to the sample, which was incubated for an additional 20 min. The sample was then analyzed by 1.8% agarose gel electrophoresis and Gel-Red staining (Biotium, USA). DNA visualization was performed under UV light in a UVP transilluminator (Upland, CA) with the Kodak Gel Logic 100 Imaging System. The intensity of each band was obtained from images and normalized to the control (set equal to 1) with Image Lab 3.0.

## Statistical analysis

One-way analysis of variance followed by the Tukey–Kramer test at  $p \leq 0.05$  was conducted to evaluate the effects of the different PF2 concentrations on THP-1 cells using the statistical package NCSS version 12 (NCSS, LLC, Kaysville, UT, USA).

#### Acknowledgments

The authors thank the Investigadores por México-CONAHCyT program.

#### References

- [1] R.L. Siegel, K.D. Miller, H.E. Fuchs, A. Jemal, 'Cancer statistics, 2022', *Cancer J Clin.* 2022, 72,7–33.
- [2] G. Juliusson, R. Hough, 'Tumors in Adolescents and Young Adults', *Prog Tumor Res.* 2016, 43, 87-100
- [3] I. de Kouchkovsky, M. Abdul-Hay, 'Acute myeloid leukemia: A comprehensive review and 2016 update,' *Blood Cancer J.* 2016, 6, e441.
- [4] D.L. Friedman, J. Whitton, W. Leisenring, A.C. Mertens, S. Hammond, M. Stovall, S.S. Donaldson, A.T. Meadows, L.L. Robison, J.P. Neglia, 'Subsequent neoplasms in 5-year survivors of childhood cancer: The childhood cancer survivor study', *J Natl Cancer Inst.* 2010, 102, 1083–1095.
- [5] A.G. Freifeld, E.J. Bow, K.A. Sepkowitz, M.J. Boeckh, J.I. Ito, C.A. Mullen, I.I. Raad, K. v. Rolston, J.A.H. Young, J.R. Wingard, 'Executive summary: Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America', *Clinical Infectious Diseases*, 2011, 52, 427–431.
- [6] S.C. Howard, S. Trifilio, T.K. Gregory, N. Baxter, A. McBride, 'Tumor lysis syndrome in the era of novel and targeted agents in patients with hematologic malignancies: a systematic review', *Ann Hematol.* 2016, 95, 563–573.
- [7] F.V. Vitale, G.S. Longo-Sorbello, S. Rotondo, F. Ferrau, 'Understanding and treating solid tumor–related disseminated intravascular coagulation in the “era” of targeted cancer therapies', *SAGE Open Med.* 2017, 5.
- [8] L. Shen, Z. Luo, J. Wu, L. Qiu, M. Luo, Q. Ke, X. Dong, 'Enhanced expression of  $\alpha$ 2,3-linked sialic acids promotes gastric cancer cell metastasis and correlates with poor prognosis', *Int J Oncol.* 2017, 50, 1201–1210.
- [9] A. Lityn & Ska Ā, M. Przybyło, E. Pohec, D. Hoja-Èukowicz, D. Ciołczyk, P. Laidler, D. Gil, 'Comparison of the lectin-binding pattern in different human melanoma cell lines', *Melanoma Res.* 2001, 11, 205-12.
- [10] N. Gupta, P.S. Bisen, S.S. Bhagyawant, 'Chickpea lectin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis through cell cycle arrest', *Protein Pept Lett.* 2018, 25, 492–499.

