



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

“Evaluación de la citotoxicidad de lectinas de
Ruta graveolens en células de Cáncer de
mama”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

FLORES GARCÍA LAURA CECILIA

DIRECTORA DE TESIS

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

ASESOR EXTERNO

M. en C. José Luis Ventura Gallegos



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

*“Un científico debe tomarse la libertad de planear cualquier
cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir
errores”*

Julius Robert Oppenheimer

*“En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos
jugar a lo que queramos durante toda la vida”*

Lee Smolin

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Agradezco tanto la oportunidad dada por la maestra Catalina al haberme permitido formar parte de este laboratorio, por compartirme tantos conocimientos y apoyarme en la elaboración de este trabajo. Por apoyarme en este largo camino para desarrollarme como investigadora y sobre todo por brindarme su confianza y hacerme crecer como persona con cada uno de sus consejos.
- ❖ Muchas gracias profesor Ernesto por brindarme tantas palabras de aliento en momentos de debilidad y también por ayudarme en la realización de esta tesis.
- ❖ Gracias al maestro José Luis por compartirme sus conocimientos contribuyendo en mi desarrollo profesional y sin los cuales esta tesis no hubiese concluido.
- ❖ Y sobre todo muchas gracias a mis padres, por apoyarme siempre en cada una de mis decisiones, sin los cuales no sería la persona que soy.

Dedicatoria

Esta Tesis está dedicada a mi familia, a la maestra Catalina y a mis amigos porque siempre han estado conmigo. Gracias por su apoyo.

Sobre todo para ti mamá, porque siempre has estado a mi lado a pesar de todas las dificultades, gracias por darme tu amor incondicional ante cada una de mis rebeldías y por tratar cada día hacerme una mejor persona.

A ti papá, por darme las armas para siempre exigirme más y dar mi mejor esfuerzo; y apoyarme siempre.

A mis hermanas porque a pesar de las diferencias tengo la seguridad que siempre van a estar ahí cuando las necesite, por enseñarme a ser emprendedora.

A personas que ya no están, de las cuales aprendí tanto y sin las cuales no sería la persona que soy, que me acompañaron en todo mi camino para ser bióloga; ojala en donde estés te encuentres bien y sepas que siempre serás un bonito recuerdo.

Sin más doy gracias a la vida por darme la oportunidad de venir a este mundo y comprender que hay cosas que no queremos que sucedan pero hay que aceptar, cosas que no queremos saber pero que hay que aprender y personas sin las que no podemos vivir pero que es mejor dejarlas ir.

***i.* ÍNDICE**

	Pág.
<i>i.</i> Índice de Contenido	
<i>ii.</i> Índice de Figuras	
<i>iii.</i> Índice de Tablas	
<i>iv.</i> Índice de Gráficos	
<i>v.</i> Abreviaturas	
<i>vi.</i> Resumen	
I. Introducción. El Cáncer	1
II. Antecedentes	8
2.1. Anatomía de la Glándula Mamaria	8
2.2. Fisiología de la Mama	12
2.3 Cáncer de Mama	13
2.3.1. Definición del Cáncer de Mama	16
2.3.2. Signos y Síntomas	17
2.3.3. Clasificación	18
2.3.4. Factores de Riesgo	24
2.3.5. Tratamiento	27
2.4. La Etnobotánica	30
2.4.1. Metabolitos Secundarios	31
2.5. <i>Ruta graveolens</i> L.	33
2.5.1. Clasificación Científica	34
2.5.2. Descripción Fisiológica y Morfológica	35
2.5.3. Distribución	35
2.5.4. Propiedades Medicinales	35
2.5.5. Principios Activos	36
2.5.6. Acción Farmacológica	37
2.5.7. Efecto toxico de la planta	38
2.6. Lectinas Vegetales	39
2.6.1. Funciones de las Lectinas	40
2.6.2. Estructura de las Lectinas	41
2.6.3. Clasificación de Lectinas Vegetales	42
2.6.4. Efecto de las Lectinas Vegetales sobre Células Tumorales	47
III. Justificación	50
IV. Hipótesis	50
V. Objetivos	50

