



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

ESTUDIO DEL EFECTO ANTIGENOTÓXICO, DE PROTEÍNAS  
EXTRAÍDAS DE SEMILLAS DE *Vicia faba* (HABA),  
MEDIANTE EL ENSAYO DE INTERCAMBIO DE  
CROMÁTIDAS HERMANAS *in vitro*, ASÍ COMO SU  
SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN ELECTROFORÉTICA  
MEDIANTE SDS-PAGE.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:  
AUREOLA MACÍAS CABRERA

ASESORAS: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO  
Q.F.B. ROSALBA BONILLA SÁNCHEZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos
comunicar a usted que revisamos la Tesis:

"Estudio del efecto antígenotóxico, de proteínas extraídas de semillas de
Vicia faba (Haba), mediante el ensayo de Intercambio de Cromátidas Hermanas
in vitro, así como su separación e identificación electroforética mediante
SDS-PAGE"

que presenta la pasante: Aureola Macías Cabrera

con número de cuenta: 09602033-7 para obtener el título de :

Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en
el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 5 de octubre de 2009.

PRESIDENTE Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

VOCAL Q. Arcadia Hernández Beltrán

SECRETARIO Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón

PRIMER SUPLENTE MC. Tais Nopal Guerrero

SEGUNDO SUPLENTE MC. Maritere Domínguez Rojas

Handwritten signatures of the board members.

## AGRADECIMIENTOS

### A MIS RESPETABLES SINODALES:

- *A la Q. Arcadia Hernández por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, por sus apreciables consejos y comentarios, gracias.*
- *Al Dr. Victor M. Zendejas por su tiempo y acertados comentarios, gracias.*
- *A la MC. Maritere Dominguez por el tiempo y dedicación empleados para la revisión de este trabajo, por tu ayuda y consejos, gracias.*
- *A la MC. Tais Nopal por el tiempo empleado en cada una de las revisiones de este trabajo, por su amable y gran ayuda en la elaboración del mismo, por sus apreciables consejos y sobre todo por esa gran disposición de ayuda que siempre me concedió, gracias.*

### A MIS APRECIADAS ASESORAS:

- *A la QFB. Rosalba Bonilla, por su estímulo, sus enseñanzas, por la ayuda proporcionada a la realización de este trabajo, por su interés, por sus valiosos consejos y su agradable compañía, mil gracias.*
- *A la Dra. Sandra Díaz Barriga, por sus enseñanzas, su gran paciencia, su apoyo, por su invaluable ayuda y guía en la realización de este trabajo, pero sobre todo, por creer en mí... mil gracias.*

## AGRADECIMIENTOS

### A MIS VALIOSOS PROFESORES:

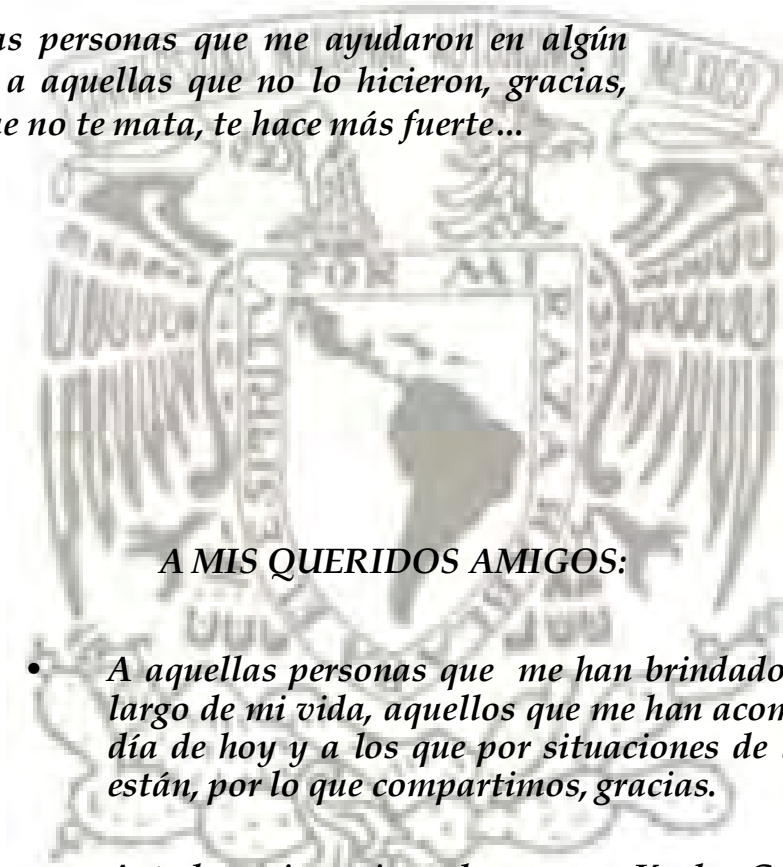
- *A la QFB. Nydia B. por su gran disponibilidad de apoyo en la elaboración de este trabajo, gracias.*
- *A la M. Ma. Esther Revuelta, por sus enseñanzas y apoyo, muchas gracias.*
- *A la QFI. Leticia Zúñiga, por su paciencia , enseñanzas y apoyo, mil gracias.*
- *A la QFB. Martha P. Campos, por su gran apoyo y ayuda, por estar ahí en el momento y lugar en que más lo necesitaba, mil gracias.*
- *A todos aquellos profesores que en su gran vocación, depositaron en mí, valiosos conocimientos que han contribuido a mi formación profesional y personal, a todos, mi más sincero agradecimiento.*

### A MI QUERIDA UNAM:

- *Por que ser orgullosamente UNAM, no se trata únicamente de un título, es más bien un estilo de vida, sentimientos y vivencias que me acompañarán el resto de mi vida...*
- *Porque ingresar a la UNAM, fue únicamente el principio de una gran aventura, una aventura sin final...*
- *Por que me dio la oportunidad de comenzar a luchar por mis sueños, porque me dio una formación humana, por todas las tristezas y alegría, por cada uno de los triunfos y fracasos que en ella viví, por los amigos que me dio, por convertirse en mi segundo hogar, por esto y mucho más, dejo mi corazón en la UNAM...*

## AGRADECIMIENTOS

- *A la QFB Sara Matilde, por su forma de ser, por su compañía y su interés, gracias.*
- *Al Sr Pablo, por la ayuda proporcionada durante la elaboración de este trabajo, gracias.*
- *A todas esas personas que me ayudaron en algún momento y a aquellas que no lo hicieron, gracias, porque lo que no te mata, te hace más fuerte...*



### A MIS QUERIDOS AMIGOS:

- *A aquellas personas que me han brindado su amistad a lo largo de mi vida, aquellos que me han acompañado hasta el día de hoy y a los que por situaciones de la vida, ya no lo están, por lo que compartimos, gracias.*
- *A todos mis amigos de carrera: Karla, Gaby, Mario y los que me faltaron, por su compañía y amistad, gracias.*
- *A mis compañeros de Laboratorio: Orquídea, Pily, Flor y Toño, por las risas y las bromas, por los buenos y malos momentos que compartimos, porque el compañerismo se convirtió en amistad, gracias.*
- *A Yury, por tu peculiar forma de ser, por tu ayuda y ánimo, por la amistad que me has concedido, gracias.*



### A MIS QUERIDOS AMIGOS:

- *A Jenny, por tu forma de ser, por cada una de las alegrías, problemas y frustraciones que vivimos juntas, porque una parte de este trabajo también es tuyo, porque lo logramos juntas, porque no pude tener una mejor compañera para esta difícil prueba, mil gracias.*
- *A Ma. Luisa y Rocío, por su gran apoyo durante todo este tiempo juntas, por su ayuda, sus consejos y ánimo, por ser tan especiales y diferentes, pero sobre todo, por su valiosísima amistad que ha trascendido a la relación académica, de corazón gracias.*
- *A todos mis amigos les digo hoy, que soy afortunada de haberlos conocido...*

### A TI, QUE ERES TAN ESPECIAL PARA MÍ:

- *A ti, que llegaste a mi vida cuando más lo necesitaba...*
- *A ti, que me devolviste la confianza y el valor para luchar por mis sueños...*
- *A ti, que me enseñaste lo que es amar...*
- *A ti, que me salvaste la vida y el corazón...*
- *A ti Adrián, por el tiempo que has estado y estarás en mi vida... gracias.*

**A MI AMADA FAMILIA:**

- *A Reny, por ser una niña tan inteligente y especial, porque espero ser un buen ejemplo e influencia en tu gran y prometedora vida, por ser mi sobrina consentida...*
- *A Brisa, por ser como eres, por tu apoyo, comprensión y consejos, por todas las risas, todas las bromas y las interminables charlas, por los buenos y malos momentos, pero sobre todo, por todo tu cariño de hermana...*
- *A Gabriel, por ser un hermano tan especial, por toda tu preocupación y consejos, por tu cariño y por ayudarme siempre en todo lo que he necesitado...*
- *A ustedes, mi especial familia, les reitero mi más profundo agradecimiento y amor con este trabajo.*

**A MI GRAN Y AMADO PADRE:**

- *Porque a pesar de mis defectos, siempre estaré llena de mucho amor para ti...*
- *Por toda una vida de trabajo y sacrificios para proporcionarme todo lo necesario y lindo en mi vida...*
- *Porque ahora me doy cuenta lo difícil que es enfrentarse a la vida y la sabiduría que acompaña a tus años...*
- *Porque eres el mejor padre que pude tener, no te cambiaría nada ni por nada...*
- *Por tu amor, lo que me has dado y enseñado, estoy agradecida con Dios de tenerte a mi lado...Este trabajo lo hago tuyo como muestra de mi infinito agradecimiento...Te amo papy.*



*A MI AMADÍSIMA MADRE:*

- *Por cada caricia, cada abrazo, cada beso, cada "te quiero" que se han quedado grabados en mi corazón...*
- *Por cada cuidado, cada desvelo, cada sacrificio y por cada día que me haces feliz con tu existencia...*
- *Por ser mi inspiración, mi apoyo y mi fuerza...*
- *Por ser lo más bueno, puro y sagrado que tengo...*
- *Por tu bondad, tu dulzura y tu inmenso amor...*
- *Por estar ahí cuando el mundo se cae a pedazos...*
- *Por nunca dudar que podía lograrlo...porque sin ti, nunca lo hubiera logrado...*
- *Porque "para atrás, ni para agarrar impulso", lo logramos mamy!*

*Dedico este trabajo a todas las personas que creyeron en mí...*

## A JEHOVÁ MI DIOS:

*Amoroso y buen padre celestial, hoy me dirijo a ti, llena de profundo agradecimiento por la privilegiada vida que en tu inmensa bondad me has regalado.*

*Te agradezco Señor, por darme una familia buena y amorosa que me ha llenado de felicidad, y a su vez te pido me concedas la dicha de retribuírseles día a día, por el resto de mi vida.*

*Gracias, por los amigos que me has dado y porque me has rodeado de personas buenas que me han apoyado.*

*Señor, gracias te doy, por concederme la dicha de admirar la maravilla de tu creación, disfrutar de las pequeñas grandes cosas de la vida, dejarme conocer el amor y enseñarme que no es posible reconocer un triunfo, cuando no has conocido el fracaso.*

*Hoy te pido también, que derrames un poco de tu bendición sobre mi familia, amigos y todas las personas que han llegado y llegarán a mi vida.*

*Te agradezco también por cada risa y lágrima que me has permitido sentir, porque cada una de las vivencias, buenas o malas, han contribuido a lo que soy y seré.*

*Te ruego Señor que me conviertas en un humano bueno y sensible, no permitas que mi alma se llene de cosas superficiales y se torne indiferente ante la tristeza y el dolor de las personas.*

*Por favor Señor, te pido me des sabiduría para tomar las decisiones que dirigirán mi vida. Porque de corazón deseo tener una vida digna de las bendiciones que me has dado...*

*“... Te tendré cariño, oh Jehová fuerza  
mía.*

*Jehová es mi peñasco y mi plaza  
fuerte y el Proveedor de escape para  
mí.*

*Mi Dios es mi roca. En él me refugiaré,  
mi escudo y mi cuerno de salvación,  
mi altura segura...”*

*Salmos 18:1-2*

*“... Jehová es mi pastor, nada me faltará.  
En prados hermosos me hace recostar, me  
conduce por descansaderos donde abunda el  
agua.*

*Refresca mi alma. Me guía por los senderos  
trillados de la justicia por causa de su nombre.  
Aunque ande en el valle de sombra profunda,  
no temo nada malo, porque tú estás conmigo,  
tu vara y tu cayado son las cosas que me  
consuelan.*

*Dispones ante mí una mesa enfrente de los que  
me muestran hostilidad.*

*De seguro el bien y la bondad amorosa mismos  
seguirán tras de mí todos los días de mi vida; y  
ciertamente moraré en la casa de Jehová hasta  
la largura de mis días...”*

*Salmos 23:1-6*

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ABREVIATURAS.....	IX
1. RESUMEN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. CÁNCER.....	2
2.1.1. Generalidades.....	2
2.1.1.1. Ciclo Celular.....	3
2.1.1.2. Apoptosis o muerte celular programada.....	6
2.1.1.3. Mecanismos de Reparación del DNA.....	10
2.1.1.4. Diferenciación celular.....	12
2.1.1.5. Adhesión celular.....	14
2.1.2. Mutagénesis y Carcinogénesis.....	14
2.1.2.1. Métodos de Identificación de Carcinógenos.....	20
2.1.3. Manejo terapéutico del cáncer.....	21
2.1.3.1. Tratamiento farmacológico.....	21
2.1.3.2. Tratamiento no farmacológico.....	24
2.1.3.3. Desarrollo de nuevos tratamientos.....	26
2.1.4. Fitoterapia y Cáncer.....	27
2.2. PROTEÍNAS.....	29
2.2.1. Clasificación y propiedades.....	29
2.2.2. Aislamiento y purificación de proteínas.....	34
2.2.3. Solubilidad y precipitación de proteínas.....	35
2.2.4. Lectinas.....	36
2.3. <i>Vicia faba</i> (HABA).....	40
2.3.1. Características y generalidades.....	40
2.3.2. Contenido nutricional y propiedades medicinales.....	41
2.4. GENOTOXICOLOGÍA.....	44
2.4.1. Antecedentes.....	44
2.4.2. Importancia y aplicaciones.....	45

2.5. ENSAYO DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS.....	47
2.5.1. El Ácido Desoxirribonucleico (DNA).....	47
2.5.2. Los Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH).....	54
2.5.3. Importancia de los ICH.....	60
3. JUSTIFICACIÓN.....	61
4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	62
5. MATERIALES.....	63
6. METODOLOGÍA GENERAL.....	64
7. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS.....	65
7.1. Extracción de proteínas a partir de semillas de <i>Vicia faba</i> (Haba).....	65
7.2. Cuantificación de proteínas por el Método de Biuret.....	65
7.3. Liofilización del Extracto proteínico de <i>Vicia faba</i> (EpVf).....	66
7.4. Ensayo Genotóxico y Antigenotóxico del EpVf mediante la frecuencia de ICH <i>in vitro</i> .....	66
7.5. Tinción Diferencial de ICH.....	68
7.6. Evaluación de la Frecuencia de ICH.....	68
7.7. Separación e Identificación de proteínas extraídas de <i>Vicia faba</i> mediante Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil Sulfato Sódico (SDS-PAGE).....	70
7.7.1. Preparación de geles de poliacrilamida.....	70
7.7.2. Preparación de muestras para Electroforesis SDS-PAGE.....	71
7.7.3. Detección de proteínas del EpVf mediante tinción con Azul de Coomasie.....	71
8. RESULTADOS.....	72
8.1. Cuantificación de proteínas en el EpVf, mediante el método de Biuret.....	72
8.2. Resultados del Ensayo Genotóxico del EpVf, mediante la prueba de ICH <i>in vitro</i> .....	73
8.2.1. Frecuencia de ICH.....	73
8.2.2. Índice de Replicación.....	74
8.2.3. Índice Mitótico.....	75
8.3. Resultados del Ensayo Antigenotóxico del EpVf, mediante la prueba de ICH <i>in vitro</i> .....	76
8.3.1. Frecuencia de ICH.....	76
8.3.2. Índice de Replicación.....	78
8.3.3. Índice mitótico.....	79
8.4. Separación e Identificación de proteínas del EpVf, mediante SDS-PAGE.....	80

9. DISCUSIÓN.....	82
9.1. Extracción y cuantificación de las proteínas presentes en el EpVf.....	82
9.2. Índice Mitótico.....	83
9.3. Índice de Replicación.....	85
9.4. Intercambios de Cromátidas Hermanas.....	85
9.5. Electroforesis SDS-PAGE.....	87
10. CONCLUSIONES.....	90
11. REFERENCIAS.....	91
12. ANEXO.....	103



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de agentes antineoplásicos de acuerdo a su mecanismo de acción .....	21
Tabla 2. Agentes hormonales anticancerígenos .....	23
Tabla 3. Mecanismos de acción de lectinas de plantas en células malignas <i>in vitro</i> .....	38
Tabla 4. Mecanismos de acción de lectinas de plantas en células malignas <i>in vivo</i> .....	39
Tabla 5. Composición química de <i>Vicia faba</i> (Haba).....	42
Tabla 6. Ventajas y desventajas de los sistemas de prueba de ICH <i>in vitro</i> .....	59
Tabla 7. Preparación de la Curva estándar de proteínas.....	65
Tabla 8. Ensayo Genotóxico del EpVf, mediante la prueba de ICH <i>in vitro</i> .....	66
Tabla 9. Ensayo Antigenotóxico del EpVf, mediante la prueba de ICH <i>in vitro</i> .....	67
Tabla 10. Preparación de gel separador para Electroforesis SDS-PAGE.....	70
Tabla 11. Preparación de gel concentrador para Electroforesis SDS-PAGE .....	70
Tabla 12. Absorbancias obtenidas para la Curva estándar de proteínas.....	72
Tabla 13. Concentración de proteínas presentes en el EpVf.....	72
Tabla 14. Promedio de la Frecuencia de ICH encontradas por metafase en cultivos de linfocitos humanos, expuestos al EpVf.....	73
Tabla 15. Promedio del Índice de Replicación (IR) observado en cultivos de linfocitos humanos expuestos al EpVf.....	74
Tabla 16. Promedio del Índice Mitótico (IM) en cultivos de linfocitos humanos del ensayo Genotóxico.....	75
Tabla 17. Frecuencia de ICH en el ensayo Antigenotóxico, EpVf adicionado a cultivos de linfocitos, en diferentes concentraciones.....	76
Tabla 18. Frecuencia de ICH en el ensayo Antigenotóxico, EpVf adicionado a cultivos de linfocitos, a diferentes concentraciones en combinación con MMC.....	77



Tabla 19. IR presentado por cultivos de linfocitos humanos, expuestos a diferentes concentraciones del EpVf vs. MMC.....78

Tabla 20. IM de cultivos de linfocitos humanos con EpVf a diferentes concentraciones vs. MMC.....79

Tabla 21. PM de las proteínas detectadas en el EpVf mediante electroforesis SDS-PAGE.....81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Puntos de control y de decisión a lo largo del ciclo celular .....4

Figura 2. Pasos de la fosforilación por el complejo ciclina-CDK .....5

Figura 3. Tipos de complejos ciclina-CDK, formados a lo largo del ciclo celular en células de mamíferos.....6

Figura 4. Proceso de apoptosis.....7

Figura 5. Diferencias entre necrosis y apoptosis.....8

Figura 6. Acción de las caspasas ejecutoras en la apoptosis.....9

Figura 7. Proteínas Bcl2 y BAX reguladoras de la apoptosis.....10

Figura 8. Estadios de desarrollo del cáncer cervical.....13

Figura 9. Tipos de mutaciones .....15

Figura 10. Posibles consecuencias de la mutación.....17

Figura 11. Etapas de la carcinogénesis.....19

Figura 12. Mecanismos de acción de los principales grupos de fármacos antineoplásicos..... 22

Figura 13. Estructura general de los aminoácidos.....30

Figura 14. Estructura primaria de proteínas..... 31

Figura 15. Estructuras secundarias de proteínas.....31

Figura 16. Estructura terciaria de proteínas.....32

Figura 17. Estructura cuaternaria de proteínas..... 32

Figura 18. Estructura de la lectina VFA.....36

Figura 19. Planta de *Vicia faba* (Haba).....40



Figura 20. Estructura de nucleótidos.....	47
Figura 21. Estructura química de las purinas.....	48
Figura 22. Estructura química de las pirimidinas.....	48
Figura 23. Estructuras químicas de la ribosa (RNA) y 2-desoxirribosa (DNA).....	48
Figura 24. Unión de nucleótidos mediante el enlace fosfodiéster 3'-5'.....	49
Figura 25. Enlaces formados entre A- T y G-C.....	49
Figura 26. Estructura doble hélice del DNA.....	50
Figura 27. Asociación entre histonas y DNA.....	51
Figura 28. Modelo general de replicación semiconservativa del DNA.....	52
Figura 29. Tipos de cromosomas basados en la posición de su centrómero.....	53
Figura 30. Probable mecanismo de formación de ICH.....	55
Figura 31. Incorporación de la BrdU a través de 3 ciclos de replicación continua.....	56
Figura 32. Metafases de 1a, 2a y 3a división.....	56
Figura 33. Tipos de ICH.....	57
Figura 34. Metafase de segunda división de linfocitos humanos.....	58
Figura 35. Fotografía de metafase de segunda división.....	68
Figura 36. Fotografía de metafases de primera y segunda división.....	69
Figura 37. Fotografía de una metafase y linfocitos humanos.....	69
Figura 38. Curva Estándar de proteínas.....	72
Figura 39. Frecuencia de ICH del ensayo Genotóxico.....	73
Figura 40. Índice de Replicación del Ensayo Genotóxico.....	74
Figura 41. Índice Mitótico del ensayo Genotóxico.....	75
Figura 42. Frecuencia de ICH en cultivos con EpVf a diferentes concentraciones.....	76
Figura 43. Frecuencia de ICH en cultivos con EpVf a diferentes concentraciones y MMC.....	77

Figura 44. Comparación entre las frecuencia de ICH de los diferentes tratamientos del ensayo Antigenotóxico.....77

Figura 45. Índice de Replicación, ensayo Antigenotóxico.....78

Figura 46. Índice Mitótico del Ensayo Antigenotóxico .....79

Figura 47. Regresión lineal del marcador de PM empleado.....80

Figura 48. Patrón electroforético del EpVf.....80

## ABREVIATURAS

<b>A</b>	Adenina
<b>ALB</b>	Albúmina
<b>B</b>	Blanco
<b>BrdU</b>	5-Bromodesoxiuridina
<b>C</b>	Citosina
<b>AC</b>	Aberraciones cromosómicas
<b>CP</b>	Control positivo
<b>CN</b>	Control negativo
<b>D.E.</b>	Desviación Estándar
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EpVf</b>	Extracto proteínico de <i>Vicia faba</i>
<b>FPM</b>	Factor Promotor de la Mitosis
<b>G</b>	Guanina
<b>G6PDD</b>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
<b>ICH</b>	Intercambio de Cromátidas Hermanas
<b>IM</b>	Índice Mitótico
<b>IR</b>	Índice de Replicación
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>Log</b>	Logaritmo
<b>MAOI</b>	Inhibidores de la monoaminoxidasa
<b>MMC</b>	Mitomicina C
<b>MN</b>	Micronúcleos
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>P</b>	Problema
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>PM</b>	Peso Molecular
<b>PROM</b>	Promedio
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato Sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<b>SSF</b>	Solución Salina Fisiológica
<b>ST</b>	Genes supresores de tumor
<b>Std</b>	Estándares
<b>T</b>	Timina
<b>TEMED</b>	N, N, N, N'-tetrametil etilen diamina
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>COLCHN</b>	Colchicina
<b>VFA</b>	Lectina de <i>Vicia faba</i>





## 1. RESUMEN

Diversos estudios han demostrado relevantes propiedades biológicas de lectinas obtenidas de diversas leguminosas. En el año de 1999, Jordison y colaboradores realizaron estudios con la lectina proveniente de *Vicia faba* (Haba) denominada VFA, entre otras lectinas, distinguiéndose de las demás por tener la capacidad de inducir diferenciación morfológica en células de cáncer de colon. A fin de dilucidar un poco más a cerca de los mecanismos por medio de los cuales estas proteínas poseen un efecto anticancerígeno, se diseñó este trabajo, en el que se emplearon ensayos que permitieron observar los efectos de proteínas extraídas de *Vicia faba*, sobre cultivos celulares de linfocitos humanos, provenientes de sangre periférica.

Se realizó la extracción de las proteínas contenidas en semillas de *Vicia faba*, mediante un método de disolución o "salting in", aprovechando las propiedades químicas de las proteínas. Una vez obtenido el extracto proteínico de *Vicia faba* (EpVf), se determinó la concentración de proteínas mediante el Método de Biuret, ésta fue de 26.4 mg/mL de proteínas. Posteriormente, el EpVf se sometió a un proceso de Liofilización a fin de mejorar su manejo y conservación, con lo que además se logró concentrarlo al triple (95.6 mg/mL), facilitando su empleo sobre los cultivos de linfocitos.

Se diseñaron dos ensayos: un Genotóxico y otro Antigenotóxico a fin de observar el efecto que el EpVf pudiera tener sobre el DNA. Esto se realizó mediante el ensayo de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), el cual permite evaluar no solamente la frecuencia de los ICH, sino también el Índice Mitótico (IM) e Índice de Replicación (IR).

El IM indicó que el EpVf a la concentración de 1 mg/mL, no posee la capacidad de inducir a que los linfocitos en cultivo entren en mitosis, a diferencia del efecto mitogénico ya comprobado de la PHA a la misma concentración. Para conocer si los efectos ejercidos por el EpVf se encontraban en función de su concentración, se emplearon diferentes concentraciones del extracto: 1, 2 y 6 mg/mL, en combinación con la PHA, obteniéndose que a la dosis más alta, el extracto potencializó el efecto mitogénico de la PHA, mediante el aumento del IM de las células en cultivo.

El ensayo Antigenotóxico fue diseñado con la finalidad de "retar" al EpVf con un potente mutágeno, la Mitomicina C (MMC), que en combinación con el extracto a diferentes concentraciones, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, pero sí lo hicieron con respecto a su Control Positivo (CP). El IR por otro lado, no se vió afectado por el EpVf a ninguna concentración ni en ningún tratamiento. Respecto a la frecuencia de ICH, se puede decir que el EpVf no induce la formación de éstos a ninguna concentración, sin embargo, logra abatir el efecto de la MMC, independientemente de la concentración del extracto empleada.

Las proteínas presentes en el EpVf lograron separarse e identificarse mediante la elaboración de una Electroforesis SDS-PAGE, que mostró la presencia de 12 proteínas conformando el extracto, además de que por medio de la determinación de sus Pesos Moleculares (PM), presuntamente también se logró identificar a la lectina VFA como parte del extracto.

Los resultados obtenidos llevaron a las conclusiones de que el EpVf tiene la capacidad de contrarrestar los efectos producidos por la MMC, ayudando a las células a entrar en mitosis; por otro lado, el IR indicó que el extracto no produce efecto citotóxico alguno. El efecto de disminución de la frecuencia de ICH ejercido por el EpVf, indica un efecto de protección sobre el material genético, es decir, ejerce un efecto Antigenotóxico, el cual puede atribuírsele a la lectina VFA, identificada en la electroforesis SDS-PAGE realizada al EpVf.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. CÁNCER

#### 2.1.1. Generalidades

El cáncer es un desorden caracterizado por una incontrolada división celular, de modo que es un desorden genético. Se han identificado más de 100 tipos de cánceres humanos que pueden comportarse de maneras diferentes según los tipos celulares que se encuentren implicados, clasificados de acuerdo al tipo de célula en el cual se origina (Klug et al., 2006). Sin embargo, el cáncer es una colección de muchos desórdenes y algunas características más comunes son:

- Se origina en una sola célula, la cual sufre una serie de cambios que se acumulan durante la división celular. El distintivo de una célula cancerosa es que, al dividirse, produce dos células hijas cancerosas.
- A nivel genético y celular, es un proceso que se produce poco a poco, comenzando con un cambio genético precanceroso, con cambios genéticos adicionales y progresando al crecimiento de células cancerosas.
- Una vez que el crecimiento celular se ha vuelto maligno, las células cancerosas producen invasión y metástasis, migrando a otras partes del cuerpo. (Brooker, 2005).

Una de las características fundamentales de las células cancerosas, es la pérdida de la capacidad de controlar su crecimiento y división, haciéndolo cuando y donde, no deben hacerlo, produciendo una proliferación desorganizada que origina un tumor. Desde los primeros años de investigación, se han formulado dos hipótesis que tratan de explicar el fenómeno tumoral basándose en la genética: la primera sostiene que el cáncer se produce debido a una acumulación de mutaciones somáticas, de manera que los fenotipos cancerosos más extremos son el resultado de una serie de mutaciones. Por otro lado, también se cree que la mayoría de los cánceres pueden ser resultado de la inserción de material genético extraño como el de virus tumorales que infectan células normales (Santos et al., 1986). Los estudios recientes demuestran que estas dos hipótesis no explican todos los tipos de cáncer aunque tampoco se excluyen mutuamente por lo que posiblemente ambos fenómenos desempeñan un papel fundamental en algunas clases de cáncer.

Los avances realizados en materia del cáncer han permitido incluso, llegar a afirmar que el cáncer es una enfermedad genética, ya que se asocia a alteraciones genómicas que pueden ser desde la sustitución de un sólo nucleótido, hasta grandes reorganizaciones cromosómicas, amplificaciones y deleciones que se producen predominantemente en células somáticas (Klug et al., 2006). A pesar de esto, en la mayoría de los casos no puede considerarse una enfermedad hereditaria, ya que las

alteraciones asociadas a tumores casi siempre son de tipo somático, adquiriéndose a lo largo de la vida del individuo y no por herencia. Se considera que sólo del 5 al 10% de los cánceres, poseen una alta predisposición a desarrollarse por factores hereditarios, incrementando la susceptibilidad de la persona a determinados tipos de cáncer; mientras que un 90 a 95% son los adquiridos por el individuo a lo largo de su vida (Brooker, 2005).

A diferencia de otras enfermedades genéticas, el cáncer no es producto de una mutación específica, sino más bien de una acumulación de mutaciones que se ha llegado a estimar entre 6 y 10. Dichas mutaciones, afectan a diversas funciones celulares tales como: reparación del DNA, proliferación celular, apoptosis, diferenciación celular y adhesión celular.

### **2.1.1.1. Ciclo Celular**

El ciclo de celular, es el mecanismo mediante el cual todo organismo vivo se propaga. Pero además de dar origen a nuevas células, también tienen el objetivo de asegurar que dicha división se lleve a cabo de forma correcta y con la regulación adecuada (Lewin, 2000).

Los organismos multicelulares requieren muchas más secuencias de divisiones celulares para crear un nuevo individuo, además de que es necesaria para reemplazar células perdidas por el desgaste, mal funcionamiento o bien, por muerte celular programada; mientras que en los organismos unicelulares la división celular implica más bien una reproducción.

La velocidad de la división celular en un organismo multicelular es crítica, pues debe ser la adecuada para la producción de la cantidad de células necesarias para el crecimiento y reemplazo de la cantidad exacta eliminada por el organismo mediante una muerte celular programada o por deterioro. Sin embargo, si en este proceso se genera un desbalance como un aumento exagerado de la división celular de una célula en particular, cuando no es necesario, se produce un funcionamiento anormal primeramente del órgano y posteriormente del organismo, como se puede presenciar en algunos casos de cáncer. (Kohn et al., 2002; Celada, 1996).

Sin embargo, todos los procesos ocurridos durante el ciclo celular, se encuentran regulados mediante un sistema de control central, el cual es un dispositivo bioquímico cíclico, compuesto de un grupo de proteínas que inducen y coordinan los procesos que ocurren durante el ciclo celular. El sistema de control se encuentra regulado por factores de retraso capaces de parar el ciclo celular en puntos de control determinados, por medio de señales de retroalimentación que puede retrasar el sistema control a fin de evitar que se pase a la etapa siguiente cuando el anterior no ha terminado adecuadamente (Darzynkiewicz, 2002).

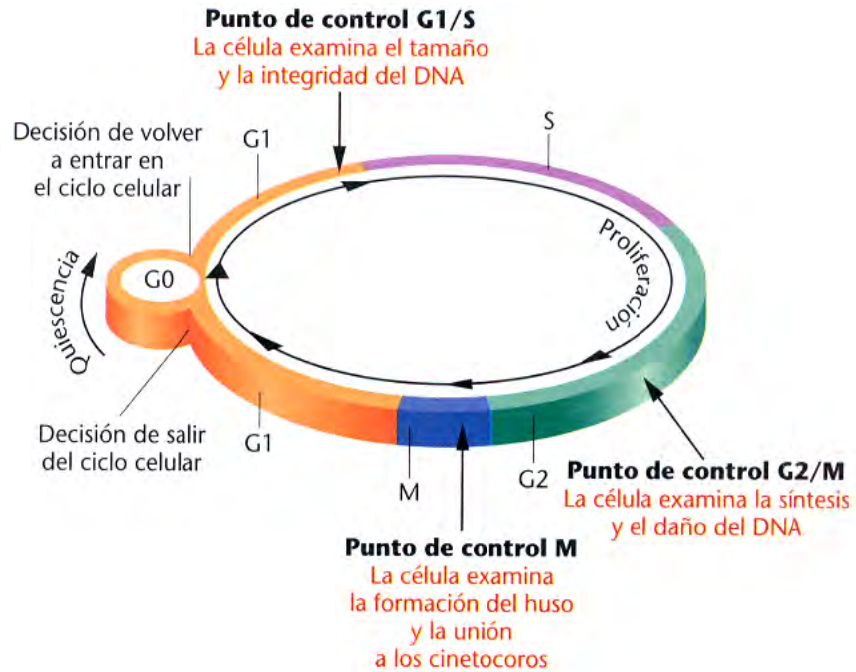


Figura 1. Puntos de control y decisión a lo largo del ciclo celular (Klug et al., 2006)

El sistema de control del ciclo celular, se encuentra a cargo de dos familias de proteínas:

- **Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDK):** son proteínas (enzimas), cuya actividad se encuentra regulada por ciclinas y catalizan la fosforilación transitoria y reversible, de residuos de serinas y treoninas de las proteínas diana que es determinada por la ciclina que se le asocia.
- **Ciclinas (CDC):** estas proteínas aparecen y desaparecen durante el ciclo celular y se unen a las cdk controlando las reacciones de fosforilación, dependiendo de la fase en la que se encuentre. Existen dos clases de ciclinas, las que se unen a cdk durante G2 induciendo a la célula a entrar en mitosis, por lo que se llama Factor Promotor de la Mitosis (FPM), y la segunda clase se unen durante G1 para promover el paso de G1 a S.

Ambas proteínas, al unirse, producen complejos capaces de activar o desactivar los procesos centrales que dirigen el ciclo celular ya que la fosforilación es el principio de una cascada de sucesos cuyo objetivo es la activación de factores de transcripción específicos que promueven la expresión de genes cuyos productos se requieren en la siguiente fase del ciclo celular (Griffiths et al., 2000).