- [11] A. Nasi, G. Picariello, P. Ferranti, 'Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety', *J Proteomics* 2009, 72 527–538.
- [12] Y.S. Chan, L. Xia, T.B. Ng, 'White kidney bean lectin exerts anti-proliferative and apoptotic effects on cancer cells', *Int J Biol Macromol.* 2016 85, 335–345.
- [13] E. Fei Fang, J. Ho Wong, P. Lin, T. Bun Ng, 'Biochemical and functional properties of a lectin purified from korean large black soybeans a cultivar of *glycine max*', *Protein Pept Lett.* 2010, 17, 690–698.
- [14] M.R. El-Aassar, E.E. Hafez, N.M. El-Deeb, M.M.G. Fouda, 'Microencapsulation of lectin anti-cancer agent and controlled release by alginate beads, biosafety approach', *Int J Biol Macromol.* 2014, 69 (2014) 88–94.
- [15] I. Lagarda-Diaz, A. Guzman-Partida, L. Vazquez-Moreno, Legume Lectins: 'Proteins with Diverse Applications', *Int J Mol Sci.* 2017, 18, 1242.
- [16] I. Lagarda-Diaz, M.Á. Hernández-Oñate, J.Á. Huerta-Ocampo, A.M. Guzmán-Partida, J. Winzerling, D. Geiser, L. Vázquez-Moreno, 'Gene sequences of potential targets of insecticidal pf2 lectin identified from the larval de novo transcriptome of the mexican bean weevil (*Zabrotes subfasciatus*; boheman 1833)', *Insects.* 2020, 11, 1–18.
- [17] D. Villegas Coronado, A. M. Guzman Partida, E. Aispuro Hernandez, L. Vazquez Moreno, J. A. Huerta Ocampo, J. A. Sarabia Sainz, N. G. Teran-Saavedra, C. Minjarez Osorio, R. Castro-Longoria, A. Maldonado, I. Lagarda-Diaz, 'Characterization and expression of prohibitin during the mexican bean weevil (*Zabrotes subfasciatus*, Boheman, 1833) larvae development', *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2022, 262, 10770.
- [18] D. Wang, E. Ozhegov, L. Wang, A. Zhou, H. Nie, Y. Li, X.L. Sun, 'Sialylation and desialylation dynamics of monocytes upon differentiation and polarization to macrophages', *Glycoconj J.* 2016, 33, 725–733.
- [19] L. Vazquez Moreno, M. Ortega Nieblas, M. R. Robles Burgueño, G. Ramos Clamont, 'Purification of complex carbohydrate specific lectins from *Olneya tesota* seeds using tandem affinity chromatography', *Int. J. Bio-Chromatogr.* 2000, 00, 1-8.
- [20] I. Lagarda-Diaz, M.R. Robles-Burgeno, A.M. Guzman-Partida, D. Geiser, J. Winzerling, L. Vazquez-Moreno, 'Binding of PF2 lectin from *Olneya tesota* to gut proteins of *Zabrotes subfasciatus* larvae associated with the insecticidal mechanism', *J Agric Food Chem.* 2012, 60, 2398–2402.
- [21] I. Lagarda-Diaz, D. Geiser, A.M. Guzman-Partida, J. Winzerling, L. Vazquez-Moreno, 'Recognition and binding of the PF2 lectin to  $\alpha$ -amylase from *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera:Bruchidae) larval midgut', *J. Insect Sci.* 2014, 14, 66.