5.1. Objetivo General	50
5.2. Objetivos Particulares	50
VI. Material y Método	51
6.1. Extracción Salina de lectinas de ruta	51
6.2. Procesos de purificación	52
6.2.1. Diálisis	52
6.2.2. Purificación por Cromatografía de Afinidad	52
6.3. Cuantificación de proteínas	52
6.3.1. Por el método de Biuret	52
6.3.2. Por el método de Bradford	53
6.4. Cuantificación de azúcares totales	53
6.5. Pruebas de Hemaglutinación	53
6.6. Precipitación de proteínas por el método de acetona-TCA-DTT	54
6.7. Electroforesis SDS-PAGE	54
6.8. Inducción Tumorigénica en ratón con óxido de níquel	55
6.9. Extracción de linfocitos humanos y de ratón	55
6.9.1. Extracción de linfocitos en sangre periférica humana	55
6.9.2. Extracción de linfocitos en bazo de ratón CD1	55
6.8. Ensayos de citotoxicidad	56
6.8.1. En linfocitos humanos y de ratón	56
6.8.2. En células MCF-7 de cáncer de mama	56
VII. Resultados	57
7.1. Extracción Salina de Lectinas	57
7.2. Cuantificación de azúcares totales	59
7.3. Pruebas de Hemaglutinación en las distintas fracciones Proteicas	60
7.3.1. Pruebas de Hemaglutinación a diferente concentración	60
7.3.2. Pruebas de Hemaglutinación a diferentes diluciones	62
7.3.2.1. Pruebas de Hemaglutinación a concentración de 80µg	62
7.3.2.2. Pruebas de Hemaglutinación a concentración de 8µg	64
7.3.2.3. Pruebas de Hemaglutinación a concentración de 0.8µg	66
7.3.2.4. Comparación de la Actividad Hemaglutinante de Lectinas de <i>R. graveolens</i> a diferentes concentraciones	68
7.4. Electroforesis SDS-PAGE	74
7.4.1. De hoja de <i>R. graveolens</i>	74
7.4.2. De tallo de <i>R. graveolens</i>	75

7.4.3. De raíz de <i>R. graveolens</i>	76
7.4.4. DE fracciones liofilizadas de <i>R. graveolens</i>	77
7.5. Pruebas de citotoxicidad en Linfocitos	78
7.5.1. Pruebas de citotoxicidad en Linfocitos Humanos	78
7.5.2. Pruebas de citotoxicidad en Linfocitos de Ratón	79
7.5.2.1. Pruebas de citotoxicidad en Linfocitos de ratón sano	80
7.5.2.2. Pruebas de citotoxicidad en linfocitos de ratón con tumor	81
7.5.2.3. Comparación de la citotoxicidad en ratones sanos y con tumores	84
7.5.3. Pruebas de citotoxicidad en células MCF-7 de cáncer de mama	86
VIII. Discusión	87
IX. Conclusiones	95
X. Referencias	96

ii. INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1- Los tres principales tipos de cáncer a nivel mundial por sexo y región	4
Fig. 2- Tipos de cáncer que se presentan por sexo	5
Fig. 3- Desarrollo Embriológico de la glándula mamaria	8
Fig. 4- Anatomía de la mama y su conexión con músculos pectorales	9
Fig. 5- Relaciones musculares y del sistema circulatorio para la localización de la glándula mamaria	10
Fig. 6- Anatomía de la glándula mamaria humana	10
Fig. 7- Anatomía del Pezón	11
Fig. 8- Mortalidad por cáncer de mama de acuerdo a la raza y etnia	13
Fig. 9- Incidencia del cáncer de mama de acuerdo a la raza y etnia	14
Fig. 10- Evolución del Cáncer de Mama. Transformación de las células normales a la formación de tumores	16
Fig. 11- Biosíntesis de Metabolitos Secundarios	31
Fig. 12- Morfología de <i>Ruta graveolens</i>	34
Fig. 13- Estructura de lectinas de muérdago	41
Fig. 14- Representación esquemática de las estructuras tridimensionales en lectinas vegetales	44
Fig. 15- Red de señalización de muerte celular programada (PCD) por lectinas vegetales	49
Fig. 16- Electroforesis SDS-PAGE teñida con plata de extractos precipitados de hoja de <i>R. graveolens</i>	74
Fig. 17- Electroforesis SDS-PAGE teñida con plata de extractos precipitados de tallo de <i>R. graveolens</i>	75
Fig. 18- Electroforesis SDS-PAGE teñida con plata de extractos precipitados de raíz de <i>R. graveolens</i>	76
Fig. 19- Electroforesis SDS-PAGE teñida con plata de extractos liofilizados de <i>R. graveolens</i>	77
Fig. 20- Ratón CD1 con tumor en la axila producido por oxido de níquel	81
Fig. 21-Extirpación de tumor producido por oxido de níquel en ratón CD1	81
Fig. 22- Tumores extraídos de ratones tratados con oxido de níquel	82
Fig. 23- Comparación entre linfocitos de ratones sanos y ratones inducidos con oxido de níquel	82