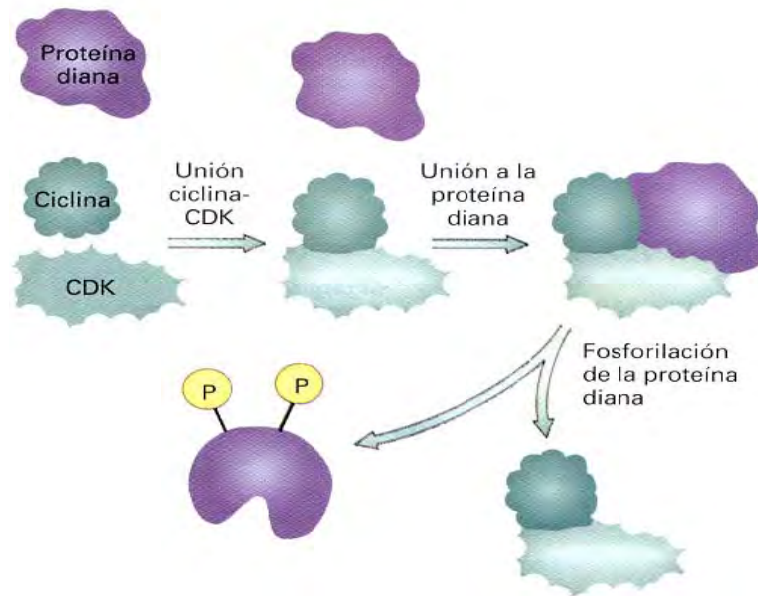


Figura 2. Pasos de la fosforilación por el complejo ciclina-CDK (Griffiths et al., 2000)

En la Figura 2, se representan los pasos mediante los cuales, las proteínas diana son fosforiladas. Primero se produce la unión de la ciclina con la CDK para la formación de complejo ciclina-CDK activo; posteriormente la proteína diana se une a la ciclina del complejo de modo que los sitios de fosforilación se encuentren próximos al centro activo de la CDK. Finalmente, cuando la proteína diana es fosforilada, pierde la capacidad de unión a la ciclina, liberándose del complejo.

Cada punto control del ciclo celular, así como, cada una de las actividades de las moléculas que controlan el ciclo celular, se encuentran regulados genéticamente por la interacción de genes cuyos productos promueven o inhiben la división celular. Mutaciones o la expresión errónea de cualquiera de los genes que controlan el ciclo celular, contribuyen al desarrollo de cáncer de muchas maneras. Un ejemplo de esto es: si los genes que controlan los puntos de control G1/S o G2/M son defectuosos, la célula puede continuar el ciclo antes de reparar los daños en el DNA, produciéndose una acumulación de mutaciones en genes que producen una proliferación incontrolada y metástasis. Pero si los genes que controlan la progresión por el ciclo celular, como los que codifican para las ciclinas, se expresan inadecuadamente, la célula puede continuar ciclando y ser incapaz de salir del ciclo y entrar a G0 (Klug et al., 2006).

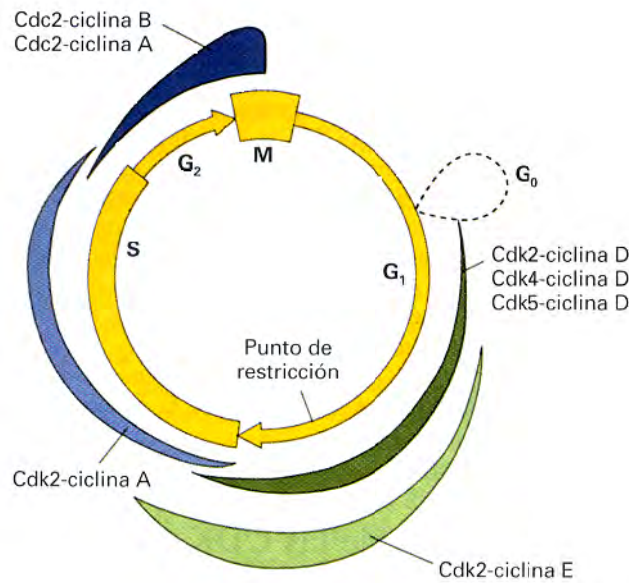


Figura 3. Tipos de complejos ciclina-CDK, formados a lo largo del ciclo celular en células de mamíferos. La anchura de las bandas indican la actividad de la cinasa relativa a los diferentes complejos (Griffiths et al., 2000)

### 2.1.1.2. Apoptosis o muerte celular programada

La apoptosis o muerte celular programada, es un tipo de muerte celular que ocurre bajo condiciones fisiológicas, se encuentra bajo control genético al igual que los procesos de proliferación y diferenciación celular, y debido a que la célula tiene una participación activa en su destrucción, se le ha comparado con un "suicidio", además de que se presenta de manera predecible a lo largo del desarrollo de un organismo (Gómez, A. y Zentella, A., 1999).

Los estudios realizados sobre este proceso, evidencian que la mayoría de las células animales son capaces de seguir esta vía aún en aquellas en las que normalmente no se activa, pues esta programación genética de autodestrucción forma parte de las respuestas celulares a señales externas o a cambios en las condiciones celulares internas.

Generalmente los términos apoptosis y muerte celular programada se utilizan como sinónimos, sin embargo, el término muerte celular programada se refiere al proceso de decisión que lleva a la autodestrucción de la célula, mientras que apoptosis se refiere al proceso bioquímico y cambios morfológicos que ocurre durante la muerte celular, una vez que se ha llevado a cabo la activación del programa de muerte (Gómez, A. y Zentella, A., 1999).

La apoptosis implica una misma serie de pasos independientemente de las circunstancias que la provoquen:

1. Condensación del citoplasma y reducción del volumen celular, con cambios estructurales de la estructura del núcleo (fragmentación del DNA cromosómico)



2. Condensación de la cromatina con formación de cúmulos densos adosados a la membrana nuclear
3. Invaginación de la membrana nuclear
4. Fragmentación del núcleo en estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina
5. Formación de cuerpos apoptóticos que son fragmentos de la célula formando racimos de vesículas de tamaño variable que contienen organelos intactos que no se fusionan con lisosomas, con pérdida de la morfología normal de la célula
6. Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos a cargo de los macrófagos *in vivo*, mientras que *in vitro*, éstos se desintegran (Gómez, A. y Zentella, A., 1999; Klug et al., 2006).

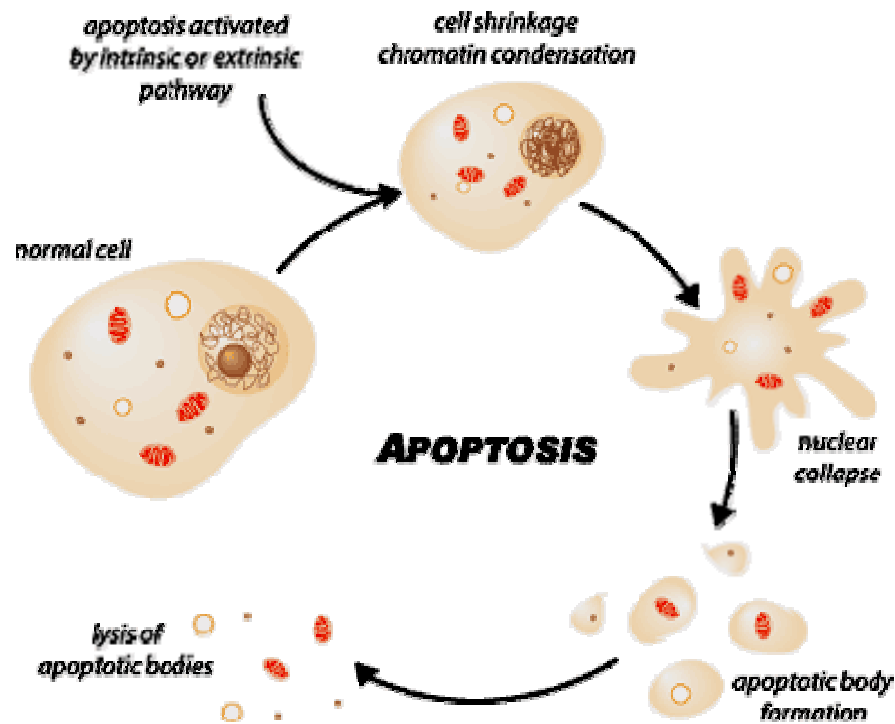


Figura 4. Proceso de Apoptosis (Yau, 2004)

Kerr, Wyllie y Currie, en 1972, propusieron que este proceso es determinante en el mantenimiento de la constitución celular de los tejidos, por lo que es un mecanismo fisiológico de selección (Gómez, A. y Zentella, A., 1999). La muerte celular programada, representa un importante mecanismo homeostático, cuya principal función es mantener más o menos constante la cantidad de células a lo largo de toda la vida. Los procesos bioquímicos y macromoleculares ocurridos durante la apoptosis, son diferentes a los producidos por la muerte celular por necrosis. Una de las principales

consecuencias fisiológicas de la apoptosis es que la célula que muere no activa el sistema inmunitario del huésped, ya que el material intracelular no es liberado al medio intersticial, ni afecta a las células vecinas, a diferencia de la necrosis que generalmente va acompañada de una respuesta inflamatoria por la liberación de contenido citoplasmático al espacio intersticial, afectando las células adyacentes (Gómez, A. y Zentella, A., 1999; Klug et al., 2006).

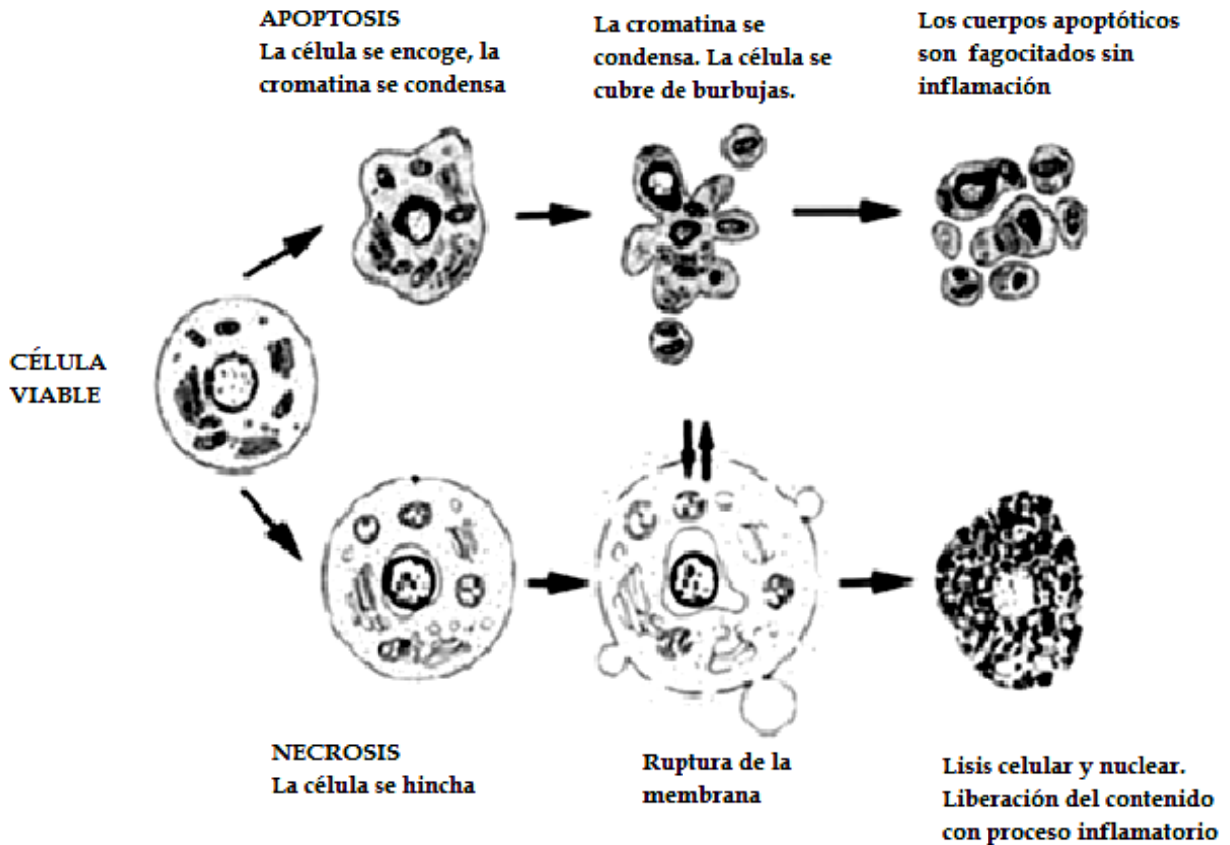


Figura 5. Diferencias entre necrosis y apoptosis (Valenzuela, 2008)

Las caspasas, poseen un elevado contenido de cisteínas que al activarse, cortan residuos de aspartato de proteínas diana. En células normales, éstas se encuentran en forma inactiva llamada zimógeno, que es activado al eliminarse una parte del polipéptido que lo compone mediante proteólisis. Existen dos tipos de caspasas: las iniciadoras y ejecutoras; al ser activadas las iniciadoras, actúan sobre las ejecutoras que activan la cascada proteolítica.

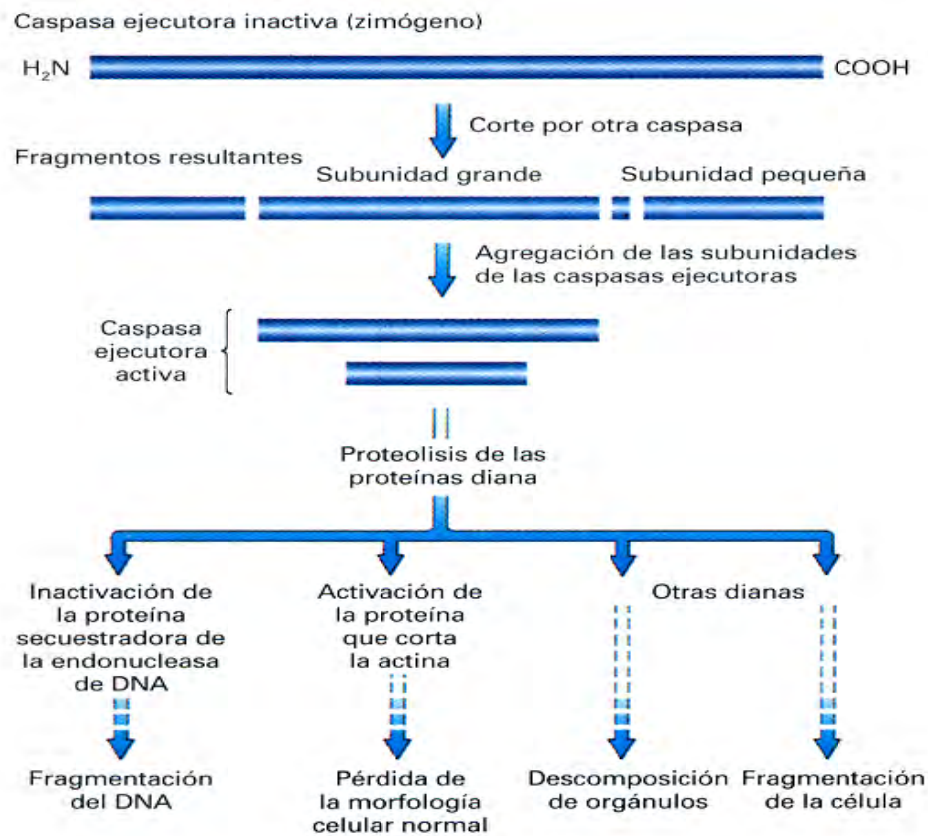


Figura 6. Acción de las caspasas ejecutoras en la apoptosis (Griffiths et al., 2000)

La cascada comienza cuando una caspasa corta la forma zimógeno o inactiva de la caspasa ejecutora en sitios específicos donde se encuentren residuos de aspartato, liberando varios fragmentos proteínicos. La subunidad grande y pequeña se unen y configura la caspasa enzimáticamente activa; entonces, las caspasas ejecutoras actúan sobre las proteínas diana (cortando las proteínas en residuos de aspartato específicos), promoviendo los procesos que conducen a la muerte y eliminación de células (Griffiths et al., 2000).

El proceso de apoptosis se encuentra genéticamente controlado de modo que la regulación de productos génicos específicos como las proteínas Bcl2 y BAX, pueden estimular o evitar la apoptosis. En una célula normal la concentración de Bcl2 y BAX se encuentran equilibradas, formándose heterodímeros inactivos, pero un exceso de Bcl2 resulta en la formación de homodímeros Bcl2 evitando la apoptosis, por tal motivo, las células cancerosas con una sobreexpresión de Bcl2 son resistentes a la quimioterapia y radioterapia. Por otro lado, un exceso de BAX produce homodímeros BAX, induciendo a apoptosis. La proteína p53 activada induce la transcripción de BAX e inhibe la de Bcl2, conduciendo a la muerte celular, sin embargo, en muchas células cancerosas, p53 es defectuosa, lo que evita que la ruta apoptótica elimine las células cancerosas.

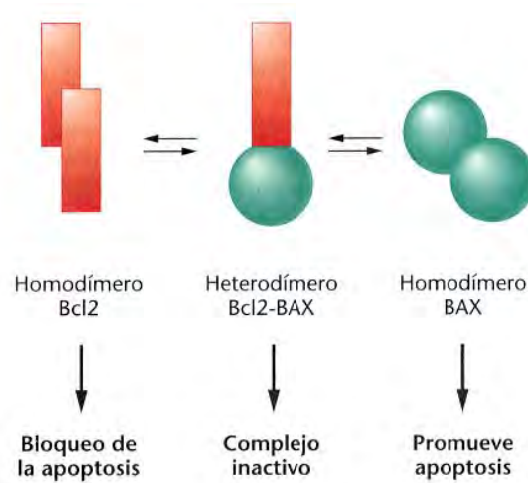


Figura 7. Proteínas Bcl2 y BAX reguladoras de la apoptosis (Klug et al., 2006)

Debido a que la muerte celular programada se encuentra controlada por información genética, este proceso también puede verse afectado por mutaciones que al alterar la regulación del proceso de muerte, podría resultar en un retardo o ausencia de la misma, este resulta fundamental pues, eliminándose las células dañadas, se reduce el número de mutaciones que pueden propagarse a la siguiente generación, incluyendo las que poseen genes causantes de cáncer. Se sabe también, que los mismos genes que regulan los puntos control del ciclo celular pueden estimular la apoptosis, mismos, que se encuentran mutados en una amplia variedad de cánceres (Gómez, A. y Zentella, A., 1999; Klug et al., 2006).

### 2.1.1.3. Mecanismos de Reparación del DNA

Para la permanencia de un organismo vivo, es requisito indispensable que el DNA dentro de sus células, permanezca prácticamente invariable conforme la información pasa de una célula a otra o de un individuo a otro; esta molécula es una de las más susceptibles al daño ambiental. La variación que surge de los cambios en las secuencias de DNA, produce la variabilidad fenotípica, adaptación a los cambios ambientales y evolución, por lo que las mutaciones génicas son el origen de la variación genética entre las poblaciones, aunque también, son el origen de cambios genéticos que conducen a la muerte celular, enfermedades genéticas y al cáncer (Klug et al., 2006).

Existen mecanismos de reparación muy eficientes para los daños producidos en el material hereditario, sin embargo, cuando la magnitud de éstas lesiones es grande y no pueden repararse, se produce entonces una lesión permanente, es decir, una mutación en el DNA, la cual puede definirse como una alteración en la secuencia de pares de bases, los cambios en cualquier parte de la molécula de DNA que puede comprender la substitución de un solo par de bases, la delección o inserción de uno o más pares de bases, así como una alteración importante en la estructura de un cromosoma.

Las mutaciones pueden ser de tres tipos: Espontáneas, que son aquellas que se producen de manera natural y se encuentran relacionadas a procesos químicos o biológicos normales del organismo que alteran la estructura de las bases nitrogenadas; Inducidas que son resultado de agentes naturales y artificiales; y Adaptativas que gira en torno a la idea de que un organismo puede seleccionar o dirigir la naturaleza de una mutación génica para adaptarse a un cambio ambiental concreto (Klug et al., 2006).

Si la lesión o mutación ocurre en una célula que se encuentra en camino a convertirse en gameto, la alteración genética puede heredarse a la próxima generación, pero si dicha mutación se produce sobre una célula no reproductiva, puede conducir a una transformación maligna de la célula (Karp, 1998).

Tanto las células procariotas como las eucariotas poseen varias enzimas que vigilan el DNA a fin de detectar alteraciones que puedan reparar, y en la mayor parte de dichos sistemas de reparación, requieren que la sección dañada sea escindida (eliminada) selectivamente. Esto puede llevarse a cabo gracias a una de las propiedades del DNA dúplex, en el que cada cadena contiene la información necesaria para servir de plantilla y reconstruir a la cadena complementaria (Karp, 1998).

- **Reparación por excisión de nucleótidos:** Estos sistemas actúan eliminando una pequeña sección de la cadena de DNA como dímeros de pirimidina o nucleótidos a los cuales se han fijado ciertos grupos químicos. Un par de endonucleasas practican incisiones en el esqueleto de la cadena alterada a cada lado de la lesión. El oligonucleótido dañado unido únicamente por puentes de hidrógeno, es removido por una DNA helicasa, posteriormente una DNA polimerasa rellena el hueco producido por complementariedad de bases y la cadena finalmente es sellada por un DNA ligasa.
- **Reparación por excisión de bases:** Una DNA glucosilasa, reconoce el daño y elimina la base por desdoblamiento del enlace glucosídico que la une al azúcar. Existen diferentes tipos de DNA glucosilasas, cada una más o menos específica para cada tipo de base, una vez extraída, el fosfato de desoxirribosa que permanece en el sitio es removido por una endonucleasa. Una fosfodiesterasa amplía la abertura, una DNA polimerasa rellena el hueco y la cadena nuevamente vuelve a sellarse por acción de una ligasa.
- **Reparación de desigualdades:** Las células pueden eliminar bases no coincidentes incorporadas por la DNA polimerasa durante la duplicación y que escaparon a la corrección de la endonucleasa. Esta desigualdad entre los pares de bases provoca una deformación de la doble hélice la cual puede ser reconocida por una enzima de reparación. Para esto, es sumamente necesario que se reconozca la cadena recién



sintetizada, es decir, aquella que contiene el nucleótido incorrecto a fin de no eliminar el nucleótido correcto y causar una mutación permanente. Por lo tanto, se elimina y sustituye el nucleótido correctamente (Karp, 1998).

#### **2.1.1.4. Diferenciación celular**

La diferenciación celular es el proceso mediante el cual se generan diferencias entre las células de un organismo, ocurriendo durante toda la vida del mismo, aunque es más notorio en el periodo embrionario. La especialización gradual en estructura y función que sufren las células durante la histogénesis, que comprende el desarrollo desde células no diferenciadas de una capa germinativa hasta células diferenciadas de un tejido, es la expresión de la diferenciación celular, la cual se basa en variaciones de la actividad del material genético. Esto no quiere decir que el material genético se modifique sino más bien que la especialización, que es una consecuencia de la diferenciación, no se basa en diferencias genéticas, sino en los distintos genes que se expresan; cuando la célula se diferencia, se deben activar determinadas zonas del genoma, mientras que otras se desactivan (Finn, 2001).

La regulación normal de la proliferación y diferenciación celular implica un gran número de productos génicos que controlan las fases del ciclo celular, la muerte celular programada y la respuesta de las células a las señales externas de crecimiento. Las células cancerosas, poseen mutaciones en los genes encargados de controlar estas funciones o se expresan de manera aberrante, conduciendo a una proliferación celular incontrolada (Klug et al., 2006).

Ciertos tipos de células, no dejan el ciclo celular pasando por las fases G1, S, G2 y M hasta recibir la señal que les indique que dejen de proliferar y entrar a G0 donde permanecen metabólicamente activas pero no crecen ni se dividen. Por otro lado, existen células que nunca vuelven a entrar al ciclo celular. En cambio, las células cancerosas son incapaces de entrar a G0 y ciclan de manera continua. Si bien su tasa de proliferación no es mayor a la normal, no puede convertirse en quiescente en el momento y lugar necesarios (Klug et al., 2006).

Sin embargo, las células en G0 pueden ser estimuladas por señales de crecimiento externas que le indican que deben volver al ciclo celular. Esto se lleva a cabo mediante moléculas como: factores de crecimiento y hormonas que se unen a los receptores transmitiendo la señal desde la membrana plasmática hasta las moléculas de transducción de señales localizadas en el citoplasma, lo que implica una cascada de fosforilaciones proteínicas y de cambios conformacionales que a través de una vía multiproteica hacen llegar la señal al núcleo. Pero muy a menudo, las células cancerosas poseen defectos en las vías de transducción de señales, debido a receptores de superficie celular o



moléculas citoplasmáticas anormales, que envían continuamente al núcleo, señales de crecimiento, incluso en ausencia de ellas (Klug et al., 2006).

Los diferentes tipos de cáncer se desarrollan en pasos sucesivos, de células ligeramente aberrantes a células cada vez más tumorigénicas y malignas. La naturaleza en múltiples pasos del desarrollo del cáncer y su relación con la diferenciación celular, puede ilustrarse con la observación del desarrollo de cánceres cervicales por ejemplo, pues en un cérvix normal, las células de la capa basal se dividen y diferencian en células quiescentes que con el tiempo salen a la superficie del cérvix. Cuando las células de la capa basal adquieren mutaciones, crecen de manera anormal y pierden parte de su capacidad para diferenciarse y convertirse en quiescentes formándose una displasia que al paso de los años va adquiriendo más mutaciones y sin poder diferenciarse, se convierte en un carcinoma *in situ* que puede progresar gradualmente hasta una malignidad completa caracterizada por células que se separan del tumor, atraviesan lámina basal e invaden los tejidos adyacentes (Klug et al., 2006).

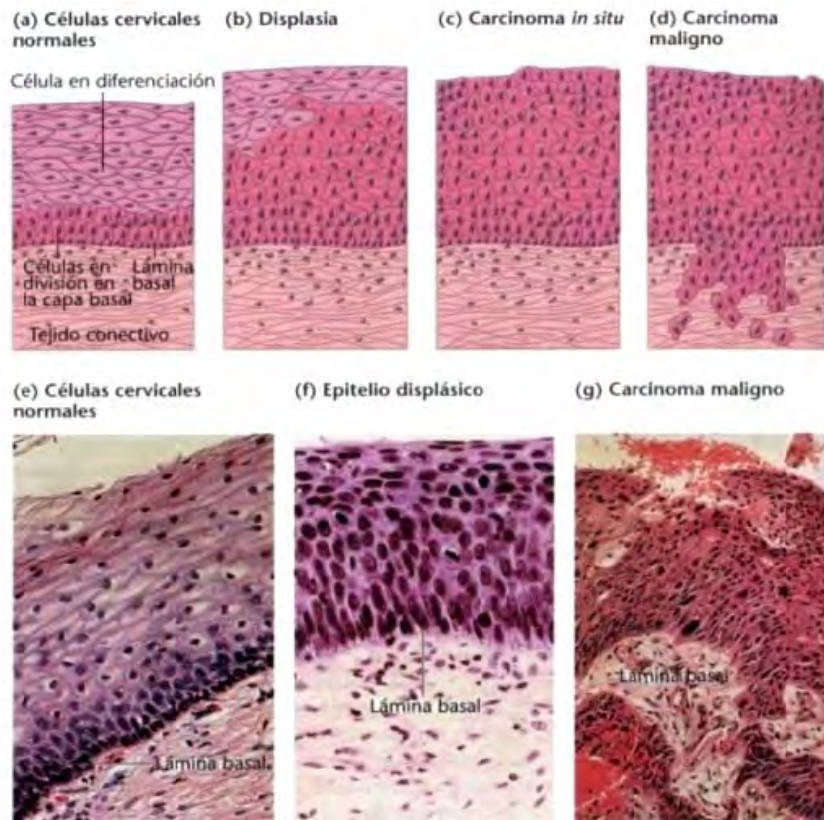


Figura 8. Estadios de desarrollo del cáncer cervical (Klug et al., 2006)

### 2.1.1.5. Adhesión celular

A parte del crecimiento incontrolado que presentan las células cancerosas, también poseen otra característica, la metástasis, que es la capacidad de desprenderse del tumor original, entrar al sistema sanguíneo o linfático, invadir los tejidos adyacentes y desarrollar tumores secundarios. Para dicho fin, se produce la digestión, por acción de enzimas, de componentes de la matriz extracelular y de la lámina basal que separan los tejidos, las cuales se encuentran conformadas por proteínas y carbohidratos que forman el andamio para el crecimiento de los tejidos, inhibiendo la migración celular. Se sabe poco a cerca de los genes que controlan la metástasis, pero es probable que sea controlada por un gran número de genes, incluyendo los que codifican para moléculas de adhesión celular y enzimas proteolíticas, por ejemplo, en tumores especialmente malignos algunas enzimas proteolíticas como las metaloproteinasas se encuentran presentes en niveles más altos a los normales, siendo insensibles al control de moléculas reguladoras como los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP).

Por tanto, la expresión inadecuada de moléculas de adhesión celular y enzimas proteolíticas pueden ayudar a que las células tumorales relajen las restricciones normales de localización celular y generen agujeros por los que las células tumorales puedan pasar y llegar a sistema circulatorio. Además, las células malignas no responden a señales externas de las células vecinas que normalmente inhiben la proliferación celular en un tejido maduro (Klug et al., 2006).

Existen muchos mecanismos de regulación del número celular, rutas de control de la proliferación y apoptosis. Sin embargo, la activación de estas rutas requiere la presencia de un conjunto específico de estímulos positivos, así como la ausencia de estímulos negativos o inhibitorios. Las células poseen mecanismos tanto para evaluar su estado y capacidad de proliferación, además que las células vecinas pueden comunicarse con ellas emitiéndoles órdenes mediante señales intracelulares, indicándoles acciones como proliferación o detención de la progresión del ciclo celular, así como, para que se inicie o posponga la apoptosis (Klug et al., 2006).

### 2.1.2. Mutagénesis y Carcinogénesis

La **mutagénesis** es una modificación del material genético que resulta estable y transmisible a las células hijas surgidas del proceso de división celular o mitosis. Es un proceso tóxico mediante el cual algunos xenobióticos son capaces de inducir una mutación o cambio en la secuencia normal de los pares de bases que caracterizan la estructura de cada molécula de DNA. Dicha mutación puede ser espontánea debido a un error en la replicación o reparación del DNA; o bien, puede ser inducida por efecto de agentes físico y químicos que han penetrado al organismo vivo.



Cuando el DNA afectado corresponde a células de línea germinal, se producirán mutaciones potencialmente transmisibles a la descendencia, es decir, hereditarias; mientras que si corresponden a células somáticas únicamente afectarán las características específicas de la célula en cuestión, transmitiéndose a células hijas del propio individuo. Las consecuencias de dichas mutaciones pueden variar, desde, dar lugar a malformaciones congénitas, enfermedades de carácter hereditario o susceptibilidad a determinadas enfermedades, hasta el desarrollo de un proceso canceroso (Bello, J. y López de Cerain, A., 2001).

En la década de los años 80 se confirmó experimentalmente el papel de la mutación en el desarrollo del proceso canceroso con el descubrimiento de los oncogenes derivados de protooncogenes mutados. En la actualidad se sabe que la mayoría de los compuestos químicos carcinogénicos también ejercen un efecto mutagénico, denominados *carcinógenos genotóxicos*, aunque existen otros que actúan mediante mecanismos distintos conocidos como *carcinógenos no genotóxicos* o *epigenéticos*.

Las mutaciones pueden reunirse en dos grandes grupos:

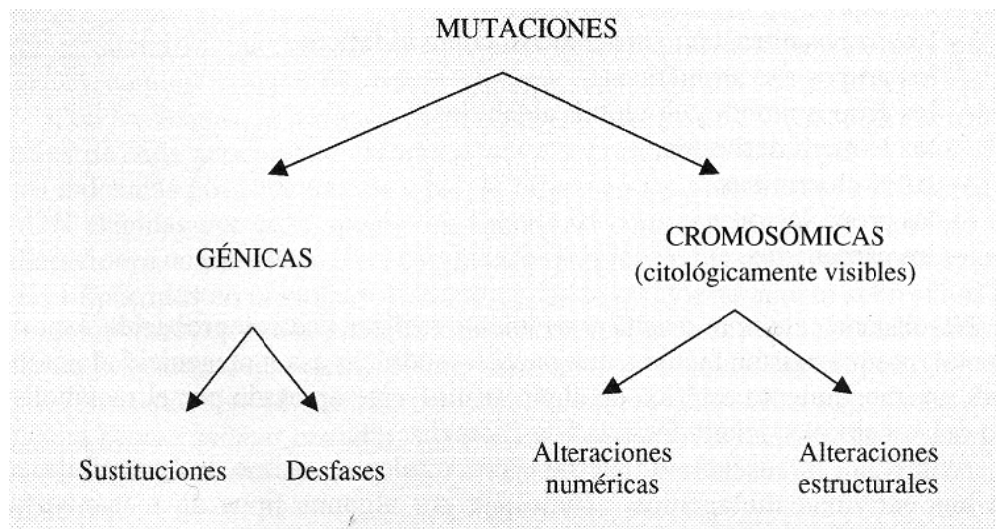


Figura 9. Tipos de mutaciones (Bello, J. y López de Cerain, A., 2001)

1. **Mutaciones génicas:** son de tamaño pequeño afectando a uno o varios de los pares de bases del DNA. No interfieren en el proceso de mitosis o meiosis, a no ser que el gen afectado sea alguno de los que codifican proteínas que desarrollan funciones en esos procesos.

2. **Mutaciones cromosómicas:** son cambios que afectan a grandes fragmentos de DNA y pueden contener cientos, o miles de pares de bases e incluso cromosomas enteros o guarniciones cromosómicas completas, también denominadas aberraciones cromosómicas, detectables al microscopio óptico con la aplicación de técnicas citogenéticas.

Ahora se conoce el papel de los desórdenes genéticos sobre el desarrollo de algunas enfermedades, por lo que resulta evidente el gran impacto que las mutaciones y alteraciones cromosómicas ejercen sobre la salud humana. Muchas enfermedades se heredan de acuerdo con un patrón de herencia mendeliana simple aunque las mutaciones génicas también influyen en el desarrollo de otras enfermedades que presentan un componente genético con etiología muy compleja (Bello, J. y López de Cerain, A., 2001).

El estudio molecular de oncogenes y genes supresores ha manifestado la importancia de la mutación en el desarrollo del cáncer:

**ONCOGENES:** Son genes cuya actividad normal promueve la proliferación celular. Las mutaciones de ganancia de función en células tumorales crean formas que muestran actividad excesiva o inapropiada. Un alelo mutante aislado puede afectar el fenotipo de la célula, los de tipo no mutante se denominan protooncogen (Strachan et al., 2004).

**GENES SUPRESORES DE TUMOR (ST):** Los productos de este tipo de genes, inhiben acontecimientos que conducen al cáncer. La versión mutante en células cancerosas, han perdido su función. Algunos productos de estos los genes ST impiden la progresión inapropiada del ciclo celular, otros provocan que las células entren a apoptosis, mientras que varios mantienen estable el genoma y las tasas de mutación bajas a fin de asegurar la replicación, reparación y segregación precisas del DNA celular. Es necesario afectar ambos alelos de un gen ST para cambiar la conducta de la célula (Strachan et al., 2004).