- [22] E.H.E. Konozy, M.E.M. Osman, 'Plant lectin: A promising future anti-tumor drug', *Biochimie*. 2022, 08, 2.
- [23] S.-M. Zhou, L. Cheng, S.-J. Guo, Y. Wang, D.M. Czajkowsky, H. Gao, X.-F. Hu, S.-C. Tao, 'Lectin RCA-I specifically binds to metastasis-associated cell surface glycans in triple-negative breast cancer', *BCR*. 2015, 17, 36.
- [24] A.A. Jeyaprakash, P. Geetha Rani, G. Banuprakash Reddy, S. Banumathi, C. Betzel, K. Sekar, A. Surolia, M. Vijayan, 'Crystal Structure of the Jacalin–T-antigen Complex and a Comparative Study of Lectin–T-antigen Complexes', *J Mol Biol*. 2002, 321, 637–645.
- [25] K. Tachibana, S. Nakamura, H. Wang, H. Iwasaki, K. Tachibana, K. Maebara, L. Cheng, J. Hirabayashi, H. Narimatsu, 'Elucidation of binding specificity of Jacalin toward O-glycosylated peptides: quantitative analysis by frontal affinity chromatography', *Glycobiology*. 2006, 16, 46–53.
- [26] G. v. Faheina-Martins, A.L. da Silveira, B.C. Cavalcanti, M. v. Ramos, M.O. Moraes, C. Pessoa, D.A.M. Araújo, 'Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines', *Toxicology in Vitro*. 2012, 26, 1161–1169.
- [27] R. Singh, L. Nawale, D. Sarkar, C.G. Suresh, 'Two Chitotriose-Specific Lectins Show Anti-Angiogenesis, Induces Caspase-9-Mediated Apoptosis and Early Arrest of Pancreatic Tumor Cell Cycle', *PLoS One*. 2016, 11, e0146110.
- [28] A.C.S. Gondim, 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, 'The potent anti-cancer activity of *Dioclea lasiocarpa* lectin', *J Inorg Biochem*. 2017, 175, 179–189.
- [29] Q. Lu, N. Li, J. Luo, M. Yu, Y. Huang, X. Wu, H. Wu, X.Y. Liu, G. Li, 'Pinellia pedatisecta agglutinin interacts with the methylosome and induces cancer cell death', *Oncogenesis* 2012, e29–e29.
- [30] Z. Zuo, H. Fan, X. Wang, W. Zhou, L. Li, 'Purification and characterization of a novel plant lectin from *Pinellia ternata* with antineoplastic activity', *Springerplus* 2012, 13.
- [31] Y. Elamine, V. Torres-Salas, A. Messai, J. Girón-Calle, M. Alaiz, J. Vioque, 'Purification, Characterization, and Antiproliferative Activity of a Single-Chain Lectin from *Vicia palaestina* (Fabaceae) Seeds', *Chem Biodivers*. 2021, 18.
- [32] R. Singh, L. Nawale, D. Sarkar, C.G. Suresh, 'Two Chitotriose-Specific Lectins Show Anti-Angiogenesis, Induces Caspase-9-Mediated Apoptosis and Early Arrest of Pancreatic Tumor Cell Cycle', *PLoS One*. 2016, 11, e0146110.

- [33] Q.-L. Jiang, S. Zhang, M. Tian, S.-Y. Zhang, T. Xie, D.-Y. Chen, Y.-J. Chen, J. He, J. Liu, L. Ouyang, X. Jiang, 'Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy', *Cell Prolif.* 2015, 48, 17–28.
- [34] C.B. Thompson, 'Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease', *Science* 1979, 207, 1456–1462.
- [35] H.R. Molavian, A. Goldman, C.J. Phipps, M. Kohandel, B.G. Wouters, S. Sengupta, S. Sivaloganathan, 'Drug-induced reactive oxygen species (ROS) rely on cell membrane properties to exert anticancer effects', *Sci Rep.* 2016, 6, 27439.
- [36] C. Gorrini, I.S. Harris, T.W. Mak, 'Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy', *Nat Rev Drug Discov.* 2013, 12, 931–947.
- [37] J. Ravindran, N. Gupta, M. Agrawal, A.S. Bala Bhaskar, P. v. Lakshmana Rao, 'Modulation of ROS/MAPK signaling pathways by okadaic acid leads to cell death via, mitochondrial mediated caspase-dependent mechanism', *Apoptosis.* 2011, 16, 145–161.
- [38] Y.K. Suen, K.P. Fung, Y.M. Choy, C.Y. Lee, C.W. Chan, S.K. Kong, 'Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome c', *Apoptosis* 2000, 5, 369–377.
- [39] C. Giordano, B. Del Cuarto, E. Signorelli, G. Rondelli, L. Di Silvio, 'Titanium for osteointegration: Comparison between a novel biomimetic treatment and commercially exploited surfaces', *J Appl Biomater Biomech.* 2004, 2, 35-44.
- [40] Park Darren, Paul Pate, 'Detergent and Enzyme Treatment of Apoptotic Cells for the Observation of DNA Fragmentation', *Benchmark s* 1998, 00.