iii. ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1- Localización y tumor asociado a GTS	2
Tabla 2- Distribución Porcentual de las defunciones por tumores malignos según sexo	6
Tabla 3- Tasa de morbilidad hospitalaria por cáncer de mama según entidad federativa	15
Tabla 4- Clasificación del cáncer de mama por sus fases de desarrollo	18
Tabla 5- Clasificación del cáncer de mama de acuerdo al tamaño del tumor, estado ganglionar y presencia de metástasis	19
Tabla 6- Clasificación del cáncer de mama de acuerdo a sus histopatología	20
Tabla 7- Clasificación del cáncer de mama por su clínica y anatomopatología	21
Tabla 8- Factores de riesgo que predisponen al cáncer de mama	26
Tabla 9- Clasificación por reconocimiento de carbohidratos	42
Tabla 10- Clasificación de lectinas vegetales por unión a carbohidratos y estructura	46
Tabla 11- Mecanismo de acción de lectinas en células cancerígenas	48
Tabla 12- Resultados de la extracción salina de lectinas de <i>R. graveolens</i>	57
Tabla 13- Comparación de la aglutinación de lectinas de <i>R. graveolens</i> a diferentes concentraciones	60
Tabla 14- Comparación de la aglutinación de lectinas de <i>R. graveolens</i> a 80µg	62
Tabla 15- Comparación de la aglutinación de lectinas de <i>R. graveolens</i> a 8µg	64
Tabla 16- Comparación de la aglutinación de lectinas de <i>R. graveolens</i> a 0.8µg	66
Tabla 17- Comparación de la aglutinación de lectinas de <i>R. graveolens</i> a diferentes disoluciones con concentración igual	69
Tabla 18- Actividad Aglutinante de las distintas fracciones proteicas de lectinas de <i>R. graveolens</i> para cada tipo sanguíneo	70

iv. INDICE DE GRAFICOS

	Pág.
Grafica 1. Concentración de Proteínas presentes en las diferentes Fracciones Proteicas de <i>R. graveolens</i> (Biuret)	58
Grafica 2. Concentración de azucares totales en las diferentes fracciones proteicas de <i>R. graveolens</i>	59
Grafica 3. Comparación de la Hemaglutinación Relacionado con la concentración	61
Grafica 4. Comparación de la Hemaglutinación de los diferentes grupos sanguíneos a 80µg	63
Grafica 5. Comparación de la Hemaglutinación de los diferentes grupos sanguíneos a 8µg	65
Grafica 6. Comparación de la Hemaglutinación de los diferentes grupos sanguíneos a 0.8µg	67
Grafico 7. Comparación de la Hemaglutinación a diferentes concentraciones	71
Grafico 8. Comparación de la Hemaglutinación de Hoja en los diferentes tipos sanguíneos a diferentes concentraciones	72
Grafico 9. Comparación de la Hemaglutinación de Tallo en los diferentes tipos sanguíneos a diferentes concentraciones	73
Grafico 10. Comparación de la Hemaglutinación de Raíz en los diferentes tipos sanguíneos a diferentes concentraciones	73
Grafico 11. Citotoxicidad de Linfocitos Humanos	78
Grafico 12. Citotoxicidad de Lectinas en Ratones sanos	80
Grafico 13. Citotoxicidad de lectinas en ratones con tumor	83
Grafico 14. Comparación de la Citotoxicidad en Linfocitos de Ratones sanos y con tumores	84
Grafica 15. Citotoxicidad de lectinas de <i>Ruta graveolens</i> en células MCF-7 de cáncer de mama	86