Mientras que los protooncogenes codifican proteínas que controlan el crecimiento y la diferenciación celular, cuando mutan, pueden transformarse en oncogenes que causan cáncer. La mayoría de los oncogenes se comportan como mutaciones dominantes con ganancia de función que dan lugar a la pérdida de la regulación del ciclo celular. A diferencia de los genes supresores de tumores, la gran parte de los oncogenes no muestran mutaciones germinales que causen síndromes

de cáncer hereditarios. Se han observado mutaciones somáticas que producen cáncer esporádico (Carey, J. y White, B; 2004).

Se ha confirmado la existencia de la asociación entre una mutación y el desarrollo de muchos tipos de cáncer debido a:

- Alta correlación entre la mutagenicidad y la carcinogenicidad de diversos compuestos químicos.
- Elevado riesgo de padecer cáncer por personas con síndromes de inestabilidad cromosómica o deficiencias en la reparación del DNA.
- Alteraciones cromosómicas observadas en Leucemias y tumores sólidos (Bello, J. y López de Cerain, A; 2001).

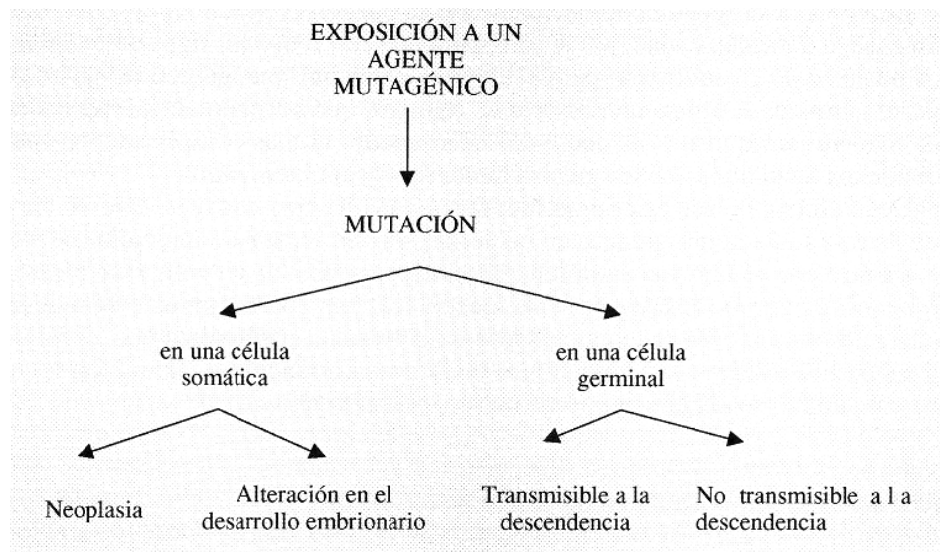


Figura 10. Posibles consecuencias de la mutación (Bello, J. y López de Cerain, A; 2001)

La **carcinogénesis** química es considerada un proceso multiestadio que generalmente posee un desarrollo lento, se inicia con la primera exposición al agente causal, le sigue un periodo de latencia que posee una duración variable y desemboca en la manifestación clínica de un tumor. Estudios han llevado a la conclusión de que la patogénesis neoplásica transcurre a través de un complejo mecanismo que puede dividirse en tres etapas definidas: *iniciación, promoción y propagación* (Figura 11).

El término multiestadio se refiere a que las células normales de un organismo no se transforman en células malignas de manera inmediata o por un solo evento, sino que por lo general, a

medida que el tumor crece van surgiendo, progresivamente, células más malignas, que poseen mayores diferencias genéticas y fenotípicas de la célula inicial. Se considera que los cambios estructurales en el genoma se producen en la primera y última etapa del proceso neoplásico (iniciación y progresión), mientras que en la etapa intermedia, se origina una multiplicación de la célula alterada, originando un clon de células preneoplásicas (Bello, J. y López de Cerain, A., 2001).

En esencia, el proceso de carcinogénesis es el mismo, pero los diferentes compuestos químicos a los que puede estar expuesto un organismo, a lo largo de su vida, pueden modificar la velocidad de todo el proceso alterando diversos factores como: frecuencia de mutación, ritmo de crecimiento de las células o la expresión fenotípica de los genes alterados. Sin embargo, la susceptibilidad de cada individuo, así como, sus niveles de defensas pueden interactuar con modificaciones en cada una de las etapas de este proceso. Por tanto, el mecanismo de carcinogénesis humana se ha descrito en una secuencia de eventos:

1. Exposición al agente carcinógeno
2. Metabolización del carcinógeno
3. Interacción del agente con componentes celulares, principalmente con DNA, con la ocurrencia de varias posibilidades:
  - Reparación del DNA dañado
  - Muerte de la célula
  - Persistencia de la célula mutada: origen de una célula “iniciada”, cuya replicación puede dar lugar a un clon de células anormales dentro del tejido. Etapa de iniciación.
4. Crecimiento de clones anormales a partir de células “iniciadas” (etapa de promoción), no detectable clínicamente.
5. Crecimiento de tumor y extensión a otras partes del cuerpo (etapa de propagación), apareciendo los signos y síntomas clínicos.



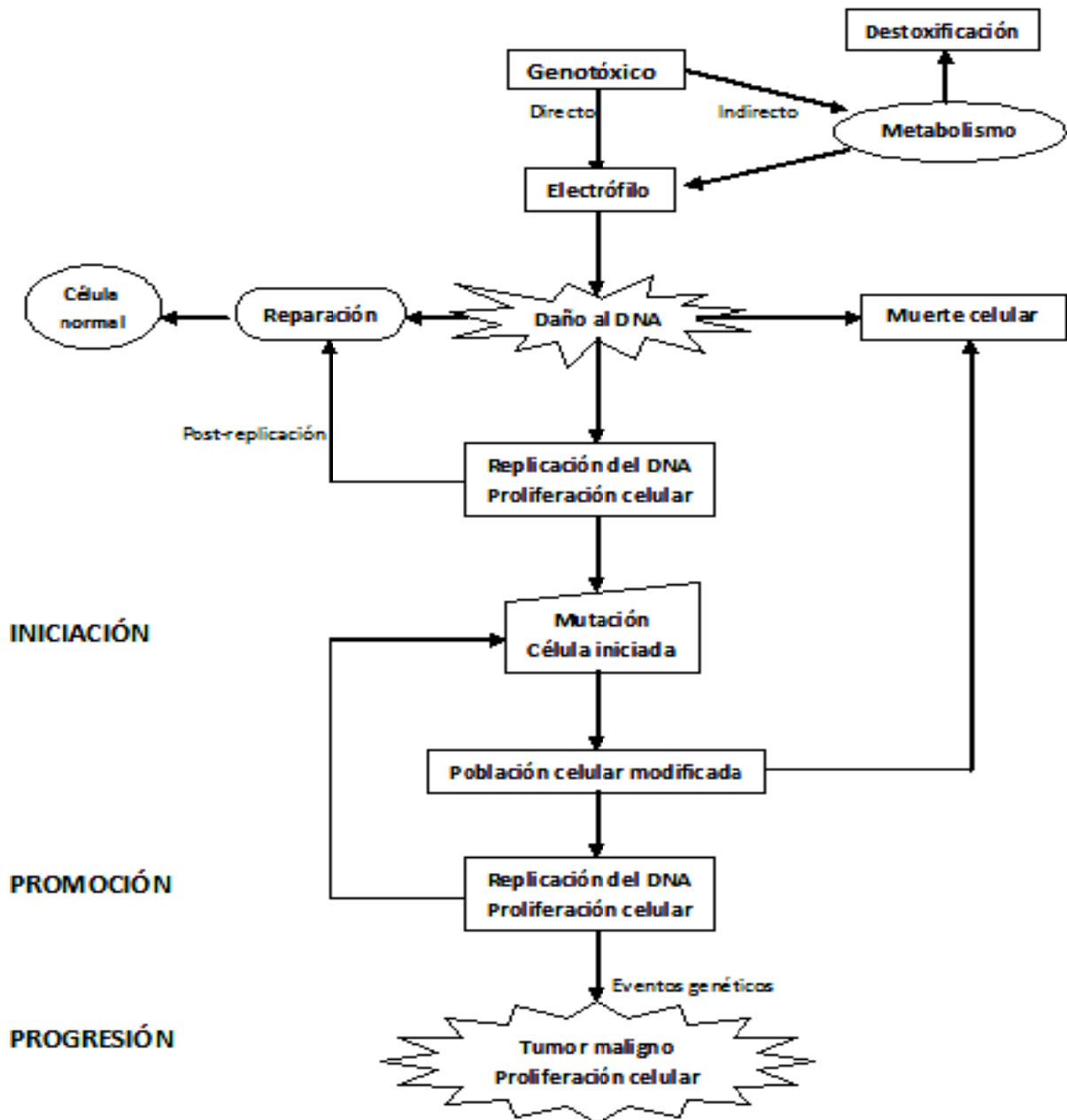


Figura 11. Etapas de la carcinogénesis (Pérez, 2000)

Se han clasificado los agentes químicos de acuerdo a la incidencia que éstos puedan tener sobre las tres etapas principales:

- Agentes iniciadores o carcinógenos incompletos:** únicamente son capaces de inducir la etapa de iniciación, originando células mutadas iniciadoras, por ejemplo, metil y etil-nitrosourea y uretano.
- Agentes promotores:** poseen la capacidad de causar la expansión clonal a partir de la célula mutada inicial, por ejemplo, fenobarbital y sacarina.

- c) **Carcinógenos completos:** son estructuras químicas que poseen la capacidad de inducir cáncer a partir de células normales, generalmente tienen propiedades de agentes iniciadores y promotores como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas y nitrosaminas (Bello, J. y López de Cerain, A., 2001).

#### **2.1.2.1. Métodos de Identificación de Carcinógenos**

Existen diversos métodos que ayudan al estudio e identificación de agentes carcinógenos, tales como:

##### **a) Pruebas a corto plazo**

- **Valoración de mutación de gen:**

- Valoración Bacterial-Ames (valoración de reversión de histidina en Salmonella)
- Valoración de timidincinasa en linfoma de ratón, mamífero Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa en ovario de criceto chino

- **Aberración cromosómica:**

- Valoración *in vitro* en líneas celulares
- Micronúcleos en ratón
- Estudios citogenéticos en médula ósea de rata

- **Daño primario del DNA:**

- Aductos de DNA luego de etiquetado con <sup>32</sup>P
- Rotura de filamento
- Inducción de reparación de DNA, bacterias: respuesta SOS
- Hígado de rata: inducción de síntesis no programada de DNA (UDS)
- Inducción de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH)

- **Transformación morfológica:**

- Embrión de cricetos sirio (SHE)
- Balb/c 3T3

##### **b) Pruebas a mediano plazo:**

- Análisis Cualitativo y Cuantitativo de preneoplasias

##### **c) Pruebas a largo plazo:**

- Bioensayo crónico en animales: biovaloración de dos años (Klaassen, C. y Watkins, J., 2005).

### 2.1.3. Manejo terapéutico del cáncer

Un tratamiento ideal implicaría la remoción o destrucción de las células cancerosas, pero en muchos casos, los pacientes sucumben con el tiempo debido a metástasis a sitios distantes o bien, no puede aplicarse dicho tratamiento debido a que el tumor involucra órganos vitales. Casi todos los tratamientos actuales para estos casos emplean agentes citotóxicos u hormonales o a veces, ambos y recientemente se han introducido también, algunos agentes inmunitarios. Los fármacos antineoplásicos son empleados para eliminar metástasis establecidas, prevenir recurrencias después de un tratamiento local o reducir el tamaño del tumor antes de tratamiento local (Kalant, H. y Roschlau, W., 2002).

#### 2.1.3.1. Tratamiento farmacológico

- **Quimioterapia**

Involucra el empleo de fármacos cuyo objetivo es destruir células proliferativas. Estos fármacos son llevados en circulación por lo que es particularmente aceptada en el tratamiento de tumores que han producido metástasis, aunque al igual que la radioterapia presenta el problema que inhibe la división de células tanto cancerosas como normales, trayendo consigo reacciones secundarias (diarrea, pérdida de cabello y susceptibilidad a infecciones). La efectividad aumenta con el empleo de varios fármacos en combinación, aunque esto también implica el aumento de sus efectos secundarios. Es empleada en conjunto con cirugía y radiación (Kleinsmith, L. & Kish, V., 1995).

Tabla 1. Clasificación de agentes antineoplásicos de acuerdo a su mecanismo de acción (Kalant, H. y Roschlau, W., 2002)

Clase	Agente antineoplásico
<b>Antimetabolitos</b>	Metotrexato, 5-fluorouracilo, 6-mercaptapurina, arabinósido citosina (Ara-C), gemcitabina, 6-tioguanina, fludarabina, 2-clorodesoxiadenosina
<b>Antibióticos</b>	Actinomicina D, bleomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, Mitoxantrona
<b>Agentes alquilantes</b>	Mostaza nitrogenada, melfalan, clorambucil, ciclofosfamida, ifosfamida, mecloretamina, busulfan, nitrosoureas, cisplatino, carboplatino, dacarbacina (DTIC), procarbacina, mitomicina C
<b>Inhibidores mitóticos</b>	Vincristina, vinblastina, vinorelbina, etopósido (VP-16), tenipósido (VM-26), paclitaxel y docetaxel, derivados de camptotecina
<b>Hormonas</b>	Glucocorticoides, tamoxifeno, agentes progestacionales, aminoglutetimida, Agonistas HLG, antiandrógenos
<b>Agentes diversos</b>	L-Aspariginasa, hidroxiaurea





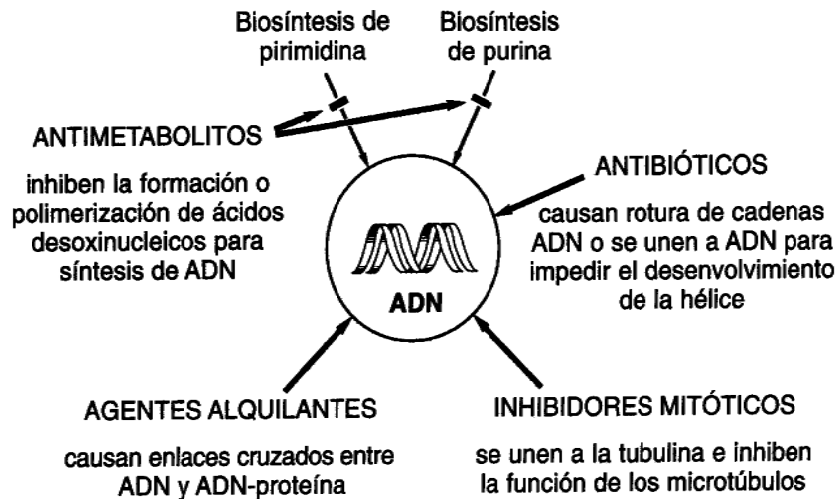


Figura 12. Mecanismos de acción de los principales grupos de fármacos antineoplásicos (Kalant, H. y Roschlau, W., 2002)

Algunos científicos predicen que en los próximos 25 años, las terapias génicas reemplazarán a las quimioterapias (Klug et al., 2006).

#### • Terapia Hormonal

Tiene el objetivo de atenuar más que curar; los estudios han sugerido que las hormonas empleadas como adyuvantes a la terapia primaria puede aumentar la probabilidad de cura. Alteran el medio hormonal corporal por eliminación o desplazamiento natural de hormonas por alguna extirpación médica del órgano que la producía o por el tratamiento con cantidades farmacológicas de hormonas o antihormonas. Las hormonas combinadas con otras o con agentes quimioterapéuticos ofrecen ventajas y desventajas sobre el uso secuencial de cada clase de agentes:

- Al combinarse la terapia hormonal con la quimioterapia, se pierden los beneficios del tratamiento hormonal no tóxico
- Se desconoce el componente que produce la respuesta dentro de la combinación
- Los agentes hormonales pueden interferir con la acción del fármaco citotóxico y viceversa (Joshina, 2001).

Para el tratamiento de cánceres dependientes de hormonas, se emplean algunos análogos sintéticos de hormonas y sus antagonistas, principalmente en cánceres de mama y próstata (Kalant, H. y Roschlau, W., 2002).



Tabla 2. Agentes hormonales anticancerígenos (Kalant, H. y Roschlau, W; 2002; Joshina, 2001; Wesley, 1992)

Tipo de cáncer	Agente hormonal
Cáncer de mama	Antiestrógenos, progestinas, estrógenos, aminoglutetimida, andrógenos, glucocorticoides, tamoxifeno
Cáncer endometrial	Acetato de megestrol, acetato de medroxiprogesterona, caprotato de hidroxiprogesterona
Cáncer prostático	Agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina, estrógenos, antiandrógenos
Cáncer de tiroides	Tiroxina
Linfoma/ Leucemia	Glucocorticoides, corticosteroides

La terapia hormonal es utilizada en pacientes con enfermedad de progresión lenta que permite su observación durante 2 a 3 meses. El empleo de estrógenos y andrógenos se debe a la observación de que los carcinomas mamarios y prostáticos son en cierto modo, dependientes de las hormonas, y su elección para el tratamiento depende de la edad del paciente. Sin embargo los efectos adversos de los estrógenos implican síntomas gastrointestinales, hipercalcemia, edema, hemorragia uterina y feminización en varones; los producidos por andrógenos en el tratamiento de cáncer mamario avanzado son virilización, edema e hipercalcemia (Wesley, 1992).

- **Modificadores de respuestas biológicas**

Estudios sugieren que anticuerpos inyectados pueden alcanzar tumores *in vivo* y unirse a células blanco y aunque se observa una aclaración de células circulando, el efecto posee una vida corta y tiene un impacto completo en el curso de la enfermedad. Sin embargo, la pérdida de la superficie antigénica debido a la modulación inmunitaria (internalización del complejo antígeno-anticuerpo) o el esparcimiento de la superficie puede ser un impedimento en el uso efectivo de esta terapia, pues la respuesta inmunitaria es requerida para atraer a la célula blanco. Las citocinas son otras propuestas debido a:

- La destrucción de las células tumorales directamente
- Inmunomoduladores para la activación de células como linfocitos NK y monocitos
- Agentes bloqueadores o reversores de la toxicidad relacionada a la quimioterapia
- Estimulantes para la sensibilización de células tumorales o como protección de las células normales durante la quimioterapia
- Pueden alterar la expresión de antígenos de superficie celular (Joshina, 2001).



### 2.1.3.2. Tratamiento no farmacológico

- **Cirugía**

Empleada para remover tumores localizados en una región particular del cuerpo, resultando un método efectivo en una etapa temprana de la enfermedad para minimizar las probabilidades de metástasis, desgraciadamente, el cáncer que involucra órganos internos presentan síntomas hasta que se han diseminado por el cuerpo, por lo que la probabilidad de realizar una cirugía puede reducirse también (Kleinsmith, L. & Kish, V., 1995). Por tanto, en la actualidad se ha comenzado a desarrollar la cirugía con láser o criocirugía empleando sondas con nitrógeno líquido que coagula las células cancerosas *in situ* (Franks, L & Teich, M., 1998).

Dadas las diferencias entre la biología tumoral, se ha podido diferenciar las fases de la enfermedad y con esto, la variedad de los procedimientos quirúrgicos, han aumentado, por lo que antes de optar por este tipo de tratamiento es necesario considerar varios aspectos como localización del tumor, tipo histológico, edad y sexo del paciente, tipo de vida, etc. (Joshina, 2001).

- **Radioterapia**

Tratamiento basado en el hecho de que las células empleadas en la síntesis de DNA o mitosis son particularmente sensibles a los efectos destructivos de la radiación por rayos X. Sin embargo, su efectividad para destruir células cancerosas en proliferación, repercute también en la destrucción de tejidos normales, sin contar con que las radiaciones por sí mismas, son carcinogénicas (Franks, L & Teich, M., 1998; Kleinsmith, L. & Kish, V., 1995). Debido a lo anterior, se ha observado que la radiación es más efectiva utilizándola en dosis fraccionadas a diferencia de la unidosis, produciéndose en el tejido una respuesta con cuatro procesos:

1. **Reparación:** ocurre pocas horas después de la irradiación y sucede tanto en células sanas como en malignas
2. **Repoblación:** es el reemplazo de células supervivientes mediante la multiplicación celular tanto de células sanas como malignas
3. **Redistribución:** ocurre una redistribución de las células en las etapas del ciclo celular; existe una radiosensibilidad de las células a través del ciclo celular, siendo más sensibles durante G1, M y G2.
4. **Reoxigenación:** Las células radioresistentes de un tumor hipóxico se sensibilizan debido a la redistribución del oxígeno.



- **Dieta**

Mucho se ha hablado sobre la relación entre el tipo de alimentación y el riesgo a desarrollar cáncer por un individuo. Divisi y colaboradores, en un estudio realizado acerca de la relación entre la dieta y la aparición de cáncer, afirman que de un 30 a 40 % de los tipos de cáncer, pueden prevenirse con un estilo de vida y dieta saludables, pues se ha encontrado que el sobrepeso es responsable del 14 % de las muertes por cáncer en hombres y 20 % en mujeres, señalando al bajo consumo de fibra, ingesta de carnes rojas, deficiencia de grasas como el Omega 3 y 6 en la dieta, entre otros, como factores que contribuyen al riesgo para el desarrollo de cáncer.

A través de diversos estudios, se han identificado elementos específicos que ejercen un efecto protector contra el riesgo de aparición de cáncer como el selenio, ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub>, vitamina D, clorofila y antioxidantes carotenoides como el  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, licopeno, luteína, etc. Pero además se ha descubierto que estos factores pueden inclusive, inhibir el proceso cancerígeno, entre los que se encuentran los retinoides, vitaminas E, D<sub>3</sub>, C, polifenoles, fibras, calcio, soya, selenio y ácidos grasos poliinsaturados como el Omega-3 (Kushi et al., 1999; Divisi et al., 2006).

Existe un número creciente de evidencia que demuestra que el consumo de cereales y leguminosas, juega un papel importante en la prevención tanto de enfermedades crónicas como de cáncer (Kushi et al., 1999).

A este respecto, la soya ha llamado mucho la atención dado que se ha encontrado una relación entre el consumo de proteínas provenientes de ésta, y la reducción del riesgo a desarrollar algunos tipos de tumores. La soya también, es la única leguminosa fuente de isoflavoides, los cuales poseen acciones estrogénicas, por lo que en los últimos años han llamado la atención debido a su potencial papel en la prevención y tratamiento de osteoporosis y cáncer, específicamente se le ha asociado a cáncer de próstata y colon, entre otros (Messina, 1999; Divisi et al., 2006).

La relación entre la dieta rica en fibra y el cáncer de colon, ha sido tema de muchas investigaciones. El consumo de fibra es uno de los factores dietéticos más estudiados respecto a la etiología del cáncer colorectal, aunque también se ha encontrado una gran relación entre este factor y el cáncer de seno, reportándose un modesto descenso en el riesgo de este tipo de cáncer con el incremento de 20 g de fibra en la dieta. En otros estudios, se reportó inclusive, una asociación inversa entre el consumo de fibra y el riesgo a desarrollar cáncer de seno (Kushi et al., 1999).

Pero el tipo de alimentación no solamente posee impacto en la prevención del cáncer, sino que juega un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad, ya que frecuentemente, en pacientes con cánceres avanzados, se les ha diagnosticado una malnutrición de tipo proteínico-calórica. Generalmente en el momento del diagnóstico ocurren alteraciones del estado nutricional,



con pérdida inclusive de peso antes de la terapia. Debido a esto, la nutrición parenteral se emplea en pacientes con cáncer con una malnutrición profunda o en quienes se prevén toxicidades en vías gastrointestinales que impidan la ingestión de alimentos durante días. El apoyo nutricional entonces, no solamente mejora los índices de nutrición del paciente, sino también su estado funcional global (Mahan, 1998).

Gracias a los resultados de todas las investigaciones desarrolladas en este tema, el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) ha establecido puntos importantes para la prevención de del cáncer:

- Guardar un correcto control de peso
- Variar la dieta
- Incluir frutas y verduras en la dieta diaria
- Consumir alimentos ricos en fibra como cereales, harina de trigo y leguminosas
- Reducir el consumo de grasas
- Limitarse en el consumo de alcohol
- Reducir el consumo de alimentos procesados

### **2.1.3.3. Desarrollo de nuevos tratamientos**

A pesar de que algunos tumores sólidos pueden curarse con quimioterapia complementaria, la mayoría suelen ser resistentes, por lo que es necesario el desarrollo de nuevos fármacos y estrategias que mejoren los resultados de la quimioterapia. El cribado de compuestos naturales y sintéticos es una estrategia para la elaboración de fármacos; estos nuevos compuestos se estudian *in vitro* en relación con la actividad contra estirpes celulares tumorales para humanos y animales (Kalant, H. y Roshlau, W., 2002).

Los tratamientos actuales como la quimioterapia y la radiación, no poseen la capacidad para destruir selectivamente las células cancerosas, sin dañar simultáneamente las células normales; motivo por el cual, los pacientes no pueden someterse a dosis suficientemente altas para destruir todas las células tumorales de su cuerpo. Por tal motivo, en la actualidad, los esfuerzos para desarrollar tratamientos innovadores contra el cáncer se han centrado en lograr la participación más activa del sistema inmunológico contra las células malignas.

Desde hace más de veinte años, se contempló la posibilidad de inducir que el sistema inmunológico de una persona, tuviera la capacidad de reconocer a las células cancerosas como cuerpos extraños, estableciendo un ataque contra éstas, y aunque en la actualidad se ha observado que el sistema inmunológico no es tan eficiente para destruir las células cancerosas, se han planteado

pruebas clínicas de numerosos agentes estimuladores del sistema inmunológico también llamadas “vacunas contra el cáncer” (Molldrem et al., 2005).

#### 2.1.4. Fitoterapia y Cáncer

La Fitoterapia o “Terapia con plantas”, es la ciencia que estudia el empleo de los productos de origen vegetal con una finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar o inclusive curar un estado patológico. La Fitoterapia, utiliza cualquier tipo de producto de origen vegetal independientemente de su potencia farmacológica y toxicidad, en realidad se emplea productos con actividad suave y moderada, con márgenes terapéuticos relativamente amplios para dar lugar a tratamientos menos agresivos y que convierten a la Fitoterapia en una terapéutica suave, por lo que se le considera especialmente útil en el tratamiento de afecciones leves o moderadas, o bien, en afecciones crónicas (Weiss, 1992; Cañigüeral, 2002).

Los medicamentos Fitoterápicos poseen como base, drogas vegetales así como diversos productos que de ellas se obtienen. En 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió **planta medicinal** como “cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica”. Esta misma organización define **droga vegetal** como: “parte de la planta medicinal utilizada en terapéutica”, sin embargo, la Real Farmacopea Española ofrece una definición más precisa: “las plantas, partes de plantas, algas, hongos o líquenes, enteros, fragmentados o cortados, sin procesar, generalmente desecados, aunque también a veces en estado fresco. También se consideran drogas vegetales ciertos exudados que no han sido sometidos a un tratamiento específico”. Por lo tanto, la Fitoterapia utiliza drogas vegetales, extractos de dichas drogas o los principios activos de éstas una vez que han sido aislados, administrándosele al paciente en la forma farmacéutica más adecuada (Cañigüeral, 2002).

Desde tiempos históricos, la terapéutica inició con la utilización de las plantas, pero la integración de la Fitoterapia en la Terapéutica también posee bases químicas dadas las estructuras de los principios activos independientemente que sean de origen natural o sintético; de hecho, gran parte de los fármacos empleados en la actualidad derivan directa o indirectamente de principios activos que inicialmente fueron aislados de plantas (Bruneton, 2001).

El regreso al empleo de la Fitoterapia responde a diversas causas tales como:

- Efectos adversos de los medicamentos sintéticos
- Investigación y mejor conocimiento de las drogas de origen vegetal en aspectos químicos, farmacológicos y clínicos, así como, sus derivados.



- Implementación de métodos analíticos que favorecen el control de calidad
- Debido a que los productos fitoterápicos son generalmente menos peligrosos, se consideran aptos para la automedicación, sin mencionar su fácil acceso para la población

Sin embargo, dadas las características de los fitofármacos (medicamentos de Fitoterapia), no pueden ser empleados en casos de emergencia, sino más bien, se aplican en pacientes con afecciones leves, moderadas o crónicas, por lo que no poseen trascendencia en el ámbito hospitalario. Dado que el empleo de estos productos en afecciones crónicas, han producido un aumento en la esperanza de vida, su empleo ha ido en aumento, por lo que se requieren preparados con margen terapéutico amplio como lo ofrece la Fitoterapia (Reuter, 1991).

Los medicamentos fitoterápicos son aquellos cuyos ingredientes activos están constituidos por productos de origen vegetal, a la cual se le debe de proporcionar una forma farmacéutica adecuada para su administración en el paciente, empleándose principalmente:

- Drogas vegetales en presentación macerada o pulverizada
- Productos obtenidos por extracción
- Principios activos purificados.

Pero es importante recalcar que, las drogas vegetales poseen también otras sustancias carentes de actividad farmacológica (matriz inerte), la cual pudiera causar efectos adversos dada su toxicidad o potencial alergénico.

La Fitoterapia en la actualidad se considera una terapia alternativa que resulta ser un verdadero apoyo en la lucha contra el cáncer actuando de diversas maneras:

1. Evitar o disminuir los dañinos efectos colaterales de las radiaciones y quimioterapia.
2. Fortalecer el sistema inmunológico de los pacientes que ya han sido tratados con agentes antineoplásicos.
3. Contribuir a la reducción tumoral en forma directa.
4. Acortar los tiempos de tratamiento con quimioterapia y/o radiaciones, actuando de manera indirecta
5. Mejorar la calidad de vida, minimizando el sufrimiento de aquellos enfermos que se encuentran en estadio terminal de la enfermedad.

En los últimos años, se ha comenzado a estudiar la capacidad del organismo para reconocer “vida extraña” y defenderse de ella, por tanto, la inmunología ha comenzado a centrar su atención en el problema del cáncer pues se ha descubierto que el organismo de los enfermos de cáncer se encuentra “ciego” a esa vida extraña, no poseyendo las fuerzas suficientes para defenderse contra ella. Esto por tanto, abre las puertas a una nueva posibilidad de tratamiento contra el cáncer: el

fortalecimiento de las defensas, lo que constituye en la actualidad, un programa de investigación mundial cuyos primeros resultados ya se están aplicando en la práctica. El bisturí y los rayos, ya no son las únicas armas contra este mal (Molldrem et al., 2005).

## **2.2. PROTEÍNAS**

### **2.2.1. Clasificación y propiedades**

Las proteínas son polímeros formados por subunidades monoméricas llamadas aminoácidos, poseen la capacidad de plegarse y formar diversas estructuras tridimensionales, confiriéndoles una gran variedad de funciones entre las que destacan:

- Actúan como catalizadores bioquímicos (enzimas)
- Se unen a otras moléculas para su transporte y almacenamiento (hemoglobina, mioglobina, albúmina)
- Proporcionan soporte y forma a las células y por tanto a tejidos y organismos (tubulina, actina, colágena)
- Efectúan trabajo mecánico en conjunto (movimiento flagelar, separación de cromosomas en mitosis, contracción muscular)
- Descodificación de la información celular (traducción, regulación de la expresión genética al unirse a ácidos nucleicos)
- Regulación de actividades bioquímicas en células o tejidos blancos (hormonas, receptores)
- Funciones especializadas de protección en forma de anticuerpos en vertebrados y toxinas en microorganismos (Horton et al., 2008).

Los aminoácidos son moléculas que poseen dos grupos funcionales característicos: un grupo amino  $-NH_2$  y un grupo carboxílico  $-COOH$ , que se encuentran unidos a un mismo átomo de carbono: el átomo de carbono  $\alpha$ . Al carbono  $\alpha$  se unen otros dos sustituyentes: un átomo de hidrógeno y una cadena lateral (R) única para cada aminoácido (Horton et al., 2008). Se han identificado 20 aminoácidos, codificados genéticamente, formando parte de las proteínas y pueden ser clasificados en ácidos, básicos o neutros (alifáticos, aromáticos y azufrados) aunque otra clasificación más significativa es la basada en la polaridad de sus grupos R, en solución acuosa a pH próximo a 7.0 (Teijón et al., 2005). Todos los organismos emplean los mismos 20 aminoácidos como bloques constructivos para la biosíntesis de las proteínas que se lleva a cabo en los ribosomas.

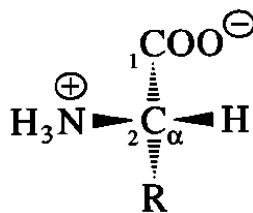


Figura 13. Estructura general de los aminoácidos (Horton et al., 2008)

El pka de un grupo es el valor de pH al cual la concentración del grupo protonado es igual a la del grupo no protonado. Dentro de las células, bajo condiciones fisiológicas normales, el grupo amino está protonado ( $-\text{NH}_3^+$ ) por que el pka de este grupo es cercano a 9, mientras que el grupo carboxilo está ionizado ( $-\text{COO}^-$ ) porque el pka de ese grupo es menor que 3. A pH fisiológico, el grupo  $\alpha$ -carboxilo de un aminoácido se encuentra cargado negativamente y el grupo  $\alpha$ -amino positivamente. El intervalo de pH es de 6.8 a 7.4, por tanto los aminoácidos son zwitteriones o iones dipolares ( $^+\text{H}_3\text{N}-\text{R}-\text{COO}^-$ ), aunque su carga neta pueda ser cero (Roskoski, 1998).

Todos los aminoácidos a excepción de la glicina, poseen átomos de carbono asimétricos y en consecuencia presentan actividad óptica, estereoisomería (enantiómeros L y D). Se dice que un carbono es asimétrico, cuando sus cuatro valencias están saturadas por cuatro radicales distintos. Todos los aminoácidos que se encuentran en las proteínas son enantiómeros L. Los aminoácidos y las proteínas son anfóteros, es decir, poseen un punto isoeléctrico que es el valor del pH para el cual la concentración de la forma aniónica es igual a la de la forma catiónica, es decir, que el aminoácido no posee una carga neta. Las propiedades químicas de los aminoácidos se encuentran asociadas a sus grupos funcionales de manera que existen reacciones específicas del grupo carboxilo, otros del grupo amino y otros del grupo R de cada aminoácido; también hay aminoácidos que tienen reacciones específicas propias (Teijón et al., 2005).

Un enlace peptídico es la combinación de un grupo  $\alpha$ -amino de un aminoácido con el grupo carboxilo de un segundo aminoácido, con eliminación de agua. El resultado es un dipéptido, tripéptido (tres residuos de aminoácidos), oligopéptido (varios residuos de aminoácidos) o polipéptido (muchos residuos de aminoácidos). Las proteínas son polipéptidos, una cadena polipeptídica promedio de una proteína contiene alrededor de 500 residuos de aminoácidos y pocas posee más de 2 000 residuos. Las masas moleculares de las cadenas sencillas de polipéptidos oscilan entre 5 000 y 300 000 Da. Para determinar el número aproximado de aminoácidos en una proteína, se divide el peso molecular entre 110 Da, ya que este valor es el peso molecular promedio de un residuo



de aminoácido en una proteína promedio. Las proteínas posee una o más cadenas polipeptídicas (Roskoski, 1998).

La estructura de las proteínas se considera en cuatro niveles jerárquicos:

- **Estructura primaria:** es una secuencia lineal de residuos de aminoácidos en una proteína.

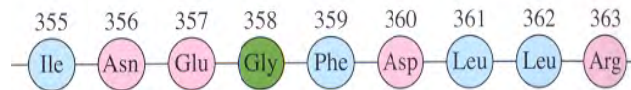


Figura 14. Estructura primaria de proteínas (Horton et al., 2008)

La estructura tridimensional de una proteína se describe con tres niveles adicionales, las fuerzas que las mantienen o estabilizan son principalmente de tipo no covalente.

- **Estructura secundaria:** se refiere a las regularidades de las conformaciones locales mantenidas por puentes de hidrógeno entre los hidrógenos de amida y los oxígenos de carbonilo en la estructura principal del péptido. Pueden encontrarse de tipo hélices  $\alpha$  y las hebras  $\beta$ .

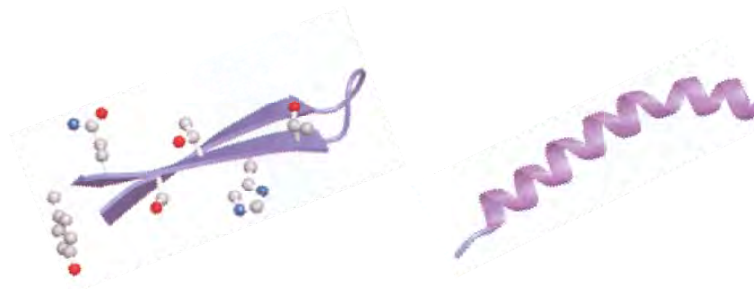


Figura 15. Estructuras secundarias de proteínas: beta-lámina y alfa-hélice (Horton et al., 2008)

- **Estructura Terciaria:** describe la cadena polipeptídica totalmente plegada y compacta. Muchos polipéptidos plegados consisten en varias subunidades distintas, unidas por un tramo corto de residuos de aminoácidos. Estas estructuras se estabilizan por las interacciones de cadena laterales de aminoácidos en regiones no vecinas de la cadena polipeptídica, acercando partes lejanas de la estructura primaria y secundaria.

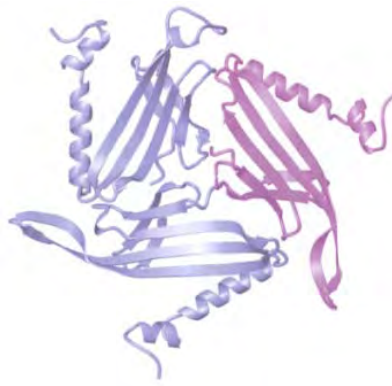


Figura 16. Estructura terciaria de proteínas (Horton et al., 2008)

- **Estructura cuaternaria:** implica la asociación de dos o más cadenas polipeptídicas en una multisubunidad o proteína oligomérica, cuyas cadenas polipeptídicas pueden ser idénticas o no.

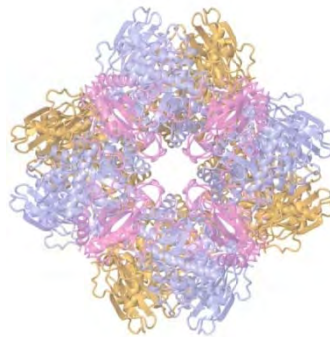


Figura 17. Estructura cuaternaria de proteínas (Horton et al., 2008)

Las proteínas son componentes esenciales de todas las células vivas, cuya misión puede ser de tipo estructural o funcional, lo que da origen a una clasificación:

- **Por su composición**
  - a) **Simples u Holoproteínas:** sólo se encuentran compuestas de  $\alpha$ -aminoácidos o derivados, distinguiéndose entre sí, en función de sus propiedades físicas y químicas (albúmina, globulinas, glutelinas, prolamina, protemina, histonas, escleroproteínas).
  - b) **Conjugadas o Heteroproteínas:** compuestas no solamente de aminoácidos sino también de otros componente orgánicos e inorgánicos, denominándose grupo prostético a la porción no aminoacídica, cuya naturaleza produce una subclasificación (nucleoproteínas, lipoproteínas,

glucoproteínas, fosfoproteínas, cromoproteínas, metaloproteínas, hemoproteínas, flavoproteínas.

- **Por sus propiedades físicas y solubilidad**

Albumina	Soluble en agua y soluciones salinas, precipitan en sulfato amónica a saturación, coagulan con calor
Globulinas	Solubles en ácidos y bases fuertes, insolubles en agua, precipitan en sulfato amónico por emisaturación
Glutelinas	Solubles en soluciones de ácidos y bases diluidas, insolubles en disolventes neutros, coagulan con calor, presentes en trigo.
Prolaminas	Solubles en alcohol el 70 a 80%, insolubles en agua, disolventes neutros y alcohol absoluto, no coagulan con calor, ricas en prolina
Protaminas	Solubles en agua y amoniaco diluido, no coagulan con calor, son polipéptidos básicos
Histonas	Solubles en agua y ácidos diluidos, insolubles en amoniaco diluido, no coagulan con calor, son muy básicas
Escleroproteínas	Insolubles en agua, soluciones salinas, ácidos y bases diluidos y alcohol, forman parte de tejidos de sostén y revestimiento con estructura fibrosa.

- **Por su conformación**

- a) **Fibrosas:** poseen cadenas polipeptídicas en forma paralela con formación de láminas largas, resistentes. Son elementos básicos estructurales del tejido conjuntivo de animales superiores (colágeno, elastina, queratinas).
- b) **Globulares:** constituidas por cadenas polipeptídicas plegadas adoptando formas esféricas o globulares compactas. Su función en las células es de tipo dinámico (enzimas, anticuerpos, proteínas de transporte).

- **Por sus grupos prostéticos**

Proteínas conjugadas que se clasifican atendiendo a la naturaleza de su grupo proteínico, son heteroproteínas.

- **Por su función biológica**

Catalizadores biológicos (enzimas), proteínas de reserva, transportadoras, protectoras, contráctiles, moduladoras de funciones (hormonas) y estructurales (Teijón et al., 2005).



### 2.2.2. Aislamiento y purificación de proteínas

Dado que en las células se encuentran presentes una gran cantidad de proteínas, es necesario que para el estudio y caracterización de alguna proteína específica, previamente es necesario aislarla y purificarla. El objetivo de un protocolo de purificación, es el aislamiento de una determinada proteína con el mejor rendimiento posible.

Para la extracción de proteínas, es necesario considerar la fuente de la misma, de ser posible, seleccionar un material que posea una gran cantidad de la proteína. La proteína puede localizarse en orgánulos subcelulares, por lo que es indispensable un fraccionamiento subcelular antes de la purificación. Estas fracciones subcelulares se obtienen generalmente mediante varios pasos de centrifugación y sedimentación (Teijón et al., 2005).

Los métodos de homogenización permiten romper las células y extraer su contenido, la elección depende del tipo de tejido y organismo que se emplee como fuente de la proteína. Los métodos de separación se basan en propiedades específicas de la proteína en estudio. Estos métodos aprovechan las propiedades como: las cargas, tamaño, solubilidad o incluso que posean sitios específicos de unión para algún compuesto (Teijón et al., 2005).

Existen diversos métodos de acuerdo a las propiedades de las proteínas en estudio o de los intereses que éste persiga:

- **Métodos que dependen del tamaño o la masa:**
  - Ultracentrifugación
  - Electroforesis SDS-PAGE
- **Método de velocidad de sedimentación:** permite determinar la masa molecular de las proteínas.
- **Métodos que dependen de la carga:**
  - Cromatografía de intercambio iónico
  - Electroforesis
- **Métodos que dependen de la presencia de sitios de unión específicos:**
  - Cromatografía de afinidad
  - Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).



### 2.2.3. Solubilidad y precipitación de proteínas

La solubilidad de una proteína se encuentra en función de la composición iónica del medio, de la fuerza iónica, pH, de las proporciones y distribuciones de los grupos hidrofílicos polares y de los hidrofóbicos no polares en la molécula, así como del momento dipolar de la proteína y la temperatura. Los grupos polares iónicos de las moléculas de proteínas entran en interacción electrostática dentro de la misma molécula y con moléculas circundantes tendiendo a formar agregados, disminuyendo la solubilidad. Esta interacción entre grupos cargados de las proteínas disminuye en agua pura con una constante dieléctrica alta, es decir, el grado de interacción es inversamente proporcional a la constante dieléctrica del disolvente. Las moléculas polares del agua entran en interacción con los grupos polares de las proteínas y tienden a aumentar su solubilidad (Teijón et al., 2005).

Si se le agrega a una solución de proteínas en agua pura, pequeñas cantidades de sal, disminuye el coeficiente de actividad de la proteína y su solubilidad aumenta. A este fenómeno de disolución salina también se le conoce como "salting in", producido por las fuerzas de atracción entre los iones de la proteína y los iones de la sal. En concentraciones bajas de sal el aumento del logaritmo de la solubilidad de la proteína es proporcional a la fuerza iónica del disolvente. El "salting in" se explica porque al añadir una pequeña cantidad de iones extraños, aumenta el desorden molecular, la entropía se hace mayor y no habiendo variación de la entalpía, el cambio de energía libre es negativo y esto supone una tendencia espontánea al aumento de solubilidad (Teijón et al., 2005).

Por otro lado, a concentraciones elevadas de sales muy solubles como el sulfato amónico, se observa el fenómeno de precipitación salina o "salting out" de las proteínas, provocada por la disminución de la actividad del agua, lo que a su vez también disminuye las interacciones solubilizantes entre el agua y los grupos de las proteínas. Al aumentar la cantidad de iones extraños, la interacción proteína-proteína se hace mayor que la interacción proteína-agua, baja la movilidad de las cargas proteínicas y por tanto, las proteínas precipitan (Teijón et al., 2005).

La fuerza iónica baja hace que una proteína se solubilice, pero cuando esta fuerza se eleva, entonces disminuye la solubilidad y la proteína precipita. El pH también influye en la solubilidad de la proteína. Las proteínas también pueden precipitarse de sus soluciones por diversos iones positivos o negativos. Los iones positivos de uso más común para precipitar proteínas son los de metales pesados como  $Zn^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $Hg^{++}$  y  $Fe^{++}$ , etc. Estos iones precipitan proteínas de soluciones a pH superior al isoelectrico de cada proteína, dado que a este pH la proteína está disociada como proteína negativa que se combina con el ión metálico positivo puede dar un precipitado insoluble de proteinato del metal (Teijón et al., 2005).



#### 2.2.4. Lectinas

En 1888, Stillmark descubrió el efecto hemaglutinante que producían extractos de semillas de castor (*Ricinus communis*), denominando a la proteína responsable como Ricina (RCA) y posteriormente Hellin, descubrió la abrina (APA) en semillas de *Abrus precatorius*, por las mismas características hemaglutinantes (Ohba et al., 2004). Pero fue hasta 1963 que Abu y colaboradores hicieron un importante descubrimiento: las lectinas de plantas pueden distinguir entre células normales y células malignas debido a las diferencias entre sus superficies (Aub et al., 1963).

Las lectinas [de *lego*, *legere* (*lectum*)= leer, escoger, seleccionar (Bruneton, 2001)] son glicoproteínas de origen no inmunológico (no inducido), las glicoproteínas son proteínas que poseen la propiedad de enlazarse específica y reversiblemente a carbohidratos, en forma libre o formando parte de estructuras más complejas, sin mostrar actividad enzimática. Poseen al menos dos sitios de unión, pudiendo enlazarse a un azúcar específico y a una molécula glicosilada (Goldstein et al., 1980).



Figura 18. Estructura de lectina VFA (Reeke, G. & Becker, J., 2005)

Muchas lectinas son capaces de aglutinar eritrocitos, de ahí que se les conozcan también como hemaglutininas o fitohemaglutininas (por ser de origen vegetal) y varias de ellas lo hacen con especificidad de grupo (Bruneton, 2001), sin embargo también tienden a aglutinar a otro tipo de células a las cuales se unen como linfocitos, espermatozoides, plaquetas, bacterias y virus (Goldstein et al., 1980).

Se les han encontrado en microorganismos, hongos, animales y plantas. En estas últimas, la mayoría de las lectinas se encuentran en los cotiledones y endospermos de las semillas, constituyendo cerca del 2 a 10% del total de sus proteínas (Hernández, 1999) y se forman durante la maduración (Bruneton, 2001). Se ha sugerido que algunas de las funciones que desempeñan dentro de las plantas son:

- Regulación fisiológica
- Defensa mecánica contra microorganismos
- Almacenamiento de proteínas
- Transporte de carbohidratos
- Estimulación mitogénica
- Reconocimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium*, etc. (Castillo-Villanueva, A. y Fikrat, A; 2005).

En la actualidad, las lectinas han adquirido gran importancia en el campo de la Genética, Bioquímica, Biología celular, Biomedicina e Inmunología, dada su capacidad de combinación con diversos glicoconjugados presentes en las superficies celulares, además de que sus propiedades mitogénicas permiten su empleo en estudios con base a la proliferación de linfocitos en cultivos, tales como:

- Evaluación de la producción de citoquinas (interferón e interleucinas), así como la expresión de sus receptores en sobrenadantes de sueros de pacientes con enfermedades con alto impacto social (Erickson et al., 1995; Itichi et al., 1996).
- Caracterización de aspectos relacionados con la respuesta inmunitaria e inmunosupresión
- Interacción entre virus, susceptibilidad y resistencia a estos (Baveja et al., 1995; Segerson, 1995).
- Evaluación de la efectividad de terapias antirretrovirales de acuerdo con la respuesta de los linfocitos a la estimulación con lectinas antes y después del tratamiento (Casseb et al., 1995).
- Análisis de funciones linfoproliferativas y citotóxicas en células mononucleares causadas por drogas.
- Análisis de la influencia nutricional en la proliferación de linfocitos y su cinética de proliferación (Lahfa et al., 1995).
- Inducción de genes en linfocitos (Schwarz et al., 1995).
- Detección de anomalías cromosómicas (Tomassetti et al., 1995).

Pero el estudio de las lectinas también ha jugado un rol importante en la terapia contra el cáncer (quimioterapia), ya que diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, con diferentes lectinas de plantas, han demostrado su actividad antitumoral por medio de la inhibición del crecimiento tumoral además de un efecto anticarcinogénico, por inhibición de la inducción de cáncer por agentes carcinógenos. Existen trabajos en los que se experimentan con diferentes lectinas provenientes de plantas en

diferentes tipos de cáncer (Tablas 3 y 4), tratando de dilucidar los mecanismos de acción de éstas, descubriéndose que varían según diversos factores (Castillo-Villanueva, A. y Fikrat, A., 2005).

Sin embargo, a pesar de que se han descrito a las lectinas en su actividad antitumoral, es importante mencionar que existen vegetales que deben su toxicidad a la presencia de estas. Aunque las lectinas son tóxicas únicamente por vía parenteral, algunas son poco atacadas o no por enzimas del tracto digestivo (Bruneton, 2001). Al ingerirse leguminosas mal cocinadas, con fitohemaglutininas, éstas se unen a las membranas de las células del tubo digestivo produciendo náuseas, vómitos y en ocasiones, molestias abdominales e incluso puede progresar hasta shock; la intoxicación por absorción se manifiesta de 2 a 3 h después de la ingestión.

Las fitohemaglutininas son especialmente abundantes en las judías rojas (*Phaseolus vulgaris*), hasta el extremo de que bastan media docena de judías mal cocinadas para producir efectos nocivos, ya que las lectinas se desnaturalizan por cocción (Bruneton, 2001). Las alubias blancas contienen solamente alrededor de un tercio de la cantidad de toxina que poseen las rojas, mientras que las habas menos del 10%.

Tabla 3. Mecanismos de acción de lectinas de plantas en células malignas *in vitro* (Castillo-Villanueva, A. y Fikrat, A; 2005)

LECTINA	MECANISMO DE ACCIÓN	TIPO
PHA ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Inhibición del crecimiento de tumores	Linfoma ascítico de ratón
SBA ( <i>Glycine max</i> )	Fortalecimiento del sistema inmunitaria del huésped	Linfoma ascítico de ratón
TMA I y II ( <i>Triholoma mongolicum</i> )	Inhibición del tumor y prolongación de la vida de los animales	Ratón con células de sarcoma 180
GS-1 ( <i>Griffonia simplicifolia</i> )	Inhibición del crecimiento de tumor	Ratón con células ascíticas Ehrlich
VCA ( <i>Viscum álbum, L coloratum</i> )	Inhibición del crecimiento de tumores y metástasis por el incremento de la apoptosis y la inhibición de la angiogénesis	Ratón inoculado con células de melanoma B16-BL6
KML-C (Korean mistletoe; <i>Viscum album coloratum</i> )	Actividad inmunomoduladora para fortalecer el sistema de defensa del huésped, efecto en metástasis asociado a muerte natural y macrófagos	Melanoma de ratón, carcinoma de colon y linfoma
ML-I ( <i>Viscum album</i> )	Efecto antitumoral con reducción del crecimiento del linfoma trasplantado	Ratón con tumores de linfoma no-Hodgkin





Tabla 4. Mecanismos de acción de lectinas de plantas  
en células malignas *in vivo* (Castillo-Villanueva, A. y Fikrat, A; 2005)

LECTINA	MECANISMO DE ACCIÓN	LÍNEA CELULAR	TIPO
PHA-L ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones	LoVo, HCT-15, SW837	Cáncer colorectal humano
Con A (Concavalina A)	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones	LoVo, HCT-15, SW837	Cáncer colorectal humano
GSA ( <i>Griffonia simplicifolia</i> I-A)	Estimula el crecimiento celular a altas y bajas concentraciones. Inhibe el crecimiento celular a altas concentraciones	SW837, LoVo	Cáncer colorectal humano
WGA ( <i>Triticum vulgare</i> )	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones	LoVo, HCT-15, SW837	Cáncer colorectal humano
DSA ( <i>Datura stramonium</i> )	Inducción de diferenciación irreversible e inhibición de proliferación	C6 glioma, U251, SNB-75, SNB-78	Glioma de rata, tumor de cerebro humano
VCA ( <i>Viscum álbum, L coloratum</i> )	Inhibición del crecimiento dosis-dependiente	Molt-4	T linfoblástico humano agudo
	Inhibición de proliferación dosis dependiente, con inducción de apoptosis	B16-BL6	Melanoma metastático
	Inducción de la apoptosis a través de la caspasa-3	HL-60	Leucemia promieloide aguda
	Inhibición de la telomerasa	SK-Hep-1, Hep3B	Hepatocarcinoma humano
	Inducción de apoptosis por la defosforilación de Akt	A253	Cáncer humano
ML-I ( <i>Viscum álbum</i> )	Inducción de apoptosis: inactivación intracelular de caspasas	Jurkat T-cell, BJAB B-cell	Leucemia humana
ABL ( <i>Agaricus bisporus</i> I)	Inhibición de proliferación sin citotoxicidad, se internaliza y selectivamente bloquea la importación de proteínas nucleares dependientes de NLS a través de Orp-150 truncada	HT29	Adenocarcinoma de colon humano
VFA ( <i>Vicia faba</i> )	Inhibición de la proliferación no asociado a citotoxicidad, posible interacción con la molécula de adhesión epCAM	LS174T, SW 1222 y HT29	Cáncer de colon humano
AAL ( <i>Agrocybe aegerita</i> )	Inducción de apoptosis con actividad de ADNasa	HeLa, SW480, SCG-823, HL-60, S-180	Cánceres humanos Sarcoma de ratón



## 2.3. *Vicia faba* (HABA)

### 2.3.1. Características y generalidades

Las leguminosas, poseen un importante lugar en la dieta de muchas regiones alrededor del mundo entre ellos, México (Messina, 1999). Comúnmente conocida como haba, haba de mayo, haboncillo, faba o baba, su nombre científico es *Vicia faba* y pertenece a la familia de las leguminosas. Esta planta es nativa de la región del mediterráneo y es una de las plantas de cultivo conocidas más antiguas, cuya producción se extiende a épocas prehistóricas.

Se trata de una planta fácil de cultivar y muy prolífera en zonas templadas, empleada para consumo humano tanto en fresco como en seco. Es una planta robusta que desarrolla follaje abundante, es una dicotiledónea anual, puede alcanzar hasta 1.5 m de alto (según la variedad), posee un tallo grueso, de color verde grisáceo que pertenece a la familia de las fabáceas (papilionáceas). Posee hojas compuestas de uno a tres pares de hojas grandes, elípticas que terminan siempre en hoja par, con un pequeño apéndice agudo. Produce flores grandes, blancas con una coloración negra a cada lado, agrupadas en corto número sobre un pequeño rabillo (Infoagro, 2008).

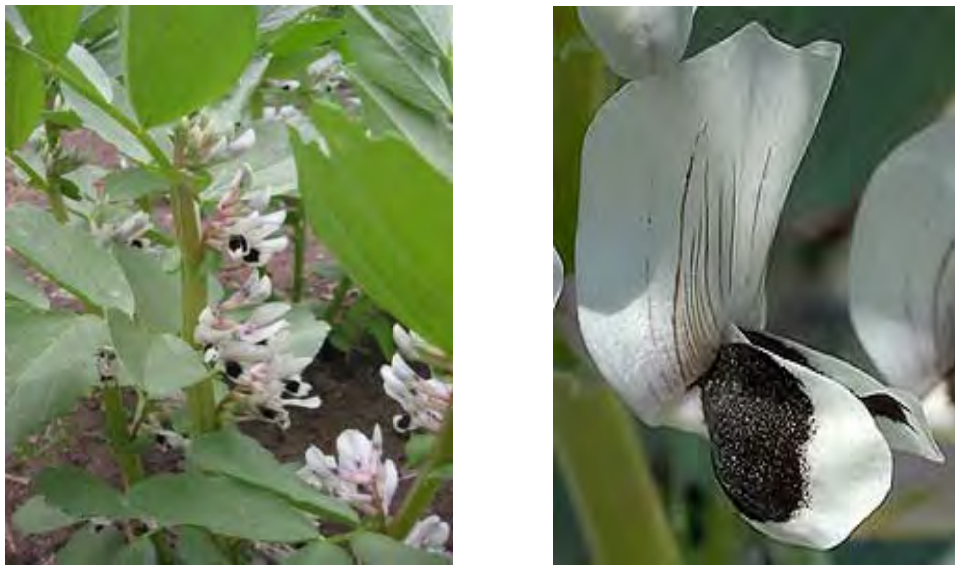


Figura 19. Planta de *Vicia faba* (Haba) (Infoagro, 2008)

Su fruto es tipo legumbre, en vainas de longitud variable (hasta más de 35 cm), con un número de granos que varía de 2 a 9, cuyo crecimiento se produce de forma simultánea a la elongación de la vaina, la cual, antes de la maduración, es perfectamente comestible. Los granos inmaduros van

incrementando su tamaño hasta alcanzar su madurez óptima para su consumo en verde con una humedad de 72 a 74 % en promedio. Una vez alcanzada su madurez, el color de los granos o semillas es verde amarillento, y entonces comienza un rápido descenso en el contenido de humedad, tomando un color cada vez más opaco, menos verdoso (amarillento), se endurecen y ganan almidón, motivo por el cual deben recolectarse antes de su maduración (Lagordo, 2003).

Existen ejemplares cultivados para forraje y pertenecen a las variedades botánicas *minor* y *equina*, semillas que son de menor tamaño que las empleadas para consumo humano (*var. major*).

La limpieza de las semillas implica un proceso largo y ofrecen un bajo rendimiento en peso al “pelar” la vaina. Son recolectadas y seleccionadas a mano, eligiendo las mejores vainas que son de tamaño mediano, gruesas, crocantes, poseen un color verde intenso y brillante; las semillas dentro de éstas deben presentar un desarrollo uniforme. El grado de madurez se evidencia por el grado de humedad. Se comercializan sin proceso industrial alguno presentándose en forma fresca o seca, esta última implica el secado de las vainas en la propia mata (Infoagro, 2008).

### **2.3.2. Contenido nutricional y propiedades medicinales**

Diversos estudios han considerado al haba como una leguminosa de alto valor nutritivo, pudiéndose caracterizar un alto contenido en proteínas, vitaminas del grupo B, minerales, fibra y muchos otros compuestos definidos como no-nutrientes (Chau et al., 1997; Iqbal et al., 2006; Prakash et al., 2001). Se ha informado sobre una alta variación en su contenido proteínico, que puede variar en un 20 a 41 %, influenciado por factores tanto genéticos como ambientales; por ejemplo, se ha detectado un mayor contenido proteínico durante el invierno que en la primavera ([www.hort.purdue.edu](http://www.hort.purdue.edu)). Por tal motivo, es empleada principalmente para consumo humano, aunque minoritariamente también como alimento de ganado y aves de corral, que en comparación con el guisante forrajero, puede resultar menos productivo, pero presenta mayor valor nutricional por su contenido de carbohidratos y proteínas, sin contar los factores que facilitan su recolección.



Tabla 5. Composición química de *Vicia faba* (haba) en 126 g

(www.nutritiondata.com)

INFORMACIÓN CALÓRICA		PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS	
Calorías	465 KJ	Proteínas	10 g
Carbohidratos	330 KJ		
Grasa	32.2 KJ	<b>CARBOHIDRATOS</b>	
Proteína	102 KJ	Carbohidratos totales	22.2 g
		Fibra	3 %
<b>VITAMINAS</b>			
Vitamina A	420 UI	<b>GRASAS Y ÁCIDOS GRASOS</b>	
Vitamina C	4.7 mg	Grasas totales	0.9 g
Vitamina B1	0.4 mg	Grasas saturadas	0.1 g
Vitamina B2	0.3 mg	Grasas Monoinsaturadas	0.1 g
Tiamina	0.2 mg	Grasas poliinsaturadas	0.4 g
Riboflavina	0.4 mg	Total de ácidos grasos omega-3	37.8 mg
Niacina	2.8 mg	Total de ácidos grasos omega-6	393 mg
Folato	186 mcg		
Ácido pantoténico	0.3 mg	<b>MINERALES</b>	
		Calcio	46.6 mg
		Hierro	2.0 mg
<b>ESTEROLES</b>		Magnesio	41.6 mg
Fitoesteroles	27.7 mg	Fósforo	163 mg
		Potasio	418 mg
		Sodio	31.5 mg
<b>OTROS</b>		Zinc	1.3 mg
Agua	97.5 g	Cobre	0.5 mg
Cenizas	1.4 g	Manganeso	0.8 mg
		Selenio	1.0 mcg

La forma más común de preparación de habas es cocinándolas en agua, con o sin cáscara y hierbas aromáticas. Las habas frescas o secas, son un buen ingrediente para sopas, puré, ensaladas y platillos en general, conservando su valor nutricional según estudios realizados, en los que se han demostrado que su contenido en aminoácidos no es alterado por tratamientos, como la cocción (Lisiewska et al., 2007).

Desde la antigüedad, el cultivo del haba ha tenido un interés únicamente de tipo alimenticio, dado que en la medicina tradicional no se le reconocen propiedades medicinales algunas. Sin embargo, desde hace algún tiempo, los estudios han demostrado que algunos mitógenos como las lectinas, derivados de leguminosas como el haba, pueden actuar sobre el sistema inmunológico modulando su respuesta (Wimer, 1998), y el descubrimiento de sus actividades antitumorales



(Castillo-Villanueva, A. y Fikrat, A., 2005), han llamado la atención al estudio de leguminosas como el haba, cuyos estudios ya han comenzado a dar frutos, con importantes descubrimientos como:

- Recientes estudios han demostrado un efecto anticonvulsivante del extracto de *Vicia faba* (Mustafa, A. & Ali, A., 2008)
- Es rica en tiramina, lo que podría evitar la captura de los inhibidores de la monoaminooxidasa (MAOI) ([www.answers.com](http://www.answers.com)).
- Las habas crudas, contienen vicina y convicina, los cuales pueden inducir una anemia hemolítica en pacientes con una condición hereditaria que consiste en la deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDD) (Gerald et al., 1999).
- El consumo de habas puede tener un efecto mortal en personas con “favismo”, que es un desorden de tipo hereditario y se presenta principalmente en poblaciones originarias del sur de Europa, África y Asia. Es producido por una deficiencia de la enzima G6PDD, que impide la digestión de sus proteínas (lectinas) como anteriormente se ha mencionado, especialmente en casos cuando las habas se encuentran crudas o parcialmente cocinadas. Los síntomas presentados por los pacientes, son similares a los de hepatitis tóxica aguda e influenza, afectando principalmente a varones y niños ([www.sica.gov.ec](http://www.sica.gov.ec)).
- También poseen altos contenidos de L-dopa, utilizada en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Vered et al., 1997).
- Se ha descubierto que la L-dopa también es un agente natriurético, por lo que el haba podría ayudar en el control de la hipertensión (Vered et al., 1997).
- Puede ser empleada como una alternativa natural del Viagra, ya que se ha citado una relación entre la producción de la L-dopa y el libido en el humano (Emmerson, 2006).
- *Vicia faba* también posee un valor como herramienta en Genotoxicología ya que desde 1920, es utilizada para la evaluación de aberraciones cromosómicas, empleándose también en ensayos como Micronúcleos e Intercambio de Cromátidas Hermanas para la detección de diversos agentes genotóxicos (Kanaya et al., 1994; Cotelle et al., 1999).
- Un descubrimiento relevante, es la capacidad de la lectina de *Vicia faba*, denominada VFA, para estimular la diferenciación de una línea celular no diferenciada de cáncer de colon, en el interior de las estructuras glandulares; incrementa la diferenciación morfológica disminuyendo el fenotipo maligno de las células de cáncer colorectal, además de inhibir la proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer de colon por interacción con la molécula de adhesión epCAM de células epiteliales, confiriéndole una acción protectora contra este tipo de cáncer (Jordinson et al., 1999).



## 2.4. GENOTOXICOLOGÍA

### 2.4.1. Antecedentes

La Genotoxicología o Genética Toxicológica, es una rama de la Toxicología cuyo objetivo es identificar agentes genotóxicos, es decir, aquellos con toxicidad dirigida hacia el material genético de un organismo vivo; además de analizar y detectar las propiedades de dicha sustancia que le confieren la capacidad de interactuar con el material genético (Brusick, 1980; Kilbey, 1978).

En 1927, H. J. Muller, descubrió que los rayos X podían causar mutaciones en *Drosophila* produciendo rearrreglos en el orden de los genes, lo que propició el descubrimiento de agentes mutagénicos, su estudio, desarrollo de nuevos métodos de identificación, así como, formulación de nuevas teorías y postulados en el campo de la Genotoxicología.

Standler, en 1928 demostró que las mutaciones podían ser inducidas utilizando los Rayos X y Radio. En 1938 Sax, estudió los efectos de los Rayos X en *Drosophila* y *Tradescantia*, demostrando la relación entre el incremento de las aberraciones con la dosis de radiación; y en 1940, a pesar del total desconocimiento de la arquitectura molecular de los cromosomas eucarióticos, sugirió que la ruptura de los mismos, era un fenómeno indispensable para la formación de las aberraciones cromosómicas. Lea y Catchside mostraron que la energía de radiación determina el tipo y frecuencia de las aberraciones cromosómicas después de observar que la radiación de baja energía, causaba un débil efecto en los cromosomas de *Tradescantia* (García-Sagredo, 2008).

El año de 1941, marcó una nueva etapa de la Genotoxicología; Auerbach y Robson, descubrieron el efecto mutagénico del gas mostaza, durante la 2ª Guerra Mundial, el cual producía el mismo tipo de lesiones a las provocadas por las radiaciones ionizantes. Este tipo de descubrimientos realizados en la década de los años 40, llevaron a la conclusión de que los daños producidos en los cromosomas son causados por agentes presentes en el medio ambiente, evidenciándose como anomalías estructurales. En el caso de la irradiación, Sparrow observó una relación lineal entre dosis, las aberraciones cromosómicas y las mutaciones genéticas, lo que evidenció una clara relación entre las mutaciones y las aberraciones cromosómicas. (García-Sagredo, 2008).

El parteaguas para la Genética Humana, fue primeramente el descubrimiento del número cromosómico humano realizado por Tjio y Levan (Hulten, 2002). Así mismo Moorhead y colaboradores, en 1960 realizaron una gran aportación con la descripción de un sencillo método para la obtención y estudio de los cromosomas humanos, lo que significó una invaluable ayuda en el análisis de mutaciones, pudiéndose entonces, describir la causa de Síndromes como Down, Klinefelter y Turner, así como, el descubrimiento del cromosoma filadelfia causante de la Leucemia Mieloide Crónica (García-Sagredo, 2008).

Durante la década de los años 60, Tough y colaboradores, así como otros autores, describieron las aberraciones cromosómicas producidas por las radiaciones ionizantes, paralelamente Hamper y Ellison describieron las aberraciones cromosómicas causadas por virus. Además, comenzaron a analizarse los efectos mutagénicos de algunos antineoplásicos tales como metotrexate y 6-mercaptopurina, y algunos antibióticos con acción sobre el DNA, presentando resultados positivos.

Para la década de los años 70, dos factores impulsaron el rápido desarrollo de la Genotoxicología: disponer de bacterias genéticamente definidas con mutaciones en genes particulares, así como, el empleo de sistemas de activación metabólica *in vitro*, que permitió la obtención de metabolitos electrofílicos reactivos con el DNA. Ames, publicó los primeros estudios que demostraban que un elevado porcentaje (60 a 90 %) de sustancias identificadas como carcinogénicas en estudios con animales, se comportaban también como agentes mutágenos en los sistemas bacterianos (Bello, J. & López de Cerain, A., 2001).

Otro importante descubrimiento, fueron los agentes capaces de alterar el proceso natural de división y segregación cromosómica durante la meiosis, produciendo la no disyunción y por tanto un desbalance que originan trisomías o monosomías. Wassom en 1989, analizó los estudios realizados en agentes químicos capaces de producir mutaciones principalmente sobre las células germinales con el consecuente riesgo que esto implicaba (Wassom, 1989).

Debido a los numerosos grupos de investigación y a los descubrimientos en materia de Genotoxicología y Citogenética, en 1964 surgió el *Journal Mutation Research*, el cual reunió importantes publicaciones. La *Environmental Mutagen Society* creada en Estados Unidos, nació en 1969 y un año después, en el mes de mayo, ésta reconoció formalmente a la Genética Toxicológica como una disciplina; en este mismo año, surgió también la *European Environmental Mutagen Society* (Wassom, 1989).

#### **2.4.2. Importancia y aplicaciones**

Existe una gran relación entre la Citogenética humana y la Genotoxicología. Cada uno de sus avances y descubrimientos convergen en su aplicación en la Genética Clínica y los procesos de Mutagénesis, desde el empleo de biomarcadores citogenéticos, los cuales fueron introducidos y aceptados (García-Sagredo, 2008).

Hacia finales de la década de los años 60, la lista de químicos mutágenos, incluía ya más de 200 sustancias capaces de producir aberraciones cromosómicas en humanos, al mismo tiempo que surgía el término de clastógeno. El análisis citogenético de las aberraciones cromosómicas en cultivos de células somáticas, es considerado uno de los métodos primarios para la evaluación de la inducción



de Mutagénesis en mamíferos. El cultivo de linfocitos humanos es utilizado como un indicador de daño genético cuando se produce una exposición a determinado agente *in vivo* o *in vitro* (Meisner et al., 1987).