v. Abreviaturas

LTR	Porción Terminal Viral
GTP	Guanosín Trifosfato
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
GTS	Genes Supresores de Tumores
CLIS	Carcinoma Lobulillar <i>in situ</i>
CDIS	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
RE	Receptores de Estrógeno
RP	Receptores de Progesterona
Re α	Receptor de Estrógeno α
LH-RH	Hormona Liberadora de Hormona Luteinizante
LH	Hormona Luteinizante
FSH	Hormona Folículo Estimulante
ACTH	Hormona Adrenocorticotrópica
Re β	Receptor de Estrógeno β
E2	Estradiol 17-b
ERE	Elemento de Respuesta a Estrógeno
RCA	Lectina de <i>Ricinus communis</i>
APA	Lectina de abrina
GS-1	Lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i>
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
SBA	Lectina de <i>Glycine max</i>
WGA	Lectina de <i>Triticum vulgare</i>
TMA I	Lectina de <i>Tricholoma mongolicum</i> I
TMA II	Lectina de <i>Tricholoma mongolicum</i> II
Con A	Lectina de <i>Canavalina ensiformis</i>
PNA	Lectina de <i>Arachis hypogaea</i>
VCA	Lectina de <i>Viscum álbum</i>
VFA	Lectina de <i>Vicia faba</i>
DBA	Lectina de <i>Dolichos biflorus</i>
LCA	Lectina de <i>Lens culinaris</i>
STL	Lectina de <i>Solanum tuberosum</i>
UEA-I	Lectina de <i>Ulex europaeus</i> I
ABL	Lectina de <i>Agaricus bisporus</i>
PCD	Muerte Celular Programada Dirigida
ALL	Lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i>
LTA	Lectina de <i>Lotus tetragonolobus</i>
LPA	Lectina de <i>Limulus polyphemus</i>
CRA	Lectina relacionada con quitinasa
CV-N	Lectina N-Cyanovirina
EEA	Lectina <i>Euonymus europaeus</i>
PCL	Lectina <i>polygonatum cyrtonema</i>
JAC	Lectina de jacalina
CPL	Lectina de <i>Cucurbitaceae pholoem</i>
ML-I	Lectina de muérdago europeo

Gal	Galactosa
Glu	Glucosa
GlcNac	N-acetil glucosamina
Fru	Fructuosa
Sac	Sacarosa
Lac	Lactosa
Fuc	Fucosa
GalAcet	Galactosa Acetilada
Rib	Ribosa
Xyl	Xylosa
Man	Manosa
NANA	N-acetilgalactosamina
LacNac	N-acetil-lactosamina
RNA	Ácido Ribonucleico
DSA	Lectina de <i>Datura stramonium</i>
ABL	Lectina de <i>Agaricus bisporus</i> I
AAL	Lectina de <i>Agrocybe aegerita</i>
KML-C	Lectina de <i>Viscum álbum coloratum</i>
epCAM	Moléculas de Adhesión de la superficie
FLICE	FADD como interleucina-1 beta de la enzima convertidora
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa

vi. Resumen

Actualmente el cáncer es considerado una pandemia por el alto número de muertes reportadas con aproximadamente 7.6 millones al año, asociado a alteraciones celulares genéticas y epigenéticas lo que ocasiona la pérdida del control de las funciones normales de la célula. En México a partir del 2006 la incidencia del cáncer de mama se ha convertido en la primer causa de mortalidad en las mujeres. Con una amplia variedad de tratamientos sin embargo la poca especificidad que presentan requiere el desarrollo de terapias con mayor especificidad al reconocimiento de células cancerígenas. Dentro de estas terapias se encuentra el uso de lectinas vegetales que presentan una alta capacidad en el reconocimiento y apoptosis de células tumorales; dándole a la ruda sus características antitumorales. Las lectinas extraídas de la *R. graveolens* presentan un rendimiento neto del 1%, con una concentración del 6-12% de proteínas tipo lectina, presentan una hemaglutinación mayor en el tipo A+ dada por su afinidad a N-acetilgalactosamina y en menor grado a la galactosa. Estas proteínas presentan un peso entre 24-48 kDa, además de presentar variaciones en el reconocimiento de linfocitos dependiendo de la especie, para el caso de humanos las lectinas de raíz presentan un mayor efecto citotóxico mientras para ratón el mayor efecto citotóxico está dado por las lectinas de tallo. La actividad citotóxica de las lectinas de ruda se encuentra relacionada con la concentración ya que a concentraciones nanomolares presentan un efecto mitogénico; siendo que las lectinas que presentan un mayor efecto citotóxico en células MCF-7 de cáncer de mama son las de tallo.

I. INTRODUCCIÓN:

El Cáncer

Es desde el año 1600 a.c. que se reportan casos de cáncer, designado así por Hipócrates a partir de la palabra griega *Karkinos* que significa cangrejo (INEGI, 2009). El cáncer se define como un grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo, caracterizada por la multiplicación rápida de células anormales que pueden invadir partes adyacentes o invadir otros órganos (OMS, 2011).