Las pruebas utilizadas en Genética Toxicológica son empleadas también para el Diagnóstico de Síndromes de Inestabilidad cromosómica tales como Anemia de Fanconi, Xeroderma Pigmentoso, Ataxia Telangiectasia o la determinación de los Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH) para el diagnóstico del Síndrome de Bloom, en los que las aberraciones cromosómicas ó el incremento de los ICH son observados. En realidad, la Citogenética es una colección de pruebas de gran utilidad a nivel de Clínica Diagnóstica, ya que son las primeras pruebas que pueden realizarse en recién nacidos con malformaciones o niños con retraso mental (Garcia-Sagredo, 2008).

Por tanto, la Genotoxicología posee gran importancia y puede emplearse en:

- Capacidad de predicción de Cáncer mediante la relación entre la Genotoxicidad e iniciación de una neoplasia (Garcia-Sagredo, 2008).
- Identificación de nuevos agentes genotóxicos que pudiesen entrar en contacto con la población en general y su probable mecanismo de acción.
- Evaluación de nuevos agentes terapéuticos, sobre el daño genotóxico que pudieran producir sobre el organismo.
- Monitoreo de personal de alto riesgo de tipo ocupacional (Chandrasekhar et al., 2006).
- Empleo en la Agricultura, Industria e inclusive el área Cosmética (Montero et al., 2006; Kirkland et al., 2005).
- Evaluación de la acción de agentes antígenotóxicos como los antitumorales, antioxidantes, etc.

Pero además de todo esto, no solamente tiene la misión de identificar los agentes genotóxicos, sino que además, instituir nuevos métodos para la evaluación del peligro e impacto que estos pudiesen tener sobre el material genético (Sasaki, 1982), fenómeno observado cada vez con mayor frecuencia.



## 2.5. ENSAYO DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS

### 2.5.1. El Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

En 1953, J. Watson y F. Crick en la revista *Nature*, escribieron: “Queremos sugerir una estructura para la sal del ácido desoxirribonucleico (D.N.A.). Esta estructura presenta rasgos novedosos que son de un interés biológico considerable” (Griffiths et al., 2000).

El Ácido desoxirribonucleico (DNA), es considerado como el material fundamental del que se encuentran compuestos los genes, siendo el principal portador de la información genética. Se trata de una macromolécula que normalmente se encuentra conformada por cadenas polinucleotídicas antiparalelas unidas por puentes de hidrógeno, en la que el residuo azúcar es la desoxirribosa (Griffiths et al., 2000; Klug et al., 2006).

El DNA posee cuatro características fundamentales: capacidad de replicación, almacenaje de la información, expresión de dicha información y variación por mutación, las cuales le confieren la calidad de material genético (Klug et al., 2006). Este ácido nucleico, se encuentra conformado por nucleótidos que son las unidades de repetición básica de una cadena de DNA (Strachan, T. y Read, A., 2004). Los nucleótidos están formados por tres componentes: una base nitrogenada, un azúcar pentósido (de cinco carbonos) y un grupo fosfato.

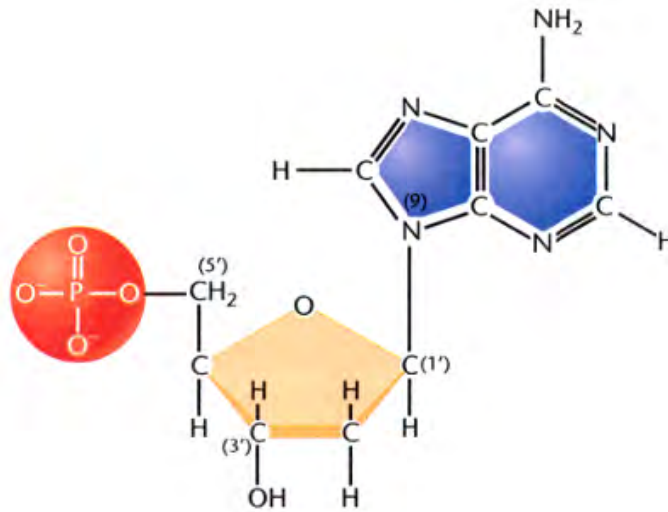


Figura 20. Estructura de nucleótidos. En color azul se presenta la base nitrogenada (adenina), en amarillo el azúcar (desoxirribosa) y el grupo fosfato en rojo (Klug et al., 2006)

Existen dos tipos de bases nitrogenadas (Strachan, T. y Read, A., 2004):

- **Purinas:** incluyen la Adenina y Guanina, que poseen dos anillos heterocíclicos engranados.

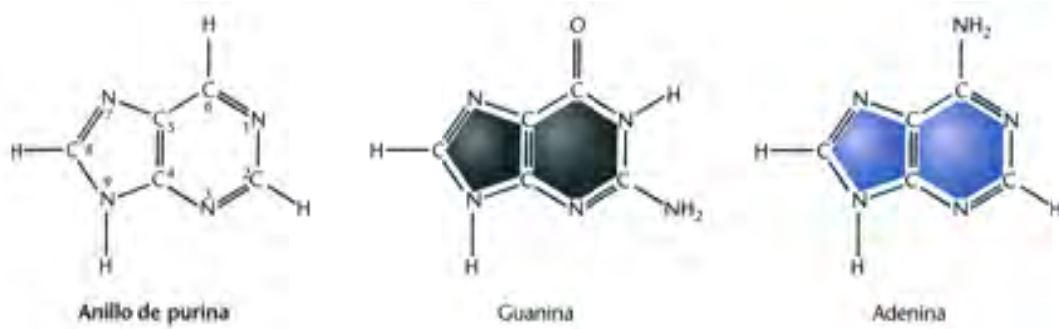


Figura 21. Estructura química de las purinas (Klug et al., 2006)

- **Pirimidinas:** Citosina, Timina y Uracilo (en el caso del RNA); poseen solamente un anillo.

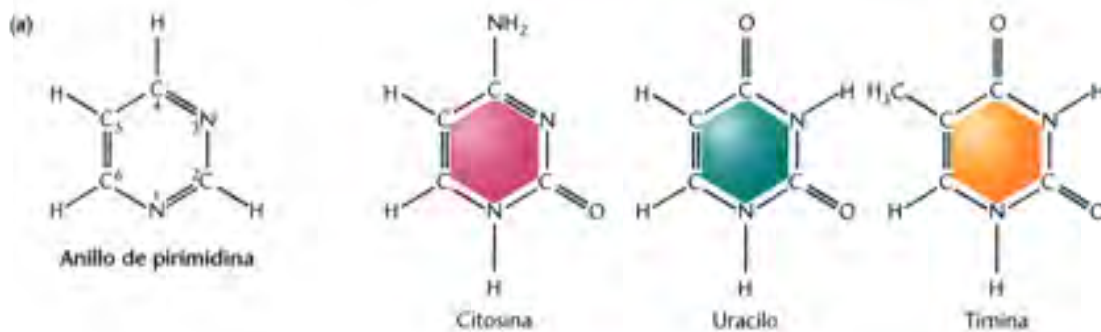


Figura 22. Estructura química de las pirimidinas (Klug et al., 2006)

El nombre de los ácidos nucleicos, se debe a la presencia del azúcar pentósido: el ácido ribonucleico o RNA contiene ribosa, mientras que el ácido desoxirribonucleico o DNA contienen desoxirribosa.

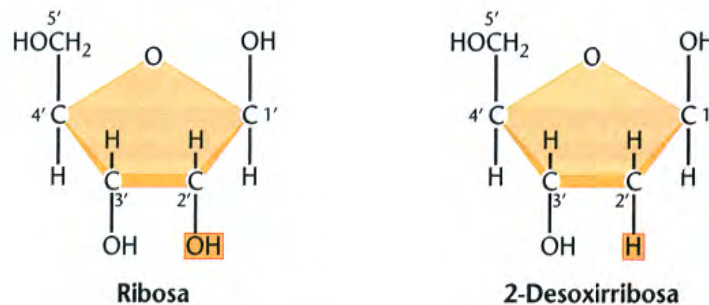


Figura 23. Estructuras químicas de la ribosa (RNA) y 2-desoxirribosa (DNA) (Klug et al., 2006)

La estructura primaria de una molécula de DNA consiste en residuos de azúcar y grupos fosfato, alternados en forma de enlace 3', 5'-fosfodiéster, es decir, un grupo fosfato une el átomo del carbono 3' de un azúcar, con el átomo de carbono 5' del azúcar contiguo.

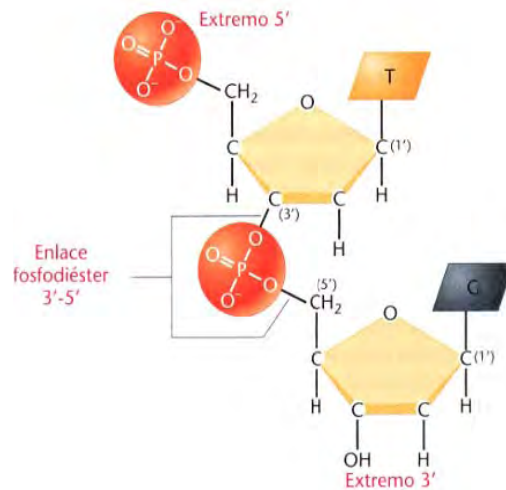


Figura 24. Unión de nucleótidos mediante el enlace fosfodiéster 3'-5' (Klug et al., 2006)

La estructura secundaria del DNA es una doble hélice en la cual se encuentran unidas entre sí dos moléculas de DNA por enlaces de hidrógeno débiles para formar un DNA dúplex. El enlace de hidrógeno ocurre entre las bases opuestas lateralmente y los pares de bases (pb) de ambas cadenas siguen las reglas de Watson-Crick: se enlazan de manera específica la A con T y C con G (Strachan, T. y Read, A., 2004).

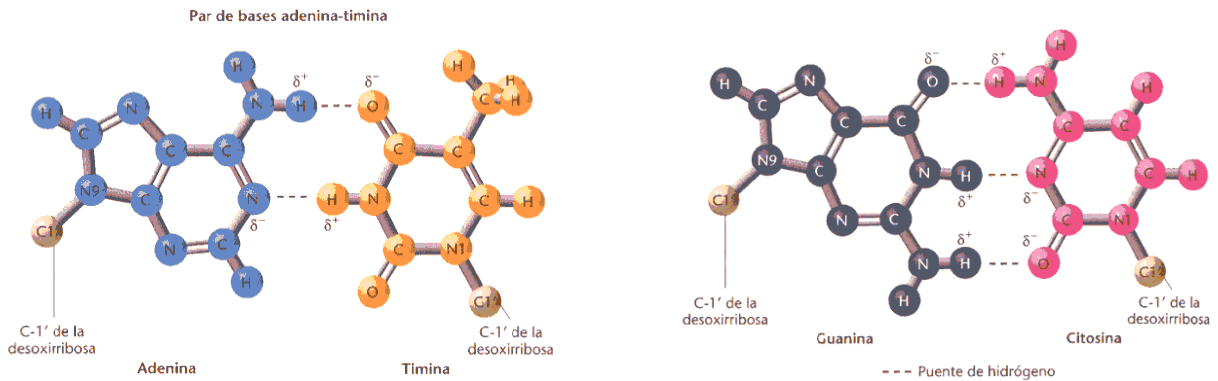


Figura 25. Enlaces formados entre A y T (izquierda) y G y C (derecha), unidas mediante enlaces de hidrógeno (Klug, et al., 2006)

El DNA puede adoptar diferentes tipos de estructuras helicoidales, pero en condiciones fisiológicas la mayoría del genoma eucariótico es de la forma B-DNA (hélices que forman un espiral y gira en forma dextrógira), en la que cada cadena helicoidal tiene una vuelta completa de 3.4 nm. Al formarse los enlaces fosfodiéster entre los residuos de azúcares sucesivos, un extremo 5' de cada

cadena de DNA posee un residuo de azúcar terminal, mientras que el otro extremo se denomina 3' por la ausencia del enlace fosfodiéster en el átomo de carbono número 3' del residuo de azúcar terminal. Se dice que las dos cadenas de DNA dúplex son antiparalelas porque siempre se relacionan en forma: 5'-3' de una cadena, con otra 3'-5', siendo la opuesta a su compañera (Strachan, T. y Read, A., 2004).

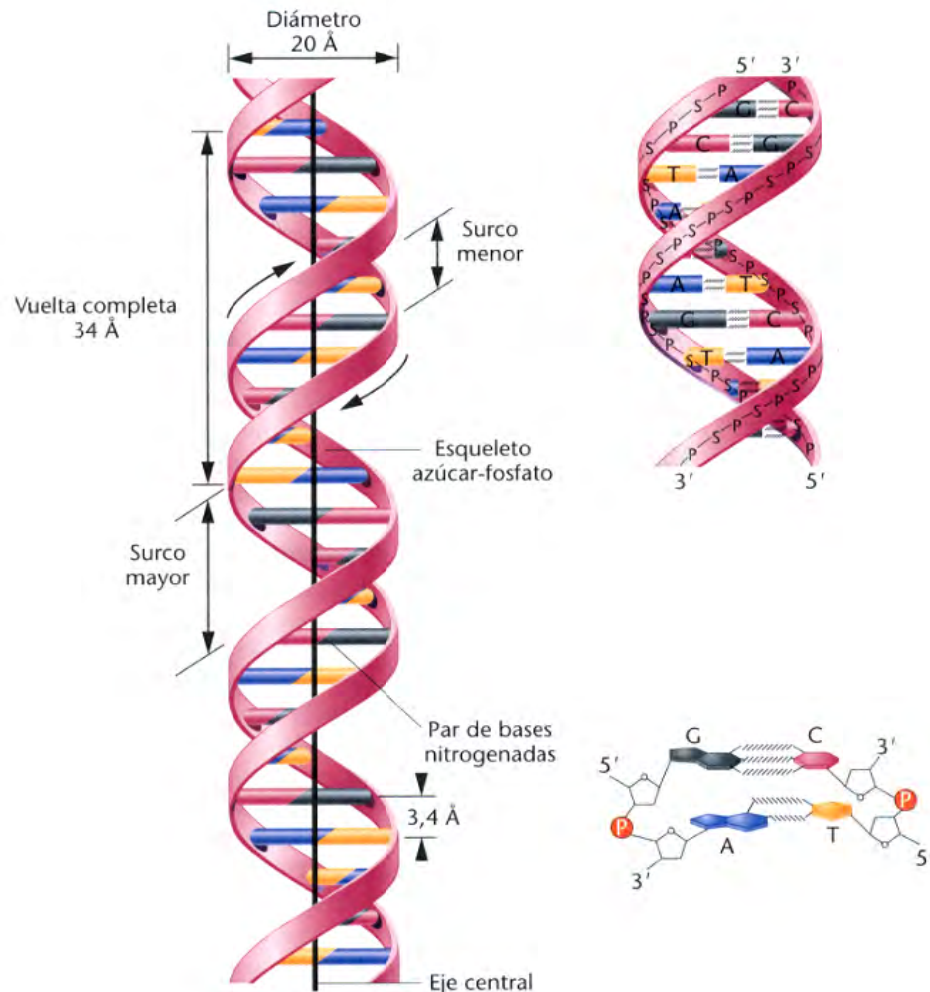


Figura 26. Estructura doble hélice del DNA, presenta sus características estructurales: el esqueleto azúcar fosfato, las uniones entre los pares de bases nitrogenadas (10 pb por vuelta), su carácter antiparalelo y la disposición horizontal de las bases (Klug, et al., 2006)

En las células eucariotas, el DNA y proteínas asociadas a él, llamadas histonas, forman complejos, formando estructuras nucleoproteicas denominadas cromosomas, que se encuentran formados por fibras de cromatina estrechamente espiralizadas y sólo son visibles al microscopio óptico durante la fase de mitosis, sin embargo, durante la interfase del ciclo celular, esta cromatina se despiraliza y los cromosomas no pueden ser observables. Durante la interfase, la cromatina se



encuentra dispersa en el núcleo, y se replica el DNA de cada cromosoma, pero al continuar el ciclo celular, gran parte de las células vuelven a entrar en mitosis, en la que la cromatina se espiraliza de nuevo en cromosomas visibles. Se dice que esta condensación implica una contracción de unas 10 000 veces para cada fibra de cromatina (Klug et al., 2006).

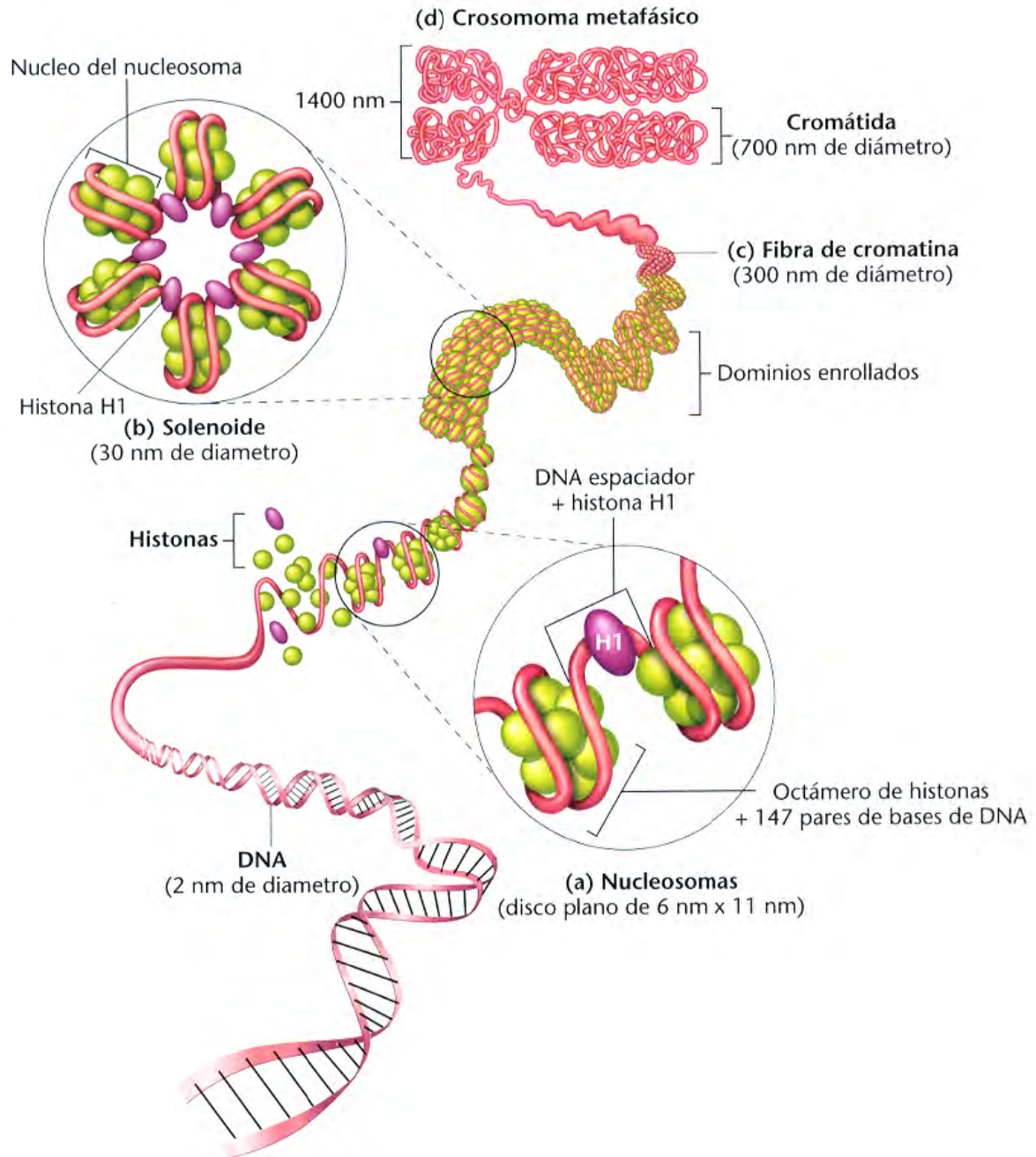


Figura 27. Asociación entre histonas y DNA, esquema de enrollamiento de la cromatina produciendo cromosomas condensados y visibles (Klug et al., 2006)

El proceso de síntesis del DNA (replicación), que ocurre durante la interfase del ciclo celular, es de tipo semiconservativo, ya que durante este proceso ambas cadenas de DNA de cada cromosoma, se desenrollan por acción de una helicasa y cada cadena de DNA dirige la síntesis de una nueva cadena de DNA complementaria, formándose así dos hijas dúplex de DNA, cada una idéntica a la molécula original o parental (Strachan, T. y Read, A., 2004).

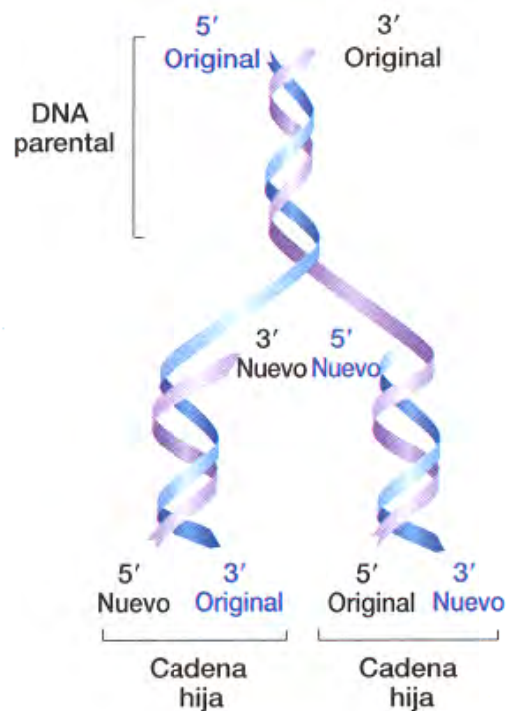


Figura 28. Modelo general de replicación semiconservativa del DNA (Strachan, T. y Read, A., 2004)

El DNA se replica durante la fase S del ciclo celular, donde se obtiene de cada cromosoma, un duplicado asociado como cromátida hermana unidas por el centrómero. Como ya se mencionó anteriormente, las cromátidas hermanas pueden ser visibles durante la profase tardía o metafase del ciclo celular, antes de la segregación para la formación de las células hijas. De acuerdo a la localización del centrómero, los cromosomas humanos pueden clasificarse en:



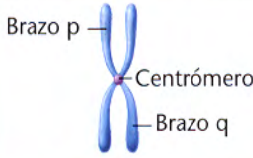


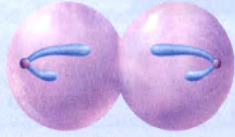


Localización del centrómero	Denominación	Forma en metafase	Forma en anafase
Central	Metacéntrico		
Entre el centro y el extremo	Submetacéntrico		
Próxima al extremo	Acrocéntrico		

Figura 29. Tipos de cromosomas basados en la posición de su centrómero (Klug et al., 2006)

Los genes son unidades orgánicas que controlan la herencia y se encuentran arreglados linealmente en los cromosomas, donde cada gen ocupa un sitio o locus específico. Los cromosomas son los elementos intracelulares que los transportan y son visibles en el microscopio óptico. Los cromosomas se encuentran localizados dentro del núcleo de la célula; cada célula somática normal de un individuo dentro de una misma especie, posee un número fijo o constante de cromosomas, que en los organismos de reproducción sexual se denomina número cromosómico diploide ( $2n$ ). Por otro lado, las células encargadas de la reproducción, llamadas gametos, tiene un número cromosómico igual a la mitad del número diploide, llamado número haploide o simple ( $n$ ).

Los humanos poseen 46 cromosomas en las células somáticas y 23 en los gametos (óvulo y espermatozoide). De los 23 pares, 22 son comunes para ambos sexos y se denominan autosomas; el par restante recibe el nombre de gonosomas ó cromosomas sexuales: 2 cromosomas X en la mujer (46, XX) y un X y un Y, en el varón (46, XY) (Salamanca, 1993). Pero los cromosomas no sólo poseen un número constante en cada especie, sino que como ya se mostró, presentan una estructura y forma definidas.

### 2.5.2. Los Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH)

Los ICH, son producidos por el intercambio recíproco de material genético entre las dos cromátidas hermanas de un mismo cromosoma (Cornet, 2007), es decir, representan el intercambio entre locus homólogos, de DNA replicado. Estos intercambios, presumiblemente implican el rompimiento, intercambio y reunión de regiones físicas, entre las cromátidas (Oztas et al., 2007).

El mecanismo molecular por medio del cual se forman los ICH, aún no ha sido bien dilucidado (Kanaar et al., 1998), aunque diversos autores a lo largo de los años han propuesto diversas formas mediante las cuales probablemente se lleven a cabo. Uno de los caminos propuestos, es el que se explica en la figura 30. El paso 1 y 2, ejemplifica una horquilla de replicación próxima a una ruptura en una de las cadenas en replicación. Una vez que la horquilla de replicación alcanza dicha ruptura, la horquilla se rompe (paso 3), a lo que se produce una reparación tomando como molde la otra cadena sin ruptura (paso 4; la flecha negra curvada indica simplemente un giro para facilitar la comprensión de los siguientes pasos); la síntesis continúa en la cadena rota 3' (paso 5), mientras que Rad51, actúa como mediador para producir la invasión de la otra cadena a fin de seguir con la síntesis (paso 6), produciéndose una conexión e intercambio entre ambas cadenas, con la consecuente formación de un ICH (paso 7). Una vez solucionado el problema, la replicación en la horquilla es restaurada y sigue su curso (paso 8) (Wilson, D & Thompson, L., 2007).

A través de los años, se han desarrollado técnicas que permiten la evidenciación de los ICH aprovechando la característica semiconservativa de la replicación del DNA, además de que para su evidenciación es necesario tener dos divisiones sucesivas. Las primeras técnicas empleadas, utilizaban colorantes fluorescentes, por lo que se requería de un microscopio de fluorescencia, además de que la fluorescencia se extinguía rápidamente durante la observación (Latt, 1973). Fue hasta 1974 que Perry y Wolff, propusieron un nuevo método en el cual se empleaba además de la 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) y el colorante 33258 de Hoescht, un buffer de solución salina doble citratos (2x SSC a 60°C) y el colorante de Giemsa (Perry, P. & Wolf, S., 1974).



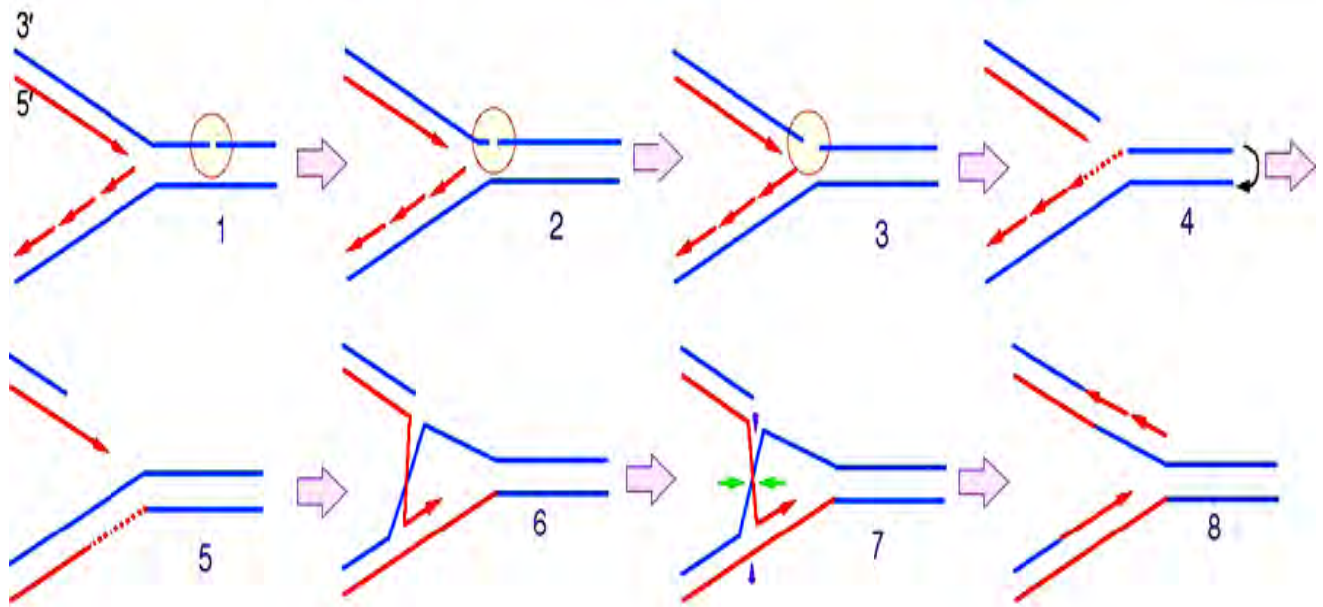


Figura 30. Probable mecanismo de formación de ICH (Wilson, D & Thompson, L., 2007)

En esta técnica se adiciona BrdU, que es un análogo de la base timidina y se incorpora en su lugar de manera eficiente durante la elongación de las cadenas del DNA en la replicación (Wilson, D & Thompson, L., 2007). Las células son tratadas con el colorante 33258 de Hoeschst, quien se une a la BrdU intercalada en las cadenas de DNA; un posterior tratamiento de fotólisis, elimina los complejos formados entre el Hoeschst y la BrdU, para dejar en su lugar huecos a lo largo de toda la cadena de DNA y cuyas cargas logran estabilizarse mediante el empleo del buffer 2x SSC. La tinción con el colorante de Giemsa tiñe fuertemente las cromátidas con mayor densidad de material genético (original o que han sido sustituidas en menor cantidad con BrdU), mientras que las que presentan una coloración menor, es debido a que poseen una menor cantidad de material genético remanente (Tucker et al., 1993), pudiéndose observar y analizar fácilmente en un microscopio óptico de campo claro. Al microscopio, en las metafases de segunda división, los cromosomas se observan con una cromátida fuertemente teñida y otra clara, además de que también pueden presentarse segmentos intercambiados, lográndose su observación mediante la diferencia en la coloración de ambas cromátidas; es así como se pueden observar los ICH (Salamanca, 1993).



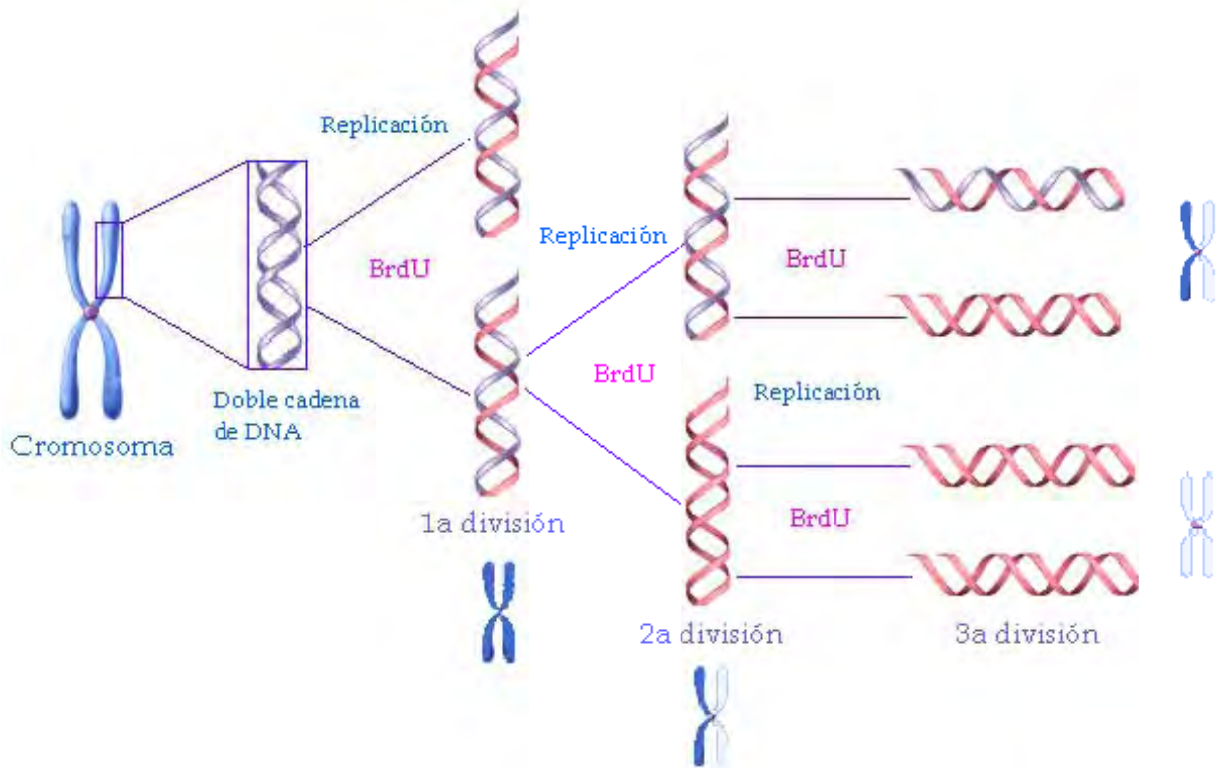


Figura 31. Incorporación de la BrdU a través de 3 ciclos de replicación continua, esto gracias al tipo de replicación semiconservativa del DNA. Las hebras de color gris, representan las cadenas de DNA originales o no sustituidas con BrdU, mientras que las de color rosa, ejemplifican las cadenas recién sintetizadas a las cuales la BrdU ha sido incorporada. Se ilustra también, la forma en la que los cromosomas pueden observarse en metafases de 1a, 2a y 3a división

Por tanto, el conteo de los ICH, se realiza en metafases de segunda división, ya que son en estas donde se pueden observar los intercambios recíprocos entre las dos cromátidas de un cromosoma.

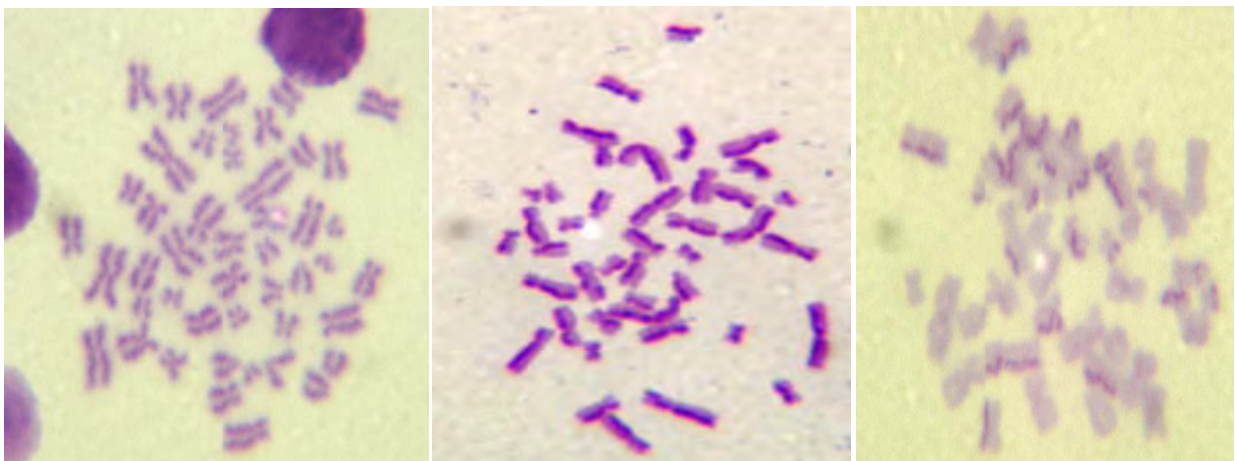


Figura 32. Metafases de 1a, 2a y 3a división (izquierda a derecha), vistas al microscopio óptico y teñidas con Giemsa (Macías, 2009)

Los ICH se clasifican en tres tipos, se pueden encontrar más de un ICH dentro de un mismo cromosoma:

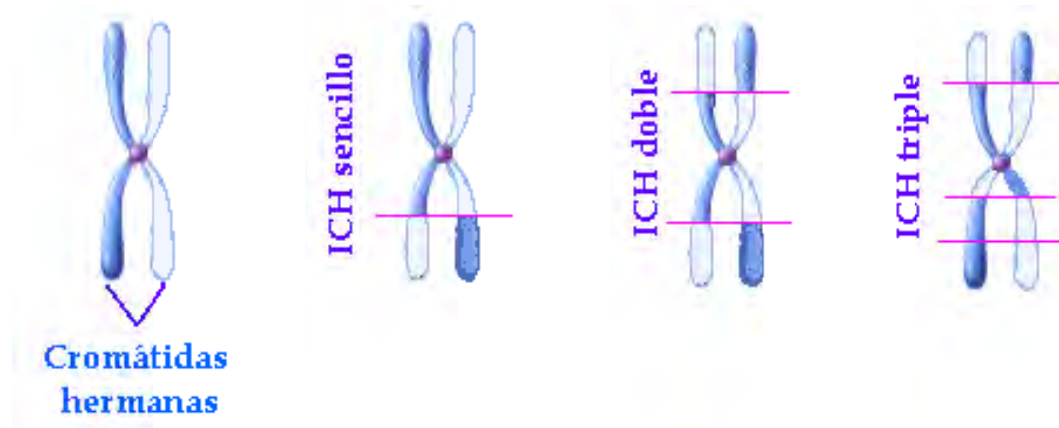


Figura 33. Tipos de ICH. Esquema de cromosomas de 2ª división sin intercambios y con intercambios: sencillo, doble y triple, que corresponde a 1, 2 y 3 ICH

Se ha observado, que los ICH ocurren de manera natural como un evento asociado a la replicación normal del DNA, estimándose con una ocurrencia de 3 a 4 intercambios por cada ciclo y por célula, en condiciones donde la incorporación de la BrdU es muy bajo o igual a cero (Pinkel et al., 1985; Stoilov et al., 2002). Un incremento de los ICH ocurre cuando un agente mutágeno produce lesiones al DNA (Madeiros et al, 2008), por lo que tanto las lesiones, como los defectos en los sistemas de reparación de éste, juegan un importante rol en la formación de los ICH (Oztas et al., 2007). Dado lo anterior se puede entender que, para que se produzcan los ICH es condicionante que se lleve a cabo la síntesis del DNA, produciéndose durante la fase S del ciclo celular.

Para el análisis de los ICH, es necesario tomar algunas consideraciones tales como: elegir metafases de segunda división, que dichas metafases posean un número completo de cromosomas (46), los cromosomas deben encontrarse más o menos dispersos (el empalme entre éstos pueden dificultar el conteo e incluso ocultar el verdadero número de ICH) y los cromosomas deben de poseer un tamaño adecuado para la clara visualización de los mismos (evitar los cromosomas muy pequeños).



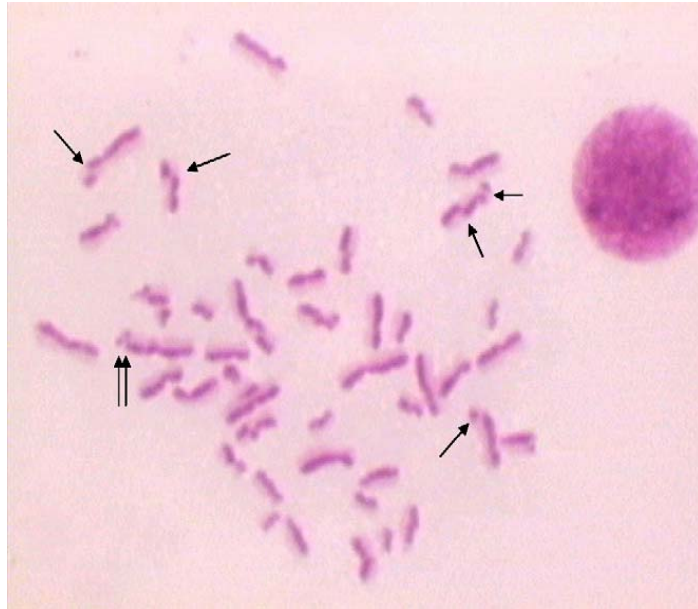


Figura 34. Metafase de segunda división de linfocitos humanos, las flechas indican algunos ICH presentes (Mpountoukas et al, 2008)

Se ha demostrado que la prueba de ICH resulta ser muy efectiva para la identificación de mutágenos de tipo S-dependientes y tipo UV, siendo menos efectiva para agentes G-dependientes. Los agentes mutagénicos S-dependientes, son aquellos capaces de inducir rupturas en los cromosomas (como los agentes alquilantes), requiriendo para esto que la célula atraviese la fase S (de síntesis) del ciclo celular.

Los sistemas de análisis de los ICH para la detección del daño genético se han utilizado tanto en sistemas *in vivo* en diferentes tejidos de animales intactos, como en sistemas *in vitro* en cultivo celular. Tanto las pruebas *in vivo* e *in vitro*, poseen ventajas y desventajas; para la segunda, a continuación se mencionan algunas:

Tabla 6. Ventajas y desventajas de los sistemas de prueba de ICH *in vitro*

(Stetka et al., 1976; Latt, S. & Shreck, R., 1980 Tucker et al., 1993)

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>- No se requiere el empleo de animales de experimentación como rata, ratón, hámster, conejos, plantas, insectos, peces y embriones de pollo, necesarios para los sistemas <i>in vivo</i>.</li> <li>- Se reducen los costos de mantenimiento de los animales de experimentación, además del tiempo en su cuidado y limpieza.</li> <li>- Se eliminan los problemas de manejo y administración de la BrdU a los animales de experimentación, durante tiempos prolongados.</li> <li>- Pueden realizarse cultivos celulares a partir de un gran número de tejidos: fibroblastos, ovocitos, V79, ovogonias de Hámster chino, líneas celulares de pulmón, piel fetal humana, así como linfocitos humanos.</li> <li>- Fácil obtención de los tejidos empleados (ej. Linfocitos humanos obtenidos de una muestra de sangre periférica).</li> <li>- Los sistemas <i>in vitro</i>, contribuyen enormemente al desarrollo de la Genética Toxicológica.</li> <li>- La técnica de obtención de las células en los sistemas <i>in vitro</i>, es relativamente más fácil que la empleada <i>in vivo</i> pues no implica el sacrificio del animal de experimentación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se requiere de cultivos celulares que puedan realizar por lo menos, dos ciclos celulares necesarios para la incorporación de la BrdU.</li> <li>- Los medios de cultivo y reactivos empleados producen, por sí solos, ICH.</li> <li>- No todos los mutágenos y carcinógenos son activos <i>in vitro</i>, por lo que se debe adicionar al medio, microsomas hepáticos para su activación metabólica.</li> <li>- No es factible la determinación de la frecuencia espontánea de los ICH en cada ciclo de división, sólo en cada dos.</li> <li>- La dosificación por concentración empleada en la técnica <i>in vitro</i>, suele ser menos apropiada que la dosificación por peso en los sistemas <i>in vivo</i>.</li> <li>- Técnicamente, la preparación de las figuras metafásicas a partir de sistemas <i>in vivo</i> como las médula ósea, resultan ser más simples y rápidas.</li> </ul>

En los sistemas *in vitro*, como el cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica (empleado en el presente trabajo), es necesario adicionar al cultivo celular, un agente mitogénico, como la PHA, a fin de estimular la clonación de las células; posteriormente, se debe adicionar un agente que logre detener dichas células en metafase como lo logra hacer la colchicina, para poder visualizar los cromosomas y analizarlos.



### 2.5.3. Importancia de los ICH.

En 1975, en la revista *Nature*, se reportó que la prueba de ICH era un método rápido y sensible método para la detección de agentes químicos capaces de producir mutaciones cromosómicas, representando un nuevo y poderoso método para la detección de mutágenos ambientales (Wilson, D & Thompson, L., 2007), en cuya época fué considerado uno de los métodos más sensibles para detectar daño genético, hasta 100 veces más sensibles que las aberraciones cromosómicas (Latt et al., 1980).

Diversos agentes tanto físicos como químicos, así como algunas enfermedades, producen un aumento en la frecuencia de ICH (Oztas et al., 2007), enfermedades en las cuales se encuentran implicadas inestabilidades cromosómicas y defectos en los sistemas de reparación del DNA, que generalmente desembocan en el desarrollo de tumores malignos, inclusive se han encontrado aumentos de ICH en pacientes con carcinomas, por lo que se les ha relacionado con una alta incidencia al desarrollo de cáncer, tanto, que se ha propuesto su empleo como un biomarcador en cáncer (Bonassi, S. & Au, W., 2002). Además, como ya se ha mencionado anteriormente, la EPA (Environmental Protection Agency), considera esta prueba dentro de los métodos para la identificación de agentes carcinogénicos, como una prueba a corto plazo capaz de detectar un daño primario al DNA (Bello, J. y López de Cerain, A., 2001).

El ensayo de ICH's junto a otras pruebas como MN y AC, son considerados como marcadores citogenéticos para la detección temprana de daños al DNA causados por diversos agentes pudiéndose emplear también como biomarcadores para la salud ambiental y ocupacional, examinando los efectos genotóxicos que pudiesen inducir diversos xenobióticos presentes en los alimentos, medicamentos, agua y el medio ambiente en general (Theodorakis, 2001; Serap et al., 2008; Mpountoukas et al., 2008; Knudsen, L. & Hansen, A., 2007).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad que debido a su impacto sobre la salud humana y a la esperanza de encontrar una cura, ha sido foco de esfuerzos intensos de investigación durante décadas, los cuales, a pesar de presentar notables avances en el conocimiento de las bases celulares y moleculares del mismo, prácticamente no tienen impacto en la prevención o aumento de la tasa de supervivencia de personas afectadas con la mayor parte de los tipos de cáncer. Actualmente, se considera uno de los más importantes problemas de salud mundial y se ha reconocido como la tercera causa de mortalidad en nuestro país (INEGI, 2006).

En un intento por disminuir la tasa de mutación en humanos y por lo tanto, de los procesos neoplásicos, se ha tratado de identificar agentes antimutagénicos y anticarcinogénicos, para aumentar la exposición a éstos, especialmente a través de la dieta como parte de un tratamiento. Estos antimutágenos, son sustancias capaces de contrarrestar el daño mutagénico, independientemente de los mecanismos involucrados, los cuales pertenecen a una gran variedad de familias químicas tales como: los fenoles, tocoferoles, ácidos grasos, tioles y proteínas que en su mayoría, se han aislados de diversos vegetales como por ejemplo, las leguminosas (lectinas).

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmunitario, fijadoras de carbohidratos con capacidad hemaglutinante y de precipitación de glicoconjugados. Desde los años setenta, se ha reportado la actividad antitumoral de lectinas de origen vegetal.

Dado que se han estudiado estas proteínas desde el punto de vista anticarcinogénico (Jordinson et al., 1999), pero no se ha encontrado antecedentes sobre una evaluación por medio de un ensayo antigenotóxico, en el presente trabajo se busca realizar un estudio a cerca del efecto de un extracto proteínico de *Vicia faba* (EpVf), sobre la frecuencia de ICH en un cultivo de linfocitos humanos, y con esto dilucidar un poco más acerca del mecanismo antimutagénico, adjudicado a estas proteínas o lectinas.

## **4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar el efecto antigenotóxico del extracto proteínico proveniente de semillas de *Vicia faba* (Haba), por medio del ensayo de ICH *in vitro*, y la identificación de proteínas contenidas en dicho extracto mediante electroforesis SDS-PAGE.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Obtener un extracto proteínico a partir de semillas de *Vicia faba* (EpVf), mediante el método "salting in" o disolución.
- Liofilizar el EpVf obtenido, a fin de concentrarlo para utilizarlo en un cultivo celular de linfocitos humanos extraídos de sangre periférica.
- Determinar la eficiencia del proceso de liofilización en el extracto proteínico (EpVf) mediante la cuantificación de proteínas por el método de Biuret.
- Determinar si el EpVf obtenido, posee un efecto Genotóxico por medio de la prueba de ICH *in vitro*, empleando un cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica.
- Determinar si el EpVf obtenido posee un efecto Antigenotóxico mediante el ensayo de ICH *in vitro*, retándolo con un potente mutágeno como lo es la MMC.
- Separación e identificación de proteínas presentes en el EpVf por electroforesis SDS-PAGE.

### **HIPÓTESIS**

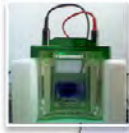
Sí el extracto proteínico obtenido a partir de semillas de *Vicia faba* (Haba) disminuye la frecuencia de ICH *in vitro*, esto sugeriría que posee una acción antigenotóxica, y ésta podría contribuir al efecto anticancerígeno adjudicado a las proteínas (lectinas) de esta leguminosa.

## 5. MATERIALES



## REACTIVOS

- 5-Bromodesoxiuridina (5-BrdU)
- Aceite de inmersión
- Ácido acético glacial
- Acrilamida
- Agua destilada y desionizada
- Albúmina bovina
- Alcohol etílico
- Azul de Coomassie R-250
- Bis-acrilamida
- Bisbenzimidida Hoechst 33258
- Citrato trisódico dihidratado
- Colchicina
- Colorante de Giemsa
- Fitohemaglutinina (PHA)
- Fosfato de sodio monohidratado
- Glicerol
- Glicina
- HCl concentrado
- Heparina
- KCl
- Medio de cultivo RPMI
- Metanol absoluto
- Mitomicina C (MMC)
- Persulfato de amonio
- Reactivo de Biuret
- SDS
- Solución hipotónica de NaCl al 0.9%
- Tris base
- $\beta$ -mercaptoetanol



## EQUIPO

- Agitador-Parrilla CORNING
- Balanza analítica SCALTEC INSTRUMENTS
- Baño María GRANT W14
- Campana de flujo laminar
- Centrífuga IEC Clinical
- Contador celular
- Equipo para electroforesis Mini-Protean Bio Rad
- Espectrofotómetro SPECTRONIC 20D+
- Incubadora BLUE M
- Lámpara de luz UV Ultra-Violet Products INC
- Liofilizadora LABCONCO FREEZONE 6
- Microscopio LEICA
- Potenciómetro CONDUCTRONIC pH130
- Ultracentrífuga IEC Centra MP4R
- Vórtex SUPER-MIXTER LAB-LINE INSTRUMENTS, INC

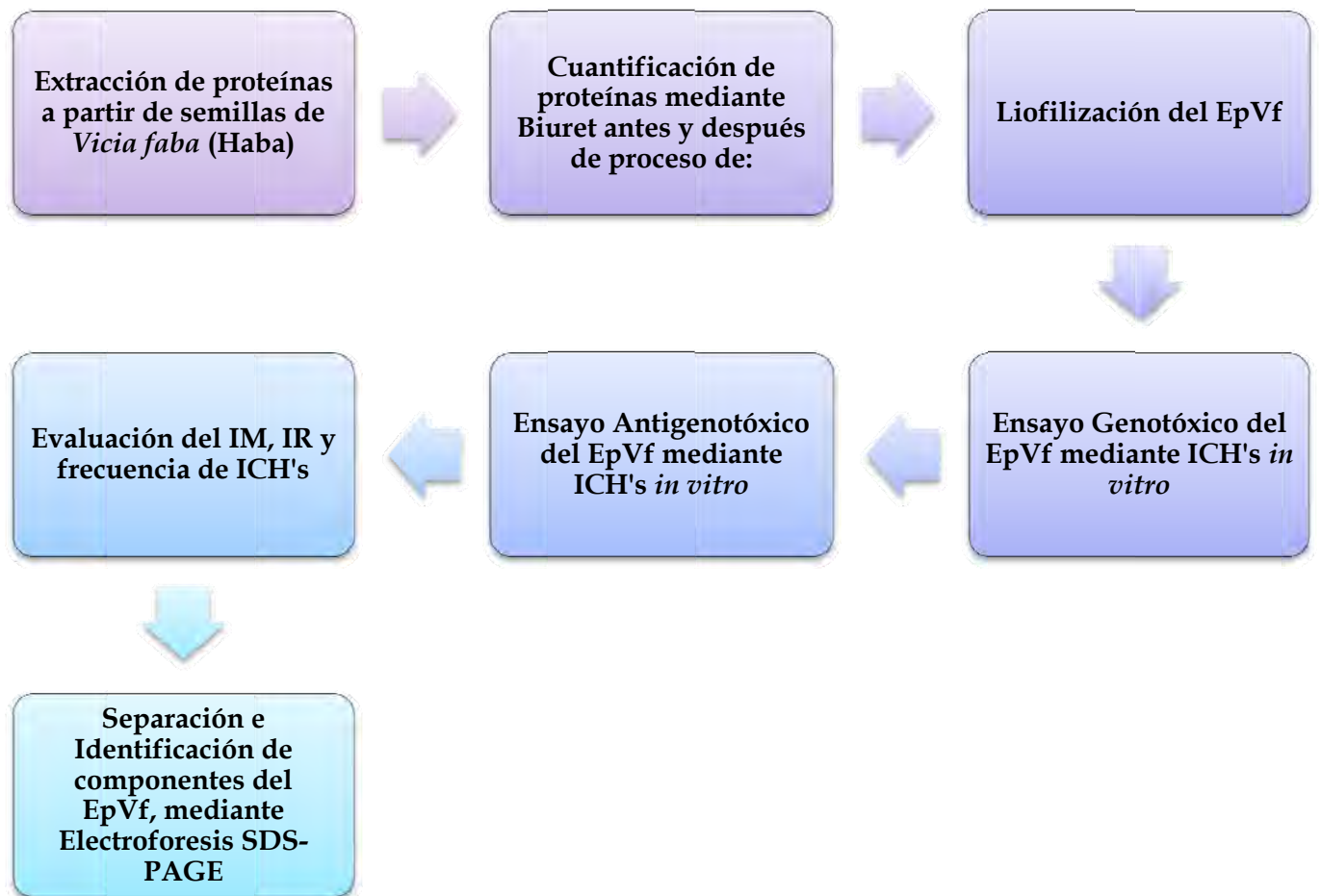


## MATERIAL BIOLÓGICO

- Sangre completa
- Semillas de *Vicia faba* (Haba)



## 6. METODOLOGÍA GENERAL



## 7. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

### 7.1. Extracción de proteínas a partir de semillas de *Vicia faba* (Haba)

Se pesaron 21.009 g de semillas de *Vicia faba* (haba) y se sumergieron en agua destilada durante 45 hrs a temperatura ambiente. Se licuó con SSF hasta la obtención de una pasta homogénea y se llevó hasta 100 mL con SSF. La mezcla se refrigeró durante 24 hrs con agitación ocasional. Transcurrido el tiempo, se filtró empleando una gasa y posteriormente el filtrado se sometió a un proceso de Ultracentrifugación a 11 000 rpm, 15 min, para la obtención del sobrenadante (EpVf).

### 7.2. Cuantificación de proteínas por el Método de Biuret

Reactivos necesarios para la realización de la Curva Patrón de proteínas:

- Solución Patrón de Albúmina de concentración 1 mg/mL
- Solución hipotónica de NaCl al 0.9 %
- Reactivo de Biuret

Se realizó una curva patrón de proteínas empleando albúmina (marca MCIB) como estándar, como se indica en la tabla 7; al mismo tiempo que se preparó un tubo problema con 0.1 mL de EpVf, 3.4 mL de NaCl y 1.5 mL del reactivo de Biuret.

Tabla 7. Preparación de la Curva estándar de proteínas.

TUBO	Albúmina (mL)	NaCl (mL)	Biuret (mL)
B	0	3.5	1.5
2	0.1	3.4	1.5
3	0.5	3.0	1.5
4	1.0	2.5	1.5
5	1.5	2.0	1.5
6	2.0	1.5	1.5
7	2.5	1.0	1.5

Los sistemas fueron incubados 10 min a 50 °C en baño maría y posteriormente se leyeron sus absorbancias en un espectrofotómetro a una  $\lambda=540$  nm. Se procedió a realizar una regresión lineal con los valores de absorbancias obtenidas en la curva patrón para obtener la ecuación de la recta e



interpolarse el valor de absorbancia obtenida de la muestra. Se efectuaron los cálculos pertinentes para la obtención del valor de la concentración de proteínas en la muestra del EpVf.

### 7.3. Liofilización del Extracto proteínico de *Vicia faba* (EpVf)

El EpVf obtenido fue repartido en frascos adecuados (pequeños y de color ámbar), en alícuotas no mayores a 10 mL y fueron congelados a -70 °C. Se introdujeron a un Liofilizador y fueron sometidos a un proceso de liofilizado (programa predeterminado por el aparato), durante 78 hrs.

### 7.4. Ensayo Genotóxico y Antigenotóxico del EpVf mediante la frecuencia de ICH *in vitro*

Se obtuvo una muestra de sangre de un individuo sano, sexo femenino, en ayuno y que no se encontraba bajo tratamiento farmacológico de tipo alguno, empleando una jeringa heparinizada. Se adicionó a cada frasco de cultivo lo correspondiente para el ensayo Genotóxico o Antigenotóxico, según correspondió:

#### ENSAYO GENOTÓXICO

Tabla 8. Ensayo Genotóxico del EpVf, mediante la prueba de ICH *in vitro*, empleando cultivo de linfocitos humanos

CULTIVO #	MEDIO RPMI (mL)	SANGRE (mL)	PHA (µL)	I N C	EpVf (µL)	BrdU (µL)	I N C	COLCHN 0.04% (µL)	I N C	
1	8	5-6	100	U	100	---	U	500	U	C
2	8	5-6	100	B	100	---	B	500	B	O
3	8	5-6	---	A	100	---	A	500	A	S
4	8	5-6	---	R	100	---	R	500	R	E
5	8	5-6	100		---	45		500		C
6	8	5-6	100	24	---	45	46.5	500	1.5	H
7	8	5-6	100	hrs	100	45	hrs	500	hrs	A
8	8	5-6	100	37°C	100	45	37°C	500	37°C	R



## ENSAYO ANTIGENOTÓXICO

Tabla 9. Ensayo Antigenotóxico del EpVf, mediante la prueba de ICH *in vitro* utilizando cultivo de linfocitos humanos

CULTIVO #	RPMI (mL)	SANGRE (mL)	PHA (μL)		EpVf (μL)	BrdU (μL)	MMC 0.0071μg/mL (μL)		COLCHN (μL)	I N C
1	8	5-6	100		---	---	---		500	U
2	8	5-6	100		---	---	---		500	B
3	8	5-6	100		---	45	---		500	A
4	8	5-6	100	I	---	45	---	I	500	R
5	8	5-6	100	N	100 (1mg/mL)	45	---	N	500	
6	8	5-6	100	C	100 (1mg/mL)	45	---	C	500	1.5hrs
7	8	5-6	100	U	100 (2mg/mL)	45	---	U	500	37°C
8	8	5-6	100	B	100 (2mg/mL)	45	---	B	500	
9	8	5-6	100	A	100 (6mg/mL)	45	---	A	500	Y
10	8	5-6	100	R	100 (6mg/mL)	45	---	R	500	
11	8	5-6	100		---	45	45		500	C
12	8	5-6	100	24	---	45	45	46.5	500	O
13	8	5-6	100	hrs	100 (1mg/mL)	45	45	hrs	500	S
14	8	5-6	100	37°C	100 (1mg/mL)	45	45	37°C	500	E
15	8	5-6	100		100 (2mg/mL)	45	45		500	C
16	8	5-6	100		100 (2mg/mL)	45	45		500	H
17	8	5-6	100		100 (6mg/mL)	45	45		500	A
18	8	5-6	100		100 (6mg/mL)	45	45		500	R

Transcurridas 72 hrs de incubación de los cultivos celulares, se colocó el contenido de cada cultivo en tubos para centrifuga; se centrifugaron 10 min a 3000 rpm y se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 1 mL. La resuspensión del paquete celular se realizó con ayuda de un vórtex y se adicionó 8 mL de KCl 0.075 M, a 37 °C. Se incubaron a 37 °C durante 30 min y se centrifugaron nuevamente a 3000 rpm, 5 min; el sobrenadante fue retirado dejando una poca cantidad de solución. Se resuspendió el paquete celular y se agregó 8 mL de solución fijadora metanol o etanol/ácido acético (3:1) fría, de forma lenta y homogeneizando la mezcla con vórtex. Se volvió a incubar en frío durante 30 min, y se volvió a centrifugar 5 min a 3000 rpm. Se retiró el sobrenadante, agregándose 8 mL de solución fijadora; se incubó en frío 15 min y se repitió el paso anterior las veces que fueron necesarias hasta que el sobrenadante se observó transparente. Por último, se volvió a centrifugar y dejar aproximadamente 10 gotas de solución en las que se volvió a resuspender el paquete celular y se gotearon (aproximadamente 3 gotas), sobre portaobjetos limpios y desengrasados. Se dejaron secar y “madurar” durante aproximadamente 24 hrs.

### 7.5. Tinción Diferencial de ICH

Las laminillas fueron colocadas en una base adecuada. Les fueron aplicadas 4 a 5 gotas de Bisbenzimidazol Hoechst 33258 a cada laminilla y se les colocó encima un cubreobjetos (largo) para expandir la solución, impidiendo la formación de burbujas. Fueron colocadas en oscuridad durante 20 min, no sin antes colocar alrededor de los portaobjetos unas gotas de Buffer de Diferenciación. Se expusieron las laminillas a luz UV durante 1 hr a una distancia no mayor de 2 cm. Transcurrido este tiempo, los cubreobjetos fueron retirados por inmersión en agua desionizada; después se colocaron las laminillas en vasos coplin que contenían Solución Salina Doble Citratos a 60 °C durante 15 min; las laminillas fueron enjuagadas primero en agua caliente y después en fría. Una vez que se encontraron secas al aire, fueron teñidas con colorante de Giemsa al 5 % en Buffer de Fosfatos a pH= 6.8, durante 10 min.

Esta tinción se realizó con la finalidad de evidenciar los ICH presentes por metafase de las células sometidas a los diversos tratamientos; posteriormente se procedió a evaluar la frecuencia de ICH, entre otros parámetros, tal y como se indica en la siguiente sección (7.6).

### 7.6. Evaluación de la Frecuencia de ICH

Se procedió a revisar las laminillas correspondientes a cada tratamiento para la evaluación de la Frecuencia de ICH. Los parámetros evaluados fueron:

- **Genotoxicidad**

Se reconocieron y contabilizaron el número de ICH presentes en 25 metafases de 2ª división. Como ya se ha mencionado, existe una clara correlación entre la inducción de ICH y la genotoxicidad, por lo que el conteo de los ICH producidos en presencia de la sustancia en estudio, indica el potencial que ésta posee para producir daño al material genético.

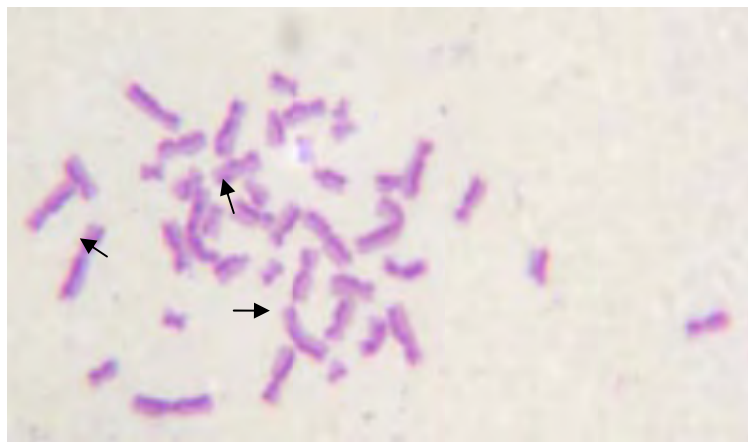


Figura 35. Fotografía de metafase de segunda división, en la cual se evidencian los ICH presentes observados al microscopio óptico a 100x (Macías, 2009)

- **Índice de replicación (IR)**

De 100 metafases encontradas fueron clasificadas en 1ª, 2ª y 3ª división. Este índice ofrece información acerca de si la sustancia en estudio, modifica el ciclo celular mediante una aceleración o desaceleración de la división celular.

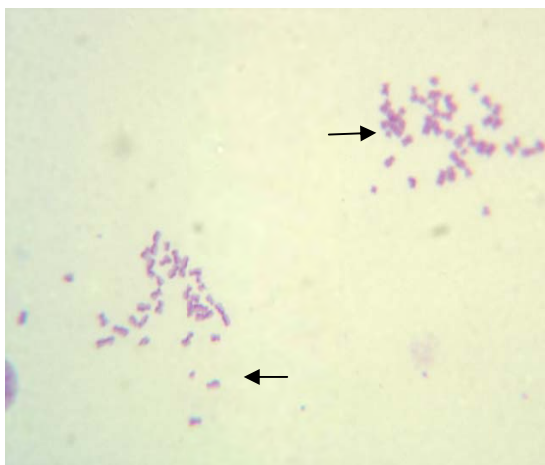


Figura 36. Fotografía de metafases de primera (arriba) y segunda división (abajo) observados a 40x en microscopio óptico (Macías, 2009)

- **Índice mitótico (IM)**

Fue contabilizado el número de células en división (metafases de 1ª, 2ª y 3ª), presentes en 1000 células (linfocitos). Este índice indica la proporción de células que se encuentran en fase de mitosis en un momento determinado; también es llamado índice de proliferación, siendo útil para determinar el efecto citotóxico que pueda ejercer la sustancia en estudio, sobre un cultivo celular, poniendo de manifiesto cambios bioquímicos, fisiológicos o genéticos sufridos por la célula y que pueden conducirlo a la muerte.

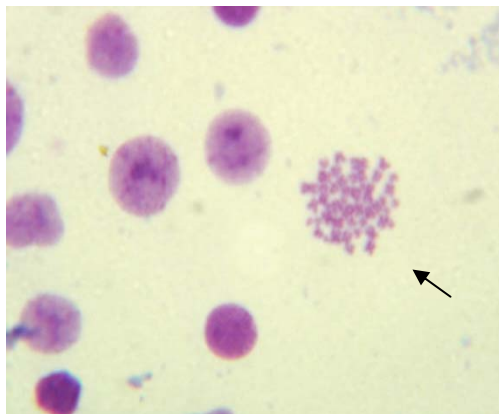


Figura 37. Fotografía de una metafase (derecha) y linfocitos humanos observados a 40x en microscopio óptico (Macías, 2009)

## 7.7. Separación e identificación de proteínas extraídas de *Vicia faba* mediante Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil Sulfato Sódico (SDS-PAGE)

### 7.7.1. Preparación de geles de poliacrilamida

Los cristales empleados para elaborar los geles de electroforesis fueron limpiados y desengrasados. Los geles concentradores y separadores fueron elaborados según Laemli (1970), como se indica a continuación:

Tabla 10. Preparación de gel separador para electroforesis SDS-PAGE

REACTIVOS	Acrilamida-Bisacrilamida 10%
Solución de monómeros	2.65 mL
4x Tris 1.5 M pH= 8.8	1.0 mL
SDS	80 µL
Agua desionizada	3.5 mL
Persulfato de amonio	80 µL
TEMED	8 µL

Tabla 11. Preparación de gel concentrador para electroforesis SDS-PAGE

REACTIVOS	Vol.
Solución de monómeros	650 µL
4x tris 0.5 M pH= 6.8	1.25 mL
SDS	50 µL
Agua desionizada	3.0 mL
Persulfato de amonio	50 µL
TEMED	10 µL

Una vez que los geles ya habían gelificado, se procedió a colocar los cristales que contienen los geles, dentro de la cámara para electroforesis, la cual fue llenada con Buffer de corrimiento frío, evitando la formación de burbujas. Las muestras previamente preparadas (ver sección 7.7.2.), se colocaron en los pozos formados en el gel concentrador, las muestras colocadas correspondieron a: el EpVf, albúmina bovina, un marcador de bajo peso molecular y buffer muestra en los carriles vacíos. La cámara de electroforesis fue correctamente cerrada y conectada a la fuente de poder. Las condiciones de corrimiento fueron: 2 a 3 hrs, a 100 volts.



**7.7.2. Preparación de muestras para electroforesis SDS-PAGE**

Se colocaron 15  $\mu$ L del EpVf en concentración de 30 mg/mL y 15  $\mu$ L de albúmina bovina fracción V (como control) en concentración de 2 mg/mL, en tubos eppendorf separados. Se adicionaron 15  $\mu$ L de buffer muestra (ver contenido en sección 12), a cada uno, se homogeneizaron y se colocaron en ebullición 5 min, después se centrifugaron a 12 000 rpm, tomando únicamente el sobrenadante para cargar los geles.

**7.7.3. Detección de proteínas del EpVf mediante tinción con Azul de Coomassie**

Transcurrido el tiempo de corrimiento, los geles fueron retirados de la cámara, enjuagados con agua destilada y sumergidos en colorante Azul de Coomassie durante 1 hr a 60°C. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el colorante y se enjuagaron nuevamente. Los geles ya teñidos, fueron colocados en solución desteñidora 1 hr a 60 °C, cambiando la solución ocasionalmente hasta que ya no se observó color en la solución. Los geles retirados se conservaron en agua desionizada hasta su uso. Se realizaron los cálculos pertinentes para la identificación de los PM de las proteínas del EpVf reveladas en los geles, con ayuda de la elaboración de una curva estándar con los marcadores de bajo PM empleados.



## 8. RESULTADOS

### 8.1. Cuantificación de proteínas en el EpVf, mediante el Método de Biuret

Una vez obtenido el EpVf como se indica en la parte 7.1., se realizó la cuantificación de las proteínas presentes en el extracto mediante el Método de Biuret, para lo cual se construyó una Curva Patrón de proteínas, empleando albúmina como estándar:

Tabla 12. Absorbancias obtenidas para la Curva estándar de proteínas, realizada mediante el método de Biuret

Concentración (mg/mL)	Absorbancia
Blanco	0.0
0.1	0.006
0.5	0.031
1.0	0.057
1.5	0.090
2.0	0.116
2.5	0.142

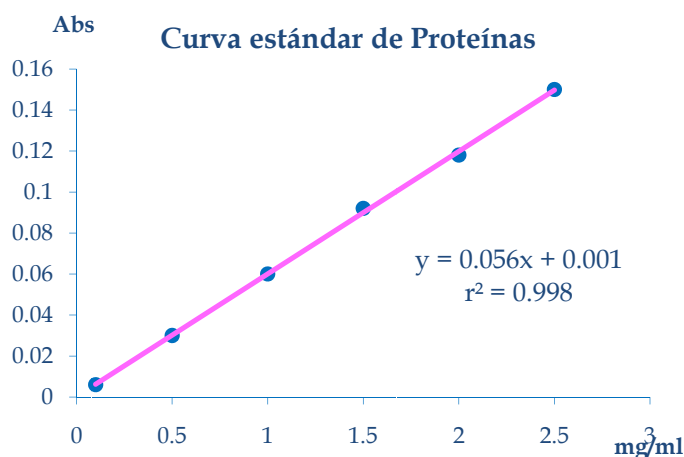


Figura 38. Curva estándar de proteínas; presenta una  $r^2 = 0.998$

La concentración de proteínas fue determinada una vez que se obtuvo el liofilizado de EpVf. En la siguiente tabla se muestra las concentraciones en cada una de las muestras.

Tabla 13. Concentración de proteínas presentes en el EpVf, sin liofilización y con esta

Tratamiento del EpVf	Concentración de proteínas en el EpVf
Sin liofilizar	26.4mg/mL
Liofilizado	95.6mg/mL



## 8.2. Resultados del Ensayo Genotóxico del EpVf, mediante la prueba de ICH *in vitro*

Se realizó un Ensayo Genotóxico, mediante el cual se deseaba saber si el EpVf poseía un efecto tóxico sobre el material genético, por lo que se introdujo éste en cultivos de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica de una paciente femenina, sana, de 23 años de edad.

### 8.2.1. Frecuencia de ICH

La frecuencia de ICH encontradas por metafase en cultivos de linfocitos que estuvieron expuestos al EpVf, ofrecieron información a cerca de si poseía un efecto genotóxico, en comparación a cultivos controles.

El análisis estadístico de los datos obtenidos de las lecturas realizadas a cada uno de los tratamientos y sus respectivas laminillas examinadas al microscopio, fue realizado mediante la prueba estadística ANOVA, utilizando el software: GraphPad Instat tm.

Tabla 14. Promedio de la Frecuencia de ICH encontradas por metafase en cultivos de linfocitos humanos, expuestos al EpVf

TRATAMIENTO	PROM. ICH	D.E. ICH
CN	5.61	0.31
EpVf [1mg/mL]	5.84	0.05

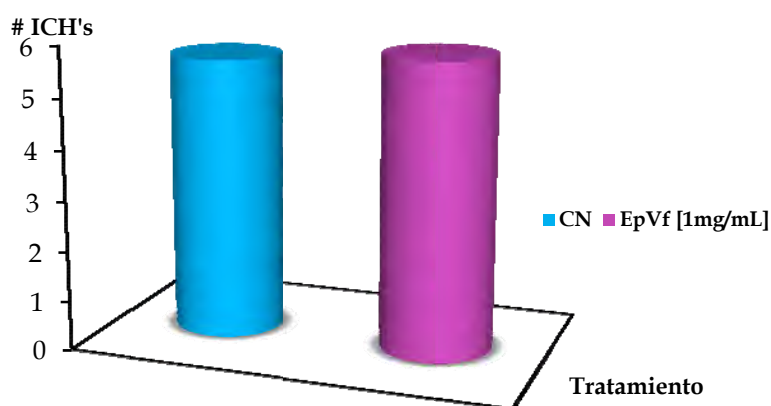


Figura 39. Frecuencia de ICH del ensayo Genotóxico. Se muestra el promedio de ICH encontradas en los cultivos de linfocitos humanos expuestos al EpVf. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (análisis de varianza ANOVA y  $p \geq 0.05$ ) entre el CN y los tratados con el EpVf en concentración de 1mg/mL ( $n = 25$ , cada ensayo se realizó por duplicado)



### 8.2.2. Índice de Replicación

El Índice de Replicación permitió observar si el EpVf modificaba la velocidad de la división celular a una concentración de 1mg/mL, en comparación a un Control Negativo.

Tabla 15. Promedio del Índice de Replicación (IR) observado en cultivos de linfocitos humanos expuestos al EpVf

TRATAMIENTO	PROM. IR	D.E. IR
CN	2.27	0.06
EpVf [1mg/mL]	2.27	0.16

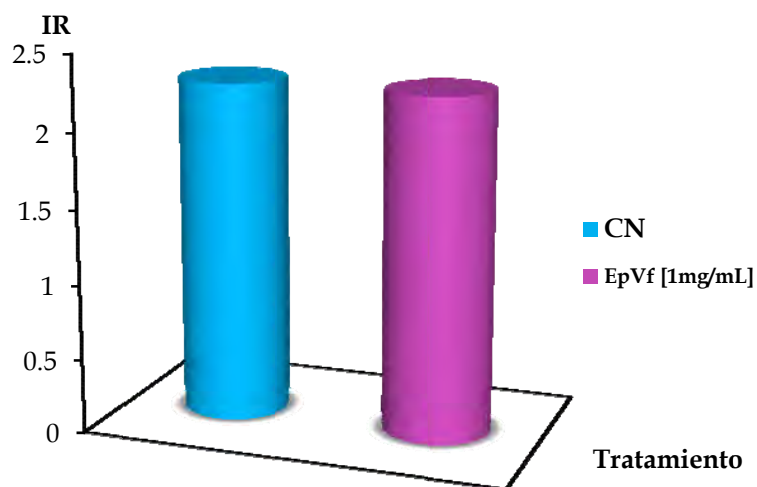


Figura 40. Índice de Replicación del ensayo Genotóxico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (análisis de varianza ANOVA y  $p \geq 0.05$ ), entre el CN y los cultivos tratados con el EpVf a una concentración de 1mg/mL ( $n=100$ , cada ensayo se realizó por duplicado)



8.2.3. Índice Mitótico

A continuación se presentan los resultados del Índice Mitótico obtenido en cultivos de linfocitos expuestos solo a PHA y el EpVf sólo, a fin de observar las diferencias entre los efectos que cada tratamiento pudiese tener sobre las células.

Tabla 16. Promedio del Índice Mitótico (IM) en cultivos de linfocitos humanos del ensayo Genotóxico

TRATAMIENTO	PROM. IM	D.E. IM
PHA [1mg/mL]	22.50	2.12
EpVf [1mg/mL]	0.50	0.70

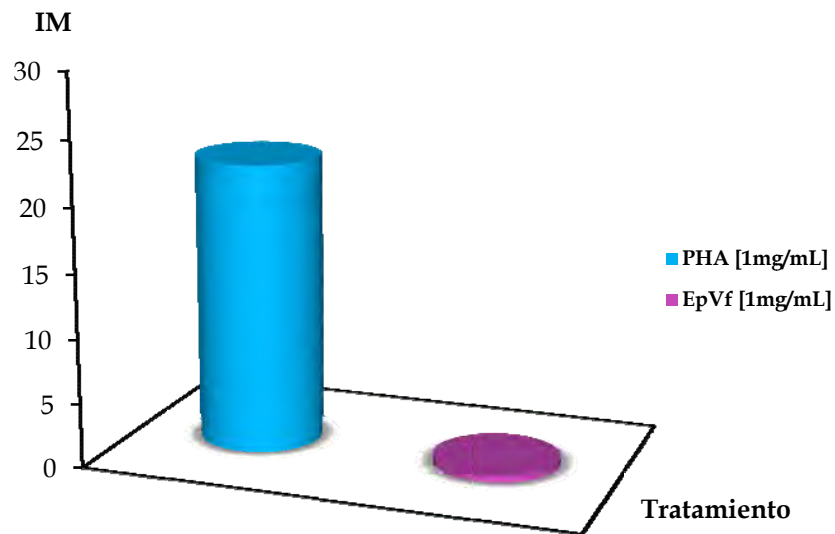


Figura 41. Índice Mitótico del ensayo Genotóxico. Se encontró que entre el EpVf y la PHA, la diferencia es muy significativa ( $P < 0.01$ , para  $n = 1000$ , cada ensayo se realizó por duplicado)

### 8.3. Resultados del Ensayo Antigenotóxico del EpVf, mediante la prueba de ICH *in vitro*

#### 8.3.1. Frecuencia de ICH

Una vez que se comprobó que el EpVf no posee efecto genotóxico alguno sobre los cultivos de linfocitos humanos, se procedió a montar un ensayo Antigenotóxico para evaluar el efecto sobre la frecuencia de ICH del EpVf, sobre los cultivos celulares empleando diferentes concentraciones: 1mg/mL, el doble (2mg/mL), y el triple de esta última (6mg/mL).

Tabla 17. Frecuencia de ICH en el ensayo Antigenotóxico, EpVf adicionado a cultivos de linfocitos, en diferentes concentraciones

TRATAMIENTO	PROM. ICH	D.E. ICH
CN	4.12	0.00
EpVf [1mg/mL]	4.00	0.23
EpVf [2mg/mL]	4.16	0.17
EpVf [6mg/mL]	3.30	0.54

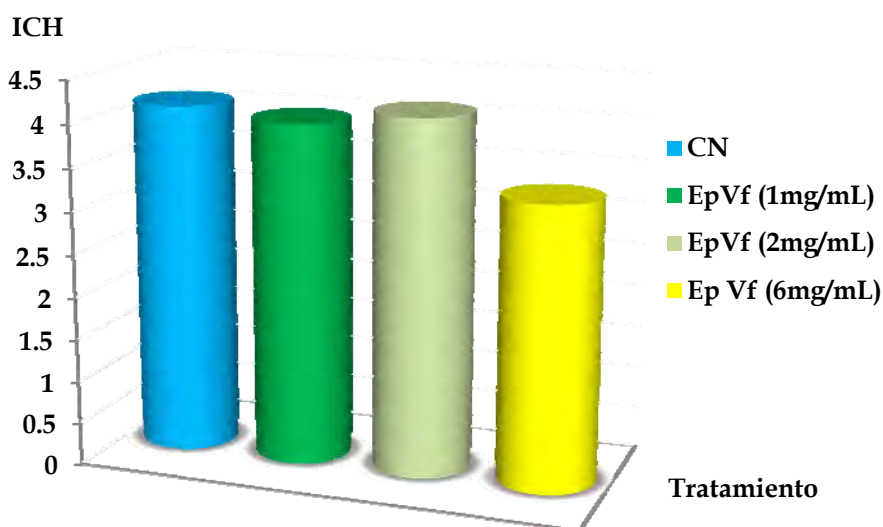


Figura 42. Frecuencia de ICH en cultivos con EpVf a diferentes concentraciones, ensayo Antigenotóxico. Se muestra el promedio de ICH encontrados en los cultivos de linfocitos humanos expuestos al EpVf a diferentes concentraciones, observándose que no existen diferencias significativas entre ellos ( $P > 0.05$ ;  $n = 25$ , cada ensayo se realizó por duplicado)

Posteriormente, el ensayo Antigenotóxico fué diseñado a fin de “retar” el EpVf con un potente agente mutagénico, la Mitomicina C (MMC), con el fin de observar si el EpVf posee la capacidad de contrarrestar el daño producido por este agente. Además, aquí también se introdujeron las diferentes concentraciones del extracto empleadas anteriormente a fin de visualizar si existe además, algún efecto en la frecuencia de ICH en relación a su concentración.

Tabla 18. Frecuencia de ICH en el ensayo Antigenotóxico, EpVf adicionado a cultivos de linfocitos, a diferentes concentraciones en combinación con MMC

TRATAMIENTO	PROM. ICH	D.E. ICH
CP (MMC)	41.13	2.02
EpVf [1mg/mL]+MMC	28.94	1.67
EpVf [2mg/mL]+MMC	26.66	0.82
EpVf [6mg/mL]+MMC	28.42	0.37

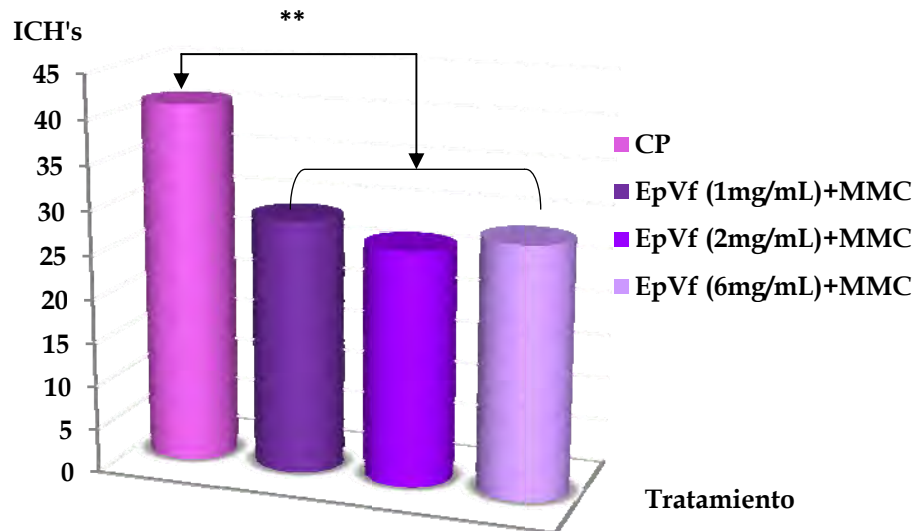


Figura 43. Frecuencia de ICH en cultivos con EpVf a diferentes concentraciones y MMC. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos a las diferentes concentraciones, pero sí se presentan diferencias altamente significativas (\*\*) entre éstos y el CP ( $P < 0.01$ ;  $n = 25$ , cada ensayo se realizó por duplicado)

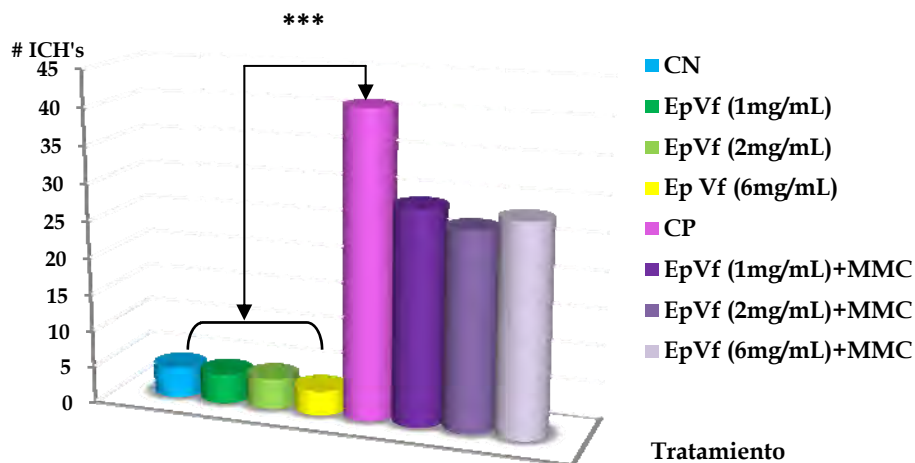


Figura 44. Comparación entre las frecuencia de ICH de los diferentes tratamientos del ensayo Antigenotóxico. Se muestran las evidentes diferencias de la frecuencia de ICH en los tratamientos del EpVf a diferentes concentraciones y los efectos de la MMC sobre la ocurrencia de los ICH. Se presenta una diferencia extremadamente (\*\*\*) significativa entre el CN y CP ( $P < 0.001$ ;  $n = 25$ , cada ensayo se realizó por duplicado)

### 8.3.2. Índice de Replicación

Este parámetro (IR), permitió observar si el EpVf ejercía diferentes efectos sobre la velocidad de la división celular en función de las diferentes concentraciones empleadas (1, 2 y 6mg/mL), y observar si se comportaba de manera similar o distinta en presencia de la MMC.

Tabla 19. IR presentado por cultivos de linfocitos humanos, expuestos a diferentes concentraciones del EpVf vs. MMC

TRATAMIENTO	PROM. IR	D.E. IR
CN	1.62	0.01
EpVf [1mg/mL]	1.53	0.04
EpVf [2mg/mL]	1.66	0.17
EpVf [6mg/mL]	1.66	0.11
CP (MMC)	1.19	0.17
EpVf [1mg/mL]+MMC	1.10	0.04
EpVf [2mg/mL]+MMC	1.26	0.09
EpVf [6mg/mL]+MMC	1.23	0.02

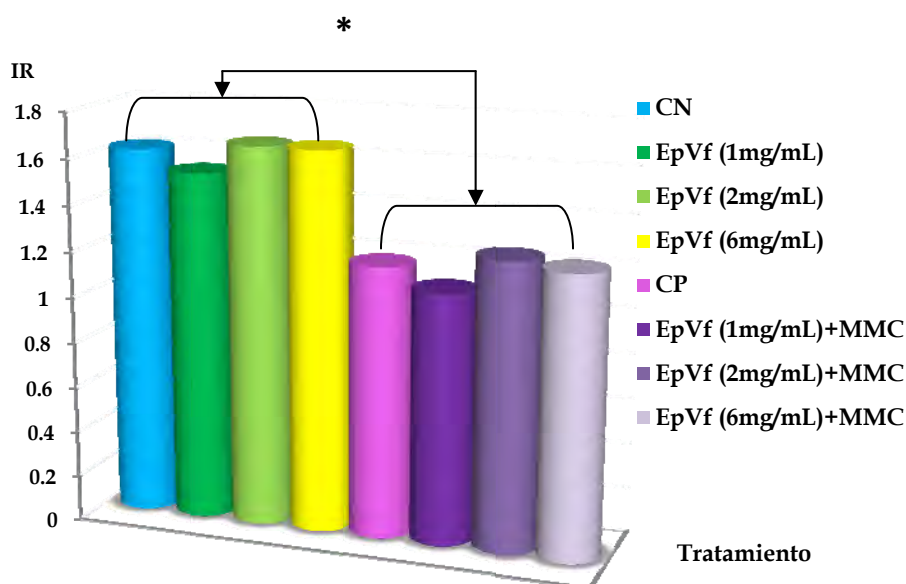


Figura 45. Índice de Replicación, ensayo Antigenotóxico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el CN y los cultivos tratados con el EpVf a las diferentes concentraciones, así como el CP y los tratamientos de EpVf a diferentes concentraciones tratados con MMC ( $P > 0.05$ ), pero si se encontraron diferencias estadísticamente significativas (\*) entre ambos grupos ( $P < 0.05$ ;  $n = 100$ , cada ensayo se realizó por duplicado)

### 8.3.3. Índice Mitótico

Para observar si el EpVf, induce algunos cambios bioquímicos, fisiológicos o genéticos sobre las células en cultivo, se analizó el índice Mitótico empleando los mismos tratamientos que en el parámetro anterior, esto con la finalidad de observar los efectos del extracto a diferentes concentraciones y su comportamiento en presencia del agente mutagénico.

Tabla 20. IM de cultivos de linfocitos humanos con EpVf a diferentes concentraciones vs. MMC

TRATAMIENTO	PROM IM	DE IM
CN	9.00	2.80
EpVf [1mg/mL]	8.25	0.35
EpVf [2mg/mL]	13.5	2.12
EpVf [6mg/mL]	20.00	0.00
CP	5.5	2.12
EpVf [1mg/mL]+MMC	11.00	0.00
EpVf [2mg/mL]+MMC	14.00	1.41
EpVf [6mg/mL]+MMC	13.00	0.00

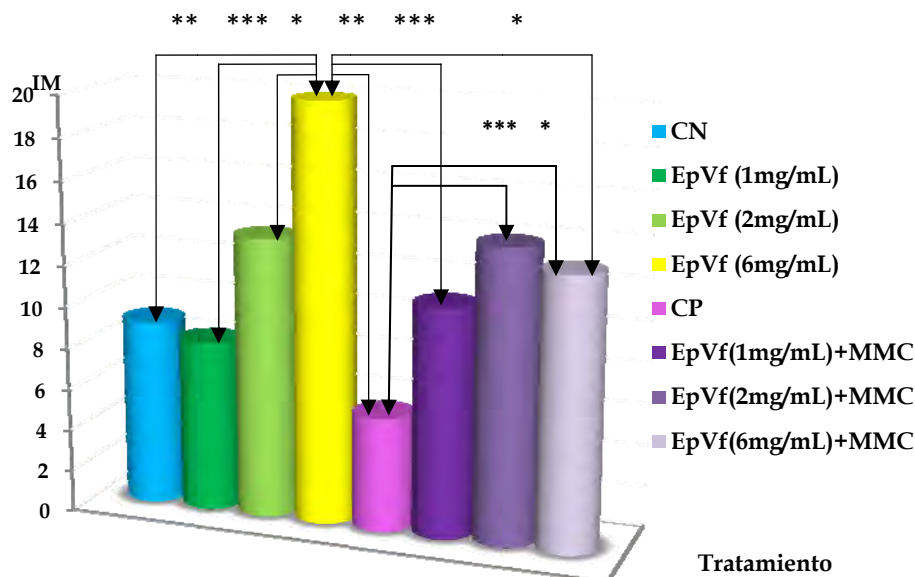


Figura 46. Índice Mitótico del ensayo Antigenotóxico. Se observa una diferencia extremadamente significativa entre la concentración del EpVf (solo) a 1 y 2 mg/mL y entre la de 6 mg/mL [ $P < 0.001$  (\*\*\*)], [ $P < 0.05$  (\*)] respectivamente], así como entre ambos controles y ésta última concentración [ $P < 0.01$  (\*\*)]. El EpVf a la concentración de 6 mg/mL, también presenta diferencias significativas entre los tratamientos a concentraciones de 1 y 6 mg/mL con MMC [ $P < 0.001$  (\*\*\*)], [ $P < 0.05$  (\*)] respectivamente), mientras que el CP muestra una diferencia estas mismas diferencias con los tratamientos de 2 y 6 mg/mL con MMC [ $P < 0.001$  (\*\*\*)], [ $P < 0.05$  (\*)] respectivamente] (n=1000, cada ensayo se realizó por duplicado)

### 8.4. Separación e Identificación de proteínas del EpVf, mediante SDS-PAGE

Para conocer los componentes presentes en el EpVf, se realizó también una Electroforesis SDS-PAGE, para separar las proteínas presentes en el extracto y realizar su identificación con base a sus PM.

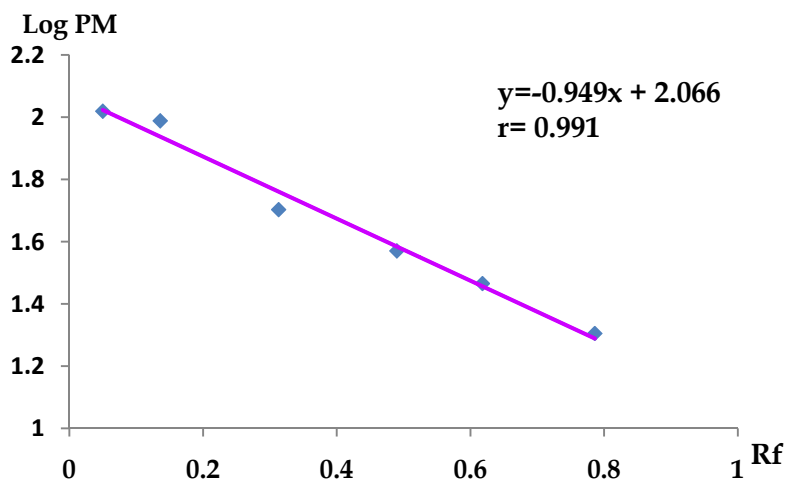


Figura 47. Regresión lineal del marcador de PM empleado, cuya  $r = 0.991$

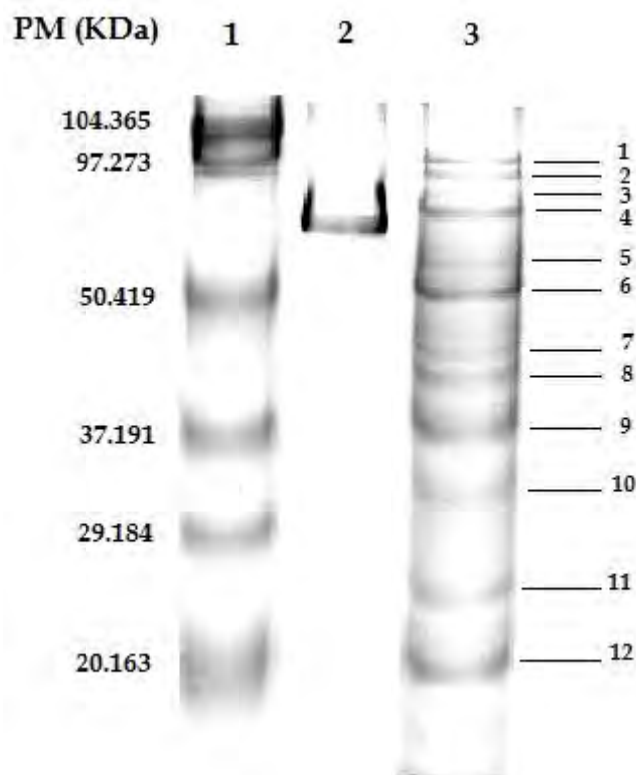


Figura 48. Patrón electroforético del EpVf. Corrimiento en gel de poliacrilamida al 10%. 1) Marcador de peso molecular, 2) albúmina sérica bovina fracción V en concentración de  $6\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Marca MBIC), y 3) EpVf en concentración de  $6\mu\text{g}/\mu\text{l}$



El corrimiento electroforético del EpVf, como puede apreciarse en la figura 48, indica un perfil proteínico que mostró 12 proteínas presentes en el extracto y cuyos PM lograron obtenerse empleando la Curva estándar; los pesos obtenidos para cada proteína se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 21. PM de las proteínas detectadas en el EpVf mediante electroforesis SDS-PAGE**

<b>Proteína (EpVf)</b>	<b>Rf</b>	<b>PM</b>
1	0.124	88.920
2	0.159	82.224
3	0.217	72.444
4	0.252	67.143
5	0.327	57.016
6	0.363	52.723
7	0.447	43.853
8	0.473	41.400
9	0.535	36.141
10	0.611	30.620
11	0.721	24.099
12	0.801	20.230
<b>Control (ALB)</b>	<b>0.261</b>	<b>65.917</b>



## 9. DISCUSIÓN

Desde hace décadas, muchos estudios se han enfocado en el desarrollo y búsqueda de sustancias con efectos anticancerígenos que sean capaces de actuar específicamente contra las células cancerígenas y no contra todas, como actúan los agentes quimioterapéuticos empleados actualmente en el tratamiento de los diversos tipos de cáncer, siendo innumerables las investigaciones que alrededor del mundo se han y están llevando a cabo respecto a este tema.

A partir de la década de los años 70, las investigaciones sobre lectinas han descubierto interesantes propiedades biológicas ya mencionadas anteriormente, sin embargo, entre las más importantes se encuentra la actividad antitumoral de las lectinas provenientes de plantas, tema de interés en este trabajo, específicamente, las lectinas provenientes de la leguminosa *Vicia faba* (Haba).

Diversos estudios *in vivo* e *in vitro*, han demostrado que las lectinas de diversas plantas, poseen actividades tanto antitumorales (por inhibición del crecimiento de tumores), como anticarcinogénicas (inhibición de la inducción de cáncer por agentes carcinógenos), de tal manera que estas mismas investigaciones demuestran que los mecanismos de acción de estas proteínas son muy variados y dependen de diferentes factores como: el origen celular, clase de tumor y concentración de estas proteínas (Jordinson et al., 1999; Gastman et al., 2004; Castillo-Villanueva, A. y Fikrat, A., 2005).

### 9.1. Extracción y cuantificación de las proteínas presentes en el EpVf

En este trabajo, la extracción de las proteínas de *Vicia faba* se realizó aprovechando las propiedades químicas de las mismas, mediante un método de disolución salina conocido como “salting in”, método ya estandarizado para la extracción de proteínas provenientes de leguminosas como la PHA. Debido a que, se ha postulado que el tipo de dieta de una persona puede influir sobre el riesgo a padecer enfermedades como cáncer, y dado que la nutrición en pacientes ya diagnosticados con esta enfermedad, juega un papel fundamental en su recuperación (Steinmetz, K. & Potter, J., 1996; Mahan, 1998; Iqbal et al., 2006), en el presente trabajo se optó por realizar un extracto de *Vicia faba*, cuyo componente principal fueron las proteínas presentes en la leguminosa, tal y como se obtendrían de la dieta. Además de que el método de extracción empleado se caracteriza por ser un método sencillo y de bajo costo.



La determinación de la concentración de proteínas presentes en el EpVf, fue determinada antes y después de realizar el proceso de Liofilización, obteniéndose una concentración de 26.4mg/mL y más del triple con 95.6 mg/mL respectivamente. Este proceso de conservación, ayudó al óptimo manejo de la muestra, permitiendo además, un incremento en la concentración proteica de la misma, para su introducción en los cultivos celulares.

Teóricamente se encuentra reportado que la cantidad de proteínas presentes en las semillas de *Vicia faba*, es de 10 g por cada 126 g de semillas de la misma, entonces, para la concentración de proteínas obtenidas experimentalmente en esta ocasión, se encontraron 15.83 g de proteína por cada 126 g de semillas. Esta diferencia, se debe, de acuerdo a lo que se ha reportado, que la cantidad de proteínas presentes en las semillas se ve influenciada por diversos factores como la temporada de recolección, factores ambientales e inclusive factores genéticos (ver sección 2.3.2.).

## 9.2. Índice Mitótico

La PHA es una lectina extraída del frijol colorado *Phaseolus vulgaris* cuyo efecto mitogénico, le ha conferido un espectro muy amplio de aplicación como un factor estimulante de la proliferación en cultivos de diferentes estirpes celulares (Buhring et al., 1999; Fukao et al., 1999; Kenan et al., 1992), incluyendo a los linfocitos humanos provenientes de sangre periférica, empleados en los ensayos de este estudio.

Dadas las similitudes entre las proteínas contenidas en el EpVf y la PHA, ésta lectina de capacidad mitogénica comprobada, fue utilizada como referencia a fin de observar si las proteínas presentes en el extracto poseían una capacidad similar, tal como se puede ver en la figura 41, obteniéndose que el EpVf en concentración de 1mg/mL mostró un promedio de IM de 0.50, mientras que el IM de la PHA a la misma concentración, presentó un promedio de 22.50, lo que demuestra una capacidad mitogénica muy superior a la inducida por el EpVf. Se ha reportado que los extractos de *Vicia faba*, pueden ser mitogénicos para los linfocitos humanos (Allen, H. & Johnson, E., 1976), algo contradictorio para los resultados obtenidos en este estudio, sin embargo se considera que la ausencia de éste efecto puede correlacionarse con la cantidad de proteínas inductoras de la mitosis y la afinidad con sus receptores, lo que podrá comprobarse en la siguiente fase del estudio.

Debido a que existen estudios que demuestran que las lectinas ejercen su efecto dependiendo de la concentración empleada (Jordinson et al., 1999; Gastman et al., 2004; Castillo-Villanueva, A. y



Fikrat, A., 2005), se realizaron ensayos en los que se expusieron los cultivos celulares a diferentes concentraciones del EpVf. Para tal fin, se introdujo el extracto en concentraciones de: 1 mg/mL, 2 mg/mL (el doble) y 6 mg/mL (el triple de ésta última), en combinación con PHA. Como puede observarse en la Figura 46, el IM no presentó diferencias estadísticamente significativas entre las dos primeras concentraciones quienes obtuvieron un promedio de 8.25 y 13.5 respectivamente, ni entre éstas y el CN (IM= 9.0), pero sí se presentó, una diferencia altamente significativas entre estos tratamientos y la concentración más alta, la cual arrojó un promedio del IM= 20.0, lo que demuestra que el incremento del IM producido por la combinación del EpVf y PHA, guarda una relación con la dosis del extracto aplicada, pues a la concentración más alta, el extracto potencializa el efecto mitogénico de la PHA a casi el doble.

Estos resultados indican entonces que, el EpVf no posee la capacidad de inducir que las células entren a mitosis en una concentración de 1 mg/mL, sin embargo, dados los resultados obtenidos por los cultivos tratados con la combinación del extracto y la PHA, se puede encontrar la relación entre la concentración y la capacidad mitogénica del extracto, por lo que resultaría interesante realizar nuevos estudios empleando el EpVf sólo, a diferentes concentraciones más altas de las empleadas en este estudio.

Como parte del ensayo Antigenotóxico además de la variación de las concentraciones del EpVf, se empleó un agente mutagénico adicionado a los cultivos celulares con la finalidad de observar el efecto que el extracto pudiese tener sobre los células que han sido expuestas a dicho agente. La Mitomicina C, es un antibiótico obtenido de *Streptomyces caespitosus*, contiene un grupo arizidina y otra quinona en su estructura, así como un anillo mitosano, los cuales son los participantes en las reacciones de alquilación del DNA. Para convertirse en un metabolito alquilante, requiere su activación mediante metabolismo reductivo (Kalant, H. y Roschlau, W., 2002). Esta reducción ocurre preferentemente en células hipóxicas y en algunos sistemas experimentales. La molécula inhibe la síntesis de DNA y los enlaces cruzados de dicho ácido en la posición N6 de la adenina, en O6 o N7 de la guanina. También ocasiona ruptura monocatenaria de DNA así como rupturas cromosómicas, por lo que es considerado un radiosensibilizante potente y ha resultado teratógeno y carcinógeno en roedores (Ortíz, 2002).

Los cultivos tratados con el EpVf y la MMC en combinación (1, 2 y 6 mg/mL+MMC), no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos sobre su IM, como puede

observarse en la Tabla 20 y Figura 46, presentando un promedio de 11.0, 14.0 y 13.0 respectivamente, pero sí lo hicieron con el CP cuyo IM fue de 5.5. Estos efectos indican que tras el daño producido en las células por el agente genotóxico que inhibe la capacidad de las células para entrar a la mitosis, el EpVf disminuye el daño ocasionado ayudando a que las células puedan entrar en división. El efecto presentado por el EpVf, puede encontrarse relacionado con la capacidad descubierta de la lectina VFA para aumentar la diferenciación morfológica y disminuir el fenotipo maligno de las células de cáncer colorectal, según estudios realizados por Jordison y colaboradores (1999).

### 9.3. Índice de Replicación

El IR del EpVf con respecto al mostrado por la PHA, no presenta diferencia alguna tal y como puede observarse en la Figura 40, en donde la Tabla 15 indica que ambos tratamientos presentaron un IR= 2.27, y un efecto similar se presentó al introducir el extracto a diferentes concentraciones (Tabla 19), en donde no se muestran diferencias entre éstas presentando un IR de 1.53 para la concentración de 1 mg/mL y 1.66 para las de 2 y 6 mg/mL, así como con el CN, dejando en claro que las proteínas presentes en el EpVf, no modifican el ciclo celular de las células tratadas, a ninguna de éstas concentraciones.

Por otro lado, los cultivos tratados con MMC y EpVf, tampoco presentaron diferencias obteniendo un promedio de 1.10, 1.26 y 1.23 para las diferentes concentración (1, 2 y 6 mg/mL respectivamente), ni con el CP cuyo IR= 1.19 (Tabla19). Sin embargo, las diferencias estadísticamente significativas, sí se mostraron entre los dos grupos, es decir, entre aquellos cultivos tratados únicamente con el EpVf sólo a diferentes concentraciones y aquellos que fueron tratados con el extracto a diferentes concentraciones más la MMC (Figura 45). Esto indica que el EpVf en este ensayo y a estas concentraciones, no induce ninguna modificación más que la producida por la MMC sobre el ciclo celular. Por otro lado, se observa que posee un efecto muy similar al ejercido por la PHA sobre el ciclo de las células, independientemente de la concentración empleada, ya que se observa un comportamiento parecido en todos los cultivos tratados con EpVf y la PHA. Esto concuerda con lo reportado por Jordison et al., en donde se observaron que los efectos de la lectina VFA, no se encuentran asociados a citotoxicidad, como tampoco se presenta en los efectos del EpVf.

### 9.4. Intercambios de Cromátidas Hermanas

El ensayo Genotóxico, proporcionó información a cerca del efecto que el EpVf pudiera tener sobre las células, específicamente si el extracto era capaz de producir daño al DNA. En esta prueba se

observó que el EpVf a una concentración de 1mg/mL presentó un promedio de ICH igual a 5.84, sin la presencia de diferencias estadísticamente significativas con el 5.61 obtenido por la PHA (ver Tabla 14 y Figura 39), indicando que, al no producir incremento en la frecuencia de ICH con respecto al CN (PHA), las proteínas presentes en el extracto no poseen un efecto genotóxico sobre los linfocitos en cultivo. Este mismo comportamiento se presentó al probar el extracto a las diferentes concentraciones, cuya frecuencia de ICH se registró entre 3.30 - 4.16 como lo muestra la Tabla 17, donde también puede observarse la similitud entre estos valores y el CN de 4.12 (Figura 42).

Contrario a esto, el CP indicó un significativo aumento en la frecuencia de los ICH con un promedio de 41.13 provocados por la MMC (Tabla 18), tal como se esperaba. Los cultivos con las diferentes concentraciones del EpVf y MMC, no presentaron diferencias significativas entre ellas (1mg/mL= 28.94, 2 mg/mL= 26.66 y 6 mg/mL= 28.42), sin embargo, se logró observar un abatimiento del efecto genotóxico producido por la MMC, por parte del extracto, mediante la disminución en el número de ICH (Tabla 18, Figura 43). Estos resultados demuestran que el EpVf tiene la capacidad de ejercer un efecto protector sobre el material genético, es decir, un efecto antígenotóxico, independientemente de la concentración empleada en este ensayo.

La prueba de ICH ha demostrado ser un método efectivo para la identificación de ciertos tipos de agentes mutagénicos capaces de producir mutaciones cromosómicas (Wilson, D & Thompson, L., 2007), que son evidenciadas en forma de intercambios entre el material genético de las dos cromátidas hermanas. Experimentalmente se ha confirmado, el relevante papel de la mutación en el desarrollo del proceso canceroso; ya que se ha encontrado una alta correlación entre la mutagénesis y la carcinogénesis, es decir, el desarrollo de un proceso canceroso (Bello, J. y López de Cerain, A., 2001). Entonces, si el EpVf posee un efecto antígenotóxico por la evidente disminución de ICH que produce en células dañadas con un agente mutagénico, por lo que podría suponerse que el EpVf posee un efecto anticarcinógeno, mismo que observó Jordison, et al. (1999) en sus estudios con la lectina VFA.

El mecanismo por el cual la lectina produce este efecto, se propone que es mediante la interacción con la molécula EpCAM (molécula de adhesión celular epitelial), una proteína transmembranal que se produce en el epitelio normal de diferentes órganos (Went et al., 2004) y que se ha encontrado sobreexpresada de 100 hasta 1000 veces más en carcinomas, considerándose ya una molécula de señalización oncogénica de las células cancerosas (Baeuerle, P. & Gires, O., 2007), en cuyos casos esta molécula se hiperglicosila. Anteriormente se consideraba exclusiva de las células de cáncer de colon,



pero posteriores estudios demostraron que se encuentra también en la mayoría de los carcinomas epiteliales humanos como: mama, cabeza, lengua, cuello e hígado, aunque ahora, se pueden considerar no solamente en este tipo de células, ya que en el presente estudio los resultados sugieren que pudiera estar presente en linfocitos humanos provenientes de sangre periférica.

Dado que la molécula EpCAM ha revelado funciones muy versátiles relacionadas con procesos de señalización, migración, proliferación y diferenciación celular (Thomas, G. & Speight, P., 2001), los efectos del EpVf, como por ejemplo sobre el IM, son indicativos de la ya mencionada interacción entre las lectinas de *Vicia faba* y esta molécula de adhesión, pues el extracto, al tener la capacidad de reclutar más células a división, puede favorecer entonces, el proceso de diferenciación celular.

Durante la diferenciación celular y la transformación maligna, la biosíntesis de las cadenas de oligosacáridos presentes en las superficies celulares, frecuentemente es alterada, lo que puede ser detectado por lectinas como las presentes en *Vicia faba* (Castillo-Villanueva, A. y Fikrat, A., 2005). Los glicoconjugados como la molécula EpCAM, mediante la cual probablemente la lectina de *Vicia faba* actúa, pueden ser claves en eventos de tumorigénesis, progresión del tumor y metástasis, de ahí que ésta, también pueda influir sobre estos fenómenos.

En concreto, estos estudios correlacionan en gran manera los efectos mostrados por el EpVf en este estudio, el cual posee las proteínas presentes en *Vicia faba*, entre ellas la lectina VFA cuya actividad ya ha sido reportada como antitumoral y anticarcinogénica, dada su interacción con la EpCAM por sus importantes efectos sobre el ciclo celular y funciones vitales de la célula.

### 9.5. Electroforesis SDS-PAGE

Debido a que el EpVf es un extracto que mayoritariamente posee las proteínas presentes en *Vicia faba*, se optó por realizar una Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, ya que es un poderoso procedimiento para el análisis de proteínas, debido a que, mediante él pueden separarse todos los tipos de éstas, incluyendo las insolubles en agua, y debido a que el método separa los polipéptidos en función a su tamaño, también proporciona información sobre el peso molecular y la composición de subunidades de cualquier complejo proteínico (Alberts et al., 2002), que se encuentren presentes en el extracto y tuviesen participación en los efectos anteriormente observados sobre los cultivos de linfocitos.



El corrimiento proteínico observado en la Figura 48, muestra las proteínas presentes en el EpVf, indicando la presencia de 12 proteínas cuyos PM varían desde los 88.920 a los 20.230 KDa, los cuales fueron determinados con ayuda de la Curva estándar realizada a partir del marcador de PM y empleando el método de mínimos cuadrados. Estudios realizados por Allen y colaboradores, reportaron en 1976 que el PM de la lectina extraída de *Vicia faba* era de aproximadamente 47 500 KDa y además que la glicoproteína consistía en aparentemente dos subunidades idénticas, sin embargo, un estudio posterior realizado por Allen, H. y Johnson, E., en el mismo año, lograron aislar la lectina mediante cromatografía de afinidad en Sephadex G-150, obteniendo que su PM era de 50 000 KDa, además de que la lectina contenía alrededor de 3% de carbohidratos y se encontraba conformada por dos diferentes subunidades cuyos PM eran de 17 300 y 14 300 KDa, pesos similares pero no idénticos como lo fue reportado por el estudio precedente.

Concordando con estos estudios, en el corrimiento electroforético obtenido del EpVf (Figura 48), se visualizó que la banda número 6, cuyo PM es de 52.723 KDa, puede corresponder a la lectina VFA cuyos efectos anticancerígenos ya han sido comprobados (Jordinson et al., 1999), por lo que muy probablemente sea ésta quien esté ejerciendo los efectos antigenotóxicos observados en los ensayos Genotóxico y Antigenotóxico. En este punto, es importante recalcar que los valores de los PM obtenidos mediante esta técnica son “aproximados”, ya que para conocer el verdadero PM se deben realizar pruebas más sofisticadas como la Espectrometría de masas o la Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Las proteínas presentes en el EpVf pudieron evidenciarse mediante la tinción con Azul de Coomasie, cumpliendo con el requisito de sensibilidad de éste método que implica hasta los 0.1 µg de proteínas para registrar una banda. Además, cabe mencionar que se considera que este mismo corrimiento electroforético indica también una extracción adecuada de las proteínas presentes en las semillas de *Vicia faba*, ya que las bandas, además de ser presentarse en un número reducido, se pueden observar definidas y sin “barridos” que pudieran indicar la presencia de compuestos contaminantes (Berg et al., 2003), como por ejemplo, derivados lipídicos.

En general, además de todos los efectos anteriormente reportados y los demostrados en este trabajo, otra importante ventaja que demuestran tener las proteínas de *Vicia faba*, en comparación con otras lectinas a las cuales también se les han adjudicado propiedades antitumorales, es que éstas no

ejercen un efecto tóxico como las demás que en algunos casos pudieran provocar efectos adversos (Castillo-Villanueva, A. y Fikrat, A., 2005).

Las leguminosas tienen un papel importante en la dieta de los humanos por su alto contenido de proteínas y dada su distribución geográfica, éstas pueden contribuir de manera significativa en la aportación de estos nutrientes a la población mundial, especialmente en los países menos desarrollados (Lawrence et al., 2006). Sin embargo, con el incremento en el consumo de alimentos enlatados y procesados, el consumo de este tipo de alimentos ha disminuido en gran proporción, fenómeno de importancia relevante dado que estudios epidemiológicos y prospectivos indican que el consumo de una dieta saludable y de origen natural (frutas, vegetales, cereales, etc.) se ha asociado a la reducción del riesgo de desarrollar tipos severos de cáncer (Steinmetz & Potter, 1996; Greenwald, et al., 2001; Surh, 2003), motivo por el cual, se está buscando la manera de exponer a la población más frecuentemente, a alimentos que posean sustancias cuyos efectos anticancerígenos se han demostrado gracias a las investigaciones que se están realizando sobre este tópico, e inclusive, que puedan aplicarse como parte de una terapia en pacientes ya diagnosticados con esta enfermedad.

Ahora las leguminosas como *Vicia faba*, han tomado un gran valor que va más allá del aspecto nutricional reconocido desde hace muchos años atrás, ya que se ha demostrado también el gran potencial que poseen para actuar directamente sobre la salud humana.



## 10. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, puede concluirse que:

- El método de extracción empleado: "salting in", resultó ser adecuado para la extracción de las proteínas presentes en las semillas de *Vicia faba*, ya que se encontró una alta concentración de proteínas, determinada mediante el método de Biuret, inclusive, en una mayor proporción a la reportada teóricamente, además, ésta concentración fue triplicada mediante el proceso de Liofilización, el cual permitió conservarlo en óptimas condiciones durante el proceso experimental y emplearlo en los cultivos de linfocitos.
- El ensayo Genotóxico indicó que el EpVf, no produce genotoxicidad alguna en ninguna de las concentraciones empleadas en este estudio (1, 2 y 6 mg/mL), pues el extracto no induce la formación de ICH.
- El EpVf tiene la capacidad de contrarrestar el daño sobre el material genético de las células ejercido por la MMC, disminuyendo la frecuencia de formación de ICH mediante la protección al DNA, por lo que se puede decir que el EpVf posee un efecto antigenotóxico.
- El EpVf en este estudio, no produce un efecto mitogénico sobre linfocitos humanos a la dosis de 1 mg/mL en comparación con la PHA. Sin embargo, en combinación con ésta, potencializa el efecto de la PHA a la dosis de 6 mg/mL, indicando una relación entre la concentración y la capacidad mitogénica.
- Los resultados del IM muestran que el EpVf contrarresta el efecto de la MMC, ayudando a las células a entrar a mitosis.
- El IR no se ve alterado en ninguna forma por la presencia del EpVf, ni del extracto solo a las diferentes concentraciones empleadas, ni éstas en presencia de la MMC, por lo tanto, se puede decir que no induce citotoxicidad.
- La Electroforesis SDS-PAGE, permitió separar las proteínas componentes del EpVf en concentración de 6 µg/µl, identificándose 12, cuyos PM van de los 88.9 a los 20.2 KDa, de las cuales, además, pudo identificarse una proteína de PM= 52.7, la cual se presume corresponde a la lectina VFA que se le ha identificado como la forma activa con efectos anticancerígenos, por lo que muy probablemente sea esta la responsable de los efectos observados durante este estudio.



## 11. REFERENCIAS

1. Alberts, B. Johnson, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K. & Walter, P. (2002). *Biología molecular de la célula*. 3ed. Ed. Omega. Barcelona, España.179-181.
2. Allen, A; Desai, N & Neuberger, A. (1976). The purification of the Glycoprotein Lectin from the Broad Bean (*Vicia faba*) and a Comparison of its Properties with Lectins of Similar Specificity. *Biochemistry Journal*. 155. 127-135.
3. Allen, H. & Johnson, E. (1976). Isolation and partial characterization of a lectin from *Vicia faba*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 444. 374-385.
4. Aub, J; Tieslau, C. & Lankester, A. (1963). Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 50: 613-619.
5. Baeuerle, P. & Gires, O. (2007). EpCam (CD326) finding its role in cancer. *British Journal of Cancer*. 96 (3). 417-423.
6. Baveja, U; Basack, S. & Thusoo, T. (1995). A study of immune profile in human hydatid diseases. *Journal Community Disceases*. 27(2). 61-66.
7. Bello, J. y López de Cerain, A. (2001). *Fundamentos de Ciencia Toxicológica*. Ed. Díaz de Santos. Madrid, España. 127-201.
8. Berg, J; Tymoczko, J. & Stryer, L. (2003). *Bioquímica*. 5ed. Ed. Reverté. Barcelona, España. 77-85.
9. Bonassi, S. & Au, W. (2002). Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutation Research*. 511. 73-86.
10. Brooker, R. (2005). *Genetics, analysis and principles*. 2 ed. Ed. McGraw-Hill. Boston. 50-52.

11. Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica y Plantas medicinales*. 2ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 15-31.
12. Brusick, D. (1980). *Principles of Genetic Toxicology*. Cap. 1 Plenum Press. New York.
13. Buhring, H; Simons, P; Pudney, M; Muller, R; Jarrossay, D. & van Agthoven, A. (1999). The monoclonal antibody 97 A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood*. 94. 2343-2356.
14. Cañigueral, S. & Vila, R. (1998). *Fitoterapia: conceptos y límites*. Fuentes de Información. En: Artech, A. *Fitoterapia: Vademécum de prescripción*. 3ed. Ed. Masson. Barcelona. 23-30.
15. Cañigueral, S. (2002). *La Fitoterapia: ¿Una terapéutica para el tercer milenio?*. *Revista de Fitoterapia*; 2 (2). 101-121.
16. Carey, J. y White, B. (2004). *Genética Médica*. 3ed. Ed ELSEVIER. Madrid, España. 228-247.
17. Casseb, J; Bernard, G; Saito, R; Brigido, L; Joaquim, E. & Duarte, A. (1995). The evaluate of the lymphocyte proliferation test with phytohemagglutinin in the immune evaluation of Brazilian HIV-infected patients. *Journal Invest Allergy and Clinical Immunology*. 5(6). 347-349.
18. Castillo-Villanueva, A. y Fikrat, A. (2005). *Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer*. *Revista de Investigación Clínica*. 57:1. 55-64.
19. Celada, A. (1996). *Factores de transcripción y control de la expresión genética*. *Investigación y Ciencia*. 179: 179-185.
20. Chandrasekhar, M; Rekhadevi, P; Sailaja, N; Rahman, M; Reddy, J; Mahboob, M; Grover, P. (2006). Evaluation of genetic damage in operating room personnel exposed to anaesthetic gases. *Mutagenesis*. 21: 249-254.



21. Chau, Ch; Cheung, P. & Wong, Y. (1997). Effects of cooking on content of amino acids and antinutrients in three Chinese indigenous legume seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 75. 447-452.
  
22. Cornet, M. (2007). Detection of genotoxicity in the marine environment: A preliminary feasibility study using primary mussel tissue culture. *Science of the Total Environment*. 382. 22-29.
  
23. Cotelle, S; Masferaud, J. & R'erard, J. (1999). Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescandia*-micronucleos assays. *Mutation Research*. 426. 167-171.
  
24. Darzynkiewicz Z. (2002). Use of flow and laser scanning cytometry to study mechaniss regulating cell cycle and controlling cell death. *Hematology Clinic North American*. 16: 339-345.
  
25. Divisi, D; Tommasso, S; Salvemini, S; Garramone, M. & Crisci, R. (2006). Diet and cancer. *Acta Biomed*. 77; 118-125.
  
26. Emmerson, K. (2006). Natural Remedies for loss of sex drive. Asociated Content. Consultado el 20 de julio del 2008, disponible en: [www.associatedcontent.com/article/44706/natural\\_remedies\\_for\\_loss\\_of\\_sexual](http://www.associatedcontent.com/article/44706/natural_remedies_for_loss_of_sexual).
  
27. Erickson, K; Dimolfetto, L; Wells R; Reidarson, T; Stott, J. & Ferrick, D. (1995). Development of an interleukin-2 receptor expression assay and its use in evaluation of cellular immune response in blottlenose dolphin *Tursiops truncates*. *Journal Wildlife Diseases*. 31(2). 142-149.
  
28. Finn, G. (2001). *Histología, sobre bases biomoleculares*. 3ed. Ed. Panamericana. Buenos Aires. 23-30.
  
29. Franks, L. & Teich, M. (1998). *Introduction to the celular and molecular biology of Cancer*. 3ed. Ed. Oxford University. USA. 458.

30. Fukao, T; Kaneko, H; Berrell, G; Gatei, M; Tashita, H. & Yoshida, T. (1999). ATM is regulates during the mitogen respose in peripheral blood mononuclear cell. *Blood*. 94. 1998-2006.
31. Garcia-Sagredo, J. (2008). Fifty years of cytogenetics: A parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1779: 363-375.
32. Gastman, B; Wahng, K; Han, J; Zhu, Z; Huang, X; Wang, G-Q; Rabinowich, H. & Gorelik, E. (2004). A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 316. 263-271.
33. Gerald C; McIntosh, M. & Holden, K. (1999). Risk for malnutrition and bone fracture inParkinsons's disease: a pilot study. *Journal of nitrition for Elderly*. 18:3. 237-240.
34. Goldstein, I; Hughes, R; Monsigny, M; Osawa, T. & Sharon, N. (1980). What should be called a lectin? *Nature*. 285: 665-666.
35. Gómez, E. y Zentella, A. (1999). Apoptosis y muerte celular programada. *BEB*. 17 (3): 105-114.
36. Greenwald, P; Clifford, C. & Milner, J. (2001). Diet and cancer prevention. *European Journal Cancer*. 37. 948-965.
37. Griffiths, A; Gelbart, W; Miller, J. y Lewontin, R. (2000). *Genética Moderna*. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 465-478.
38. Helman, J. (1981). *Farmacotécnia teórica y práctica*. Ed Continental. México. Vol 3. 969-1041.
39. Hernández, P; González, O; Rodriguez, Y. y Ganem, F. (1999). "Aplicaciones de las Lectinas". *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*; 15(2): 91-5.
40. Hernández, S. (1999). Estudio genotóxico de un derivado de la 1,4-DHP en cultivo de linfocitos humanos. Tesis de Licenciatura no publicada. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.



41. Horton, R; Moran, L; Scrimgeour, P. & Marc, R. (2008). Principios de Bioquímica. 4ed. Ed. Pearson. México. 52-124.
42. Hulten, M. (2002). Numbers, bands and recombination of human chromosomes: historical anecdotes from a Swedish student, Cytogenetic and Genome Research. 96.
43. INEGI, (2006). Principales causas de mortalidad en México. Consultado el 15 mayo del 2008, disponible en [www.inegi.com.mx](http://www.inegi.com.mx).
44. Iqbal, A; Khalil, I; Ateeq, N. & Khan, M. (2006). Nutritional quality of important food legumes. Food Chemistry. 97. 331-335.
45. Itichi, S; Yamano, Y; Asame, M. & Hall, W. (1996). A kinetic comparative study on lymphocyte responses to superantigen and phytohemagglutinin: reciprocal presentation of superantigen on surface of active lymphocytes. Cellular Immunology. 173 (2). 312-316.
46. Jordinson, M; El-Hariry, I; Calnan, D; Calam, J. & Pignatelli, M. (1999). *Vicia faba* agglutinin, the lectin present in broad beans, stimulates differentiation of undifferentiated colon cancer cells. Gut. 44. 709-714.
47. Joshina, A. (2001). "Comparación riesgo-beneficio-costo de los diferentes tratamientos quimioterapéuticos contra el cáncer". Tesis de Licenciatura. FESC, UNAM: Cuautitlán Izcalli Edo. de México. 27-35.
48. Kalant, H. y Roschlau, W. (2002). Principios de farmacología médica. 6ed. Ed. OXFORD. México. 755-770.
49. Kanaar, R; Hoeijmakers, J. & Gent, V. (1998). Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. Trends in Cell Biology. 8. 483-489.
50. Kanaya, N; Gill, B; Grover, I; Murtin, A; Osiecka, R; Sandhu, S. & Andersson, H. (1994). *Vicia faba* chromosomal aberration assay. Mutation Research. 310. 231-247.

51. Karp, G. (1998). *Biología celular y molecular, conceptos y experimentos*. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México. 546-560.
52. Kenan, R; Uknis, M; Pham, S; Spichty, K; Duquesnoy, R; Griffith, B. & Zeevi, A. (1992). Mitogen responses of lymphocytes from lung transplant recipients-correlation with rejection and infection. *Trasplantation*. 54. 241-245.
53. Kilbey, B. (1978). Mutagenicity Screening General Principles and Minimal Criteria. *Mutation Research*. 53: 361-367.
54. Kirkland, D; Henderson, L; Marzin, D; Muller, L; Parry, J; Speit, G; Tweats, D; Williams, D. (2005). Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: an appraisal of the guidelines of European Scientific Committee for Cosmetics and non-Food Products for evaluation of hair dyes. *Mutation Research*. 588: 88-105.
55. Klaassen, C. y Watkins, J. (2005). *Casarett y Doull. Fundamentos de Toxicología*. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 241-306.
56. Kleinsmith, L. & Kish, V. (1995). *Principles of cell and molecular biology*. 2ed. Ed Harper Collins College Publishers. USA. 810.
57. Klug, W; Cummings, M. y Spencer, C. (2006). *Conceptos de Genética*. 8ed. Ed. Prentice Hall. Madrid, España. 502-521.
58. Knudsen, L. & Hansen, A. (2007). Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational health. *International Journal Hygiene, Environmental Health*. 210. 461-470.
59. Kohn, E; Ruth, N; Brown, M. (2002). Abrogation of the phase S DNA damage checkpoint results in S phase progression or premature mitosis depending on the concentration of 7-hydroxystaurosporine and the kinetics of Cdc25C activation. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 2653-2664.

60. Kushi, L; Meyer, K. & Jacobs, D. (1999). Cereals, legumes and chronic disease risk reduction: evidence from epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 70; 451S-458S.
61. Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227. 680-685.
62. Lagordo, A. (2003). Consultado el 20 de julio del 2008, disponible en: <http://es.geocities.com/plantasantonio/habas.html>
63. Lahfa, F; Dahmani, Y; Trouthaud, D. & Deshaux, D. (1995). Nutritional influences on in vitro splenic lymphocyte proliferation in *Psammomys obesus* (*Rodentia gerbilliadae*). *Molecular Cell Biology Research*. 41 (5). 387-390.
64. Latt, S. & Shreck, R. (1980). Sister chromatid exchanges analysis. *Human Genetic*. 32. 297-313.
65. Lawrence, A; Arogundade, M. & Desta, S. (2006). Effect of ionic strength and/or pH on Extractability and physico-functional characterization of broad bean (*Vicia faba L.*) protein concentrate. *Food hydrocolloids*. 20. 1124-1134.
66. Lewin, B. (2000). *Genes*. 5ed. Ed. Mc Graw-Hill. Oxford. 100-102.
67. Lisiewska, Z; Kmiecik, W. & Slupski, J. (2007). Content of amino acids in raw and frozen broad beans (*Vicia faba var. major*) seeds at milk maturity stage, depending on the processing method. *Food Chemistry*. 105. 1468-1473.
68. Lomanto, L; Ortiz, O; Breton, C; Gómez, A. & Mesa, V. (2003). El ciclo celular. *MEDUNAB*. 6(16). 21-29
69. Madeiros, M; Ferrari, I; Oliveira, M; Lima, P; Cerqueira, P; Salim, A; Rosa, I. & Rodriguez, R. (2008). Genotoxic effects of White fluorescent light of human lymphocytes *in vitro*. *Mutation Research*. 652. 204-207.

70. Mahan, K. (1998). *Nutrición y Dietoterapia de Krause*. 9ed. Ed McGraw-Hill Interamericana. México. 1207.
71. Mathews, C; Holde, K. & Ahern, K. (2003). *Bioquímica*. 3ed. Ed. Addison Wesley. Madrid, España. 59-62.
72. Meisner, L; Chuprevich, T; Inhorn, S. (1987). Mechanisms of chromatid breakage in human lymphocyte cultures. *Acta Cytologica*. 21: 555-558.
73. Messina, M. (1999). Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 70; 439S-450S.
74. Molldrem, J; Liu, Y-L. y Hwu, P. (2005). La utilización del sistema inmunitario: la promesa y el potencial de la vacunas contra el cáncer. Obtenido el día 2 de diciembre del 2008, desde la dirección: <http://www2.mdanderson.org/depts/oncolg/sp/articles/05/4-apr/4-05-1.html>.
75. Montero, R; Serrano, L; Araujo, A; Davila, V; Ponce, J; Camacho, R; Morales, E; Mendez, A. (2006). Increased cytogenetic damage in operating room personnel exposed to anesthetic gases. *Mutagenesis*. 21: 335-342.
76. Mpountoukas, P; Vantarakis, A; Sivridis, E. & Lialiaris, T. (2008). Cytogenetic study in culture human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. *Food and Chemical Toxicology*. 4. 2390-2393.
77. Mustafa, A. & Ali, A. (2008). A substance in broad beans (*Vicia faba*) is protective against experimentally induced convulsions in mice. *Epilepsy and Behavior*. 12. 25-29.
78. Ohba H; Moriwaki S; Bakalova R; Yasuda, S. y Yamasaki, N. (2004). Plant-derived abrin-a induces apoptosis in cultured leukemic cell lines by different mechanism. *Toxicology Applied Pharmacology*. 195 (2); 182-193.
79. Olivares, D. 2005. *Hematología: Patologías y Pruebas Diagnósticas*. 8ed. Ed. Logoss. País S/D. 38.

80. Ortíz, E. (2002). Farmacia Hospitalaria y Comunitaria, revisión bibliográfica del tratamiento farmacológico y no farmacológico del cáncer cérvico-uterino. Tesis de Licenciatura no publicada. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
81. Ostaz, S; Bedii, A; Tatar, A; Yigiter, M; Yazgi, H; Ertek, M; Yesilyurt A; Ocak, Z. & Kursad, H. (2007). Genotoxic effect of albendazole in pediatric patients with hepatic hydatid disease. *International Journal of Infectious Diseases*. 11. 446-449.
82. Pérez, J. (2000). Protección de extractos de *Caléndula officinalis* L. del daño genotóxico inducido por el carcinógeno dietilnitrosamina en cultivos primarios de hepatocitos de rata. Tesis de Licenciatura no publicada. Facultad de estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. 1-10.
83. Perry, P & Wolf, S. (1974). New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*. 251. 156-158.
84. Pinkel, D; Thomsom, L; Gray, J. & Vanderlaan, M. (1985). Measurement of sister chromatid exchange at very low bromodeoxyuridine substitution levels using a monoclonal anti-body in Chinese hamster ovary cell. *Cancer research*. 45. 5795-5798.
85. Prakash, D; Niranjana, A; Tewari, S. & Pushpangadan, P. (2001). Underutilised legumes: Potential sources for low-cost protein. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 52. 337-341.
86. Reeke, G. & Becker, J. (2005). Three-dimensional structure of favin: saccharide Binding-cyclic permutation in leguminous lectins. *Science*. 234. 1108-1111.
87. Reuter, H. (1991). What are the possibilities and limits of therapie with European native drugs in modern clinical medicin?. *Journal of Ethnopharmacology*. 32: 187-193.
88. Roskoski, R. (1998). *Bioquímica*. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 40-54.

89. Salmanca, F. (1993). Citogenética humana. Fundamentos y aplicaciones clínicas. Ed Panamericana. México, D. F. 25-31.
90. Santos, E. & Cairns, J. (1986). El Cancer. 2ed. Ed. Prensa Científica. Barcelona. 12-25.
91. Sasaki, M. (1982). Role of chromosomal Mutation in Development of Cnacer. Cytogenetic Cell. 33. 160-168.
92. Schwarz, H; Valbracht, J; Tuckwell, J. & Kotz, M. (1995). ILA, the human 4-IBB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lines. Cancer Letters. 107 (2). 285-291.
93. Segerson, E. (1995). Immunesuppressive activity of a porcine high molecular weight uterine macromolecule is associated with transforming growth factor-beta. Journal of Reproductive Immunology. 29(1). 47-60.
94. Serap, E; Tolga, C; Nurcan, K. & Cemil, A. (2008). The evaluation of toxicity and mutagenicity of various drinking waters in the human blood lymphocytes (HULYs) *in vitro*. Food and Chemical Toxicology. 46. 2472-2475.
95. Steinmetz, K. & Potter, J. (1996). Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. Journal American Dietetic Association. 96. 1027-1039.
96. Stetka, D. & Wolff, S. (1976). Sister Chromatid Exchange Assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. I- II. *In vivo, in vitro* test for compounds requiring metabolic activation. Mutation Research. 41. 333-350.
97. Stoilov, L; Wojcik, A; Giri, A. & Obe, G. (2002). SCE formation after exposure of CHO cell prelabelled with BrdU or biotin-dUTP to various DNA-damaging agents. Mutagenesis. 17. 399-403.
98. Strachan, T. y Read, A. (2004). Genética Humana. 3ed. Ed Mc Graw-Hill. New York. 3-59, 490-508.

99. Surh, Y. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*. 3. 768-780.
100. Teijón, J; Garrido, A; Blanco, M; Villaverde, C; Mendoza, C. & Ramírez, J. (2005). *Fundamentos de Bioquímica Estructural*. Ed. Alfaomega. México. 51-116.
101. Theodorakis, C. (2001). Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. *Ecotoxicology*. 10. 245-256.
102. Thomas, G. & Speight, P. (2001). Cell adhesion molecules and oral cancer. *Critical reviews in oral biology & Medicine*. 12 (6). 479-498.
103. Tomasseti, P; Cometa, G; Del Vecchio, E. & Barsega, M. (1995). Chromosomal instability in multiple endocrine neoplasia type I. Cytogenetic evaluation with DEB test. *Cancer Genetic Cytogenetic*. 79 (2). 123-126.
104. Tucker, D; Auletta, A; Climino, M; Dearfield, K; Kram, D; Tice, R & Carrano, A. (1993). Sister-chromatid exchange: second report of the gene-Tox program. *Mutation Research*. 297. 101-180.
105. Valenzuela, L. (2008). Introducción a la apoptosis. *GenomaSur*. Consultado el 12 de septiembre del 2009. Disponible en: <http://genomasur.blogspot.com/2008/03/introduccion-la-apoptosis.html>
106. Vered Y; Grosskopk, I; Palevitch, D; Harsat, A; Charach, G; Weintraub, M. & Graff, E. (1997). The influence of *Vicia faba* (broad bean) seedlings on urinary sodium excretion. *Planta Medica*. 63. 237-240.
107. Wassom, J. (1989). Origins of genetic toxicology and the environmental mutagen society. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 14: 1-6.
108. Weiss, R. (1992). What is Phytotherapie?. *Zeitschrift Phytotherapie*. Vol. 13. 71-82.





109. Went, P; Lugli, A; Meier, S; Bundi, M; Mirlacher, M; Sauter, G. & Dirnhofer, S. (2004). Frequent EpCAM protein expression in human carcinomas. *Human Pathology*. 35. 122-128.
110. Wesley, C. (1992). *Goth, Farmacología Médica*. Ed. Mosby Division de Times Mirror de España. 832.
111. Wilson, D. & Thompson, L. (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research*. 616. 11-23.
112. Wimer, B. (1998). Immunosuppressive applications of PHA and other plant mitogens. *Cancer Biother Radiopharm*. 13. 99-107.
113. [www.answers.com/topic/vicia-faba-1](http://www.answers.com/topic/vicia-faba-1). Consultado el 25 de Julio del 2008.
114. [www.hort.purdue.edu/edu/newcrop/cropfactsheets/fababean.htmL](http://www.hort.purdue.edu/edu/newcrop/cropfactsheets/fababean.htmL). Consultado el 20 de Julio del 2008.
115. [www.infoagro.com](http://www.infoagro.com). Consultado el 25 de julio del 2008.
116. [www.nutritiondata.com/facts/vegetables-and-vegetable-products](http://www.nutritiondata.com/facts/vegetables-and-vegetable-products). Consultado el 22 de julio del 2008.
117. [www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Convenio%20MAG%2011CA/productos/haba\\_mag.pdf](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Convenio%20MAG%2011CA/productos/haba_mag.pdf). Consultado el 20 de julio del 2008.
118. Yanamoto, S; Kawasaki, G; Yoshitomi, I; Iwamoto, T; Hirata, K. & Mizuno, A. 2007. Clinicopathologic significance of EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the tongue and its possibility as a potential target for tongue cancer gene therapy. *Oral Oncology*. 43 (9). 869-877.
119. Yau, P. (2009). Apoptosis. *The Science Creative Quarterly*. Consultado el 12 de septiembre del 2004. Disponible en: [www.scq.ubc.ca/apoptosis](http://www.scq.ubc.ca/apoptosis)



## 12. ANEXO: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS

- **Solución de monómeros Acrilamida-Bisacrilamida**

1.6 g de Acrilamida

0.4 g N'-N'-Bis-metilen-acrilamida

Mezclar ambos monómeros y aforar a 50 mL. Filtrar con papel Watman No. 1 y almacenar a 4 °C protegido de la luz.

- **Buffer Tris-HCl 1.5M, pH= 8.8 (Gel separador)**

9.1 de Tris-base

Disolver en aproximadamente 30 mL de agua desionizada. Ajustar pH con HCl concentrado. Aforar a 50 mL con agua desionizada y filtrar con papel Watman No. 1, conservar en refrigeración a 4 °C.

- **Buffer Tris-HCl 0.5M, pH= 6.8 (Gel concentrador)**

3.0 g Tris-base

Disolver en aproximadamente 30 mL de agua desionizada. Posteriormente, ajustar pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 50 mL con agua desionizada y filtrar con papel Watman No. 1. Conservar en refrigeración a 4 °C.

- **SDS 10%**

1 g de SDS

Disolver en 9 mL de agua desionizada, mezclando lentamente. Aforar a 10 mL.

- **Buffer de Corrimiento**

7.5 g Tris-base

36 g de glicina

2.5 g de SDS

Diluir en 100 mL y después, aforar a 500 mL (no es necesario medir el pH). Conservar en refrigeración.



- **Buffer Muestra**

1.25 mL de Buffer pH= 6.8

1.0 mL de glicerol

0.2 g de SDS

0.2 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol

Llevar a 5 mL con agua tridestilada. Separar en alícuotas de 1 mL y congelar hasta su uso.

- **Persulfato de amonio al 10%**

50 mg de Persulfato de amonio

0.5 mL de agua tridestilada

Nota: preparar sólo la cantidad necesaria para una ocasión pues el reactivo es inestable para conservarse.

- **TEMED**

Agregar lo suficiente para preparar los geles (ver tabla)

- **Solución Stock de Azul de Coomassie**

2 g de azul de Coomassie R-250

200 mL de agua tridestilada

Disolver en agua caliente. Filtrar con papel Watman No. 1 y conservar en frascos ámbar a temperatura ambiente

- **Colorante de Trabajo Azul de Coomassie**

31.3 mL de Solución Stock de Azul de Coomassie

125 mL de metanol

25 mL de ácido acético glacial

68.7 mL de agua tridestilada

Mezclar y llevar a 250 mL, filtrar con papel Watman No. 1. Conservar en frascos ámbar a temperatura ambiente

- **Solución decolorante de Geles con Azul de Coomassie**

500 mL de metanol

100 mL de ácido acético glacial

400 mL de agua tridestilada.