El desarrollo de esta enfermedad comienza con la modificación de una sola célula, siendo resultado de la acumulación y selección de alteraciones genéticas y epigenéticas que abarca varias fases y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor (INCE.S.E., 2004); permitiendo la sobrevivencia, replicación, proliferación y evasión de mecanismos reguladores de la apoptosis (Meza *et al.* 2003).

Las células transformadas muestran variabilidad en el tamaño y en la forma de sus núcleos, así como en el número y estructura de sus cromosomas, evidenciando las pérdidas, ampliaciones y reordenamientos sufridos (Massague, 2009) generando algún error heredable en el control de la replicación y reparación del ADN dando como resultado la acumulación de mutaciones en genes que controlan directa o indirectamente procesos celulares (Moreno, 2009 y Meza *et al.* 2003).

De estos genes mutados surgen dos tipos 1) aquellos genes responsables de inducir o mantener el fenotipo maligno, denominados oncogenes y 2) genes que en su forma normal o no alterada son conocidos como proto-oncogenes; que pueden generar la oncogenicidad a distintos niveles de la célula (Meza *et al.*, 2003).

A nivel de membrana el cambio en los oncogenes genera modificaciones en los dominios proteicos para la unión de ligandos y dominios catalíticos transmembrana, lo que conlleva a una activación constitutiva del receptor en ausencia del ligando. Mientras que a nivel citoplasmático los oncogenes transductores de señales (proteín-quinasas citoplasmáticas y proteínas unidas a Guanosín Trifosfato (GTP)) generan una alteración en la función de los dominios de regulación negativa, dando como resultado la estimulación prolongada de enzimas efectoras (Meza *et al*, 2003).

Sumado a los oncogenes y los proto-oncogenes se encuentran los genes supresores de tumores (GST), que son genes capaces de suprimir el potencial tumorigénico, actuando como reguladores negativos en presencia de señalizaciones anormales (Tabla 1) (Rambaruth, 2011).

Tumor	Cromosoma involucrado	GTS
Cáncer de mama	13p14, 17p13	<i>Rb, p53</i>
Cáncer pulmonar de células pequeñas	13p14 y 17p13, 3p	<i>Rb, p53</i>
Cáncer colorrectal	5q21, 17p13, 18q21	<i>APC, MCC, p53, DCC</i>
Leucemia mieloide	1,6q, 7, 10, 19	No conocido
Carcinoma de células renales	3p, 3q	No conocido

Tabla 1. Localización y tumor asociado a GST. Tomado y modificado de Meza *et al*. 2003.

Dentro de las modificaciones estructurales sufridas por las células durante la transformación maligna se encuentran cambios asociados a los estados de glicosilación de las proteínas de superficie, afectando las interacciones celulares con otras células y la matriz extracelular, la expresión desregulada o el cambio en la localización de glicosiltransferasas y proteínas asociadas (Saeland *et al* 2011 y Fry 2011). Por tanto la glicosilación es un aspecto fundamental en procesos clave como la comunicación, la transducción de señales, el plegamiento y estabilidad de proteínas; además de estar implicada en la potenciación de la diseminación metastásica y en la modificación de la intensidad de las señales ya que es dependiente de la cantidad de un glicano detectado (Rambaruth 2011 y Fry 2011).

Esta diseminación se puede dar en diferentes estadios del tumor, lo que indica que las facultades necesarias para diseminarse e infiltrar ciertos órganos se encuentran presentes, pero sin reunir todas las condiciones necesarias para la colonización agresiva del órgano infiltrado, quedándose en un estado de latencia hasta que las células tumorales evolucionan agresivamente hasta llegar a formar metástasis clínicamente detectables. Además es posible que las células en circulación puedan reinfiltrese en los mismos tumores de los que parten, esta hipótesis establece que los tumores pueden autoenriquecerse con su progenie más agresiva, ofreciendo un mecanismo que asocia la habilidad metastásica con el crecimiento del tumor. Esta diseminación se establece en la hipótesis de *Semilla y terreno* propuesta por Paget (citado por Massagué), exponiendo que existe una compatibilidad entre las células cancerosas diseminadas (la <<semilla>>) y ciertos órganos distantes (el <<terreno>>) que presentan un microambiente tumoral, dentro de los que se encuentran pulmón, hígado, cerebro y hueso (Massagué, 2009 y Ueno *et al*, 2011).

A nivel mundial los principales tipos de cáncer encontramos:

1. Pulmonar con 1.4 millones de defunciones
2. Gástrico con 740 mil defunciones
3. Hepático con 700 mil defunciones
4. Colorrectal con 610 mil defunciones
5. Mamario 460 mil defunciones

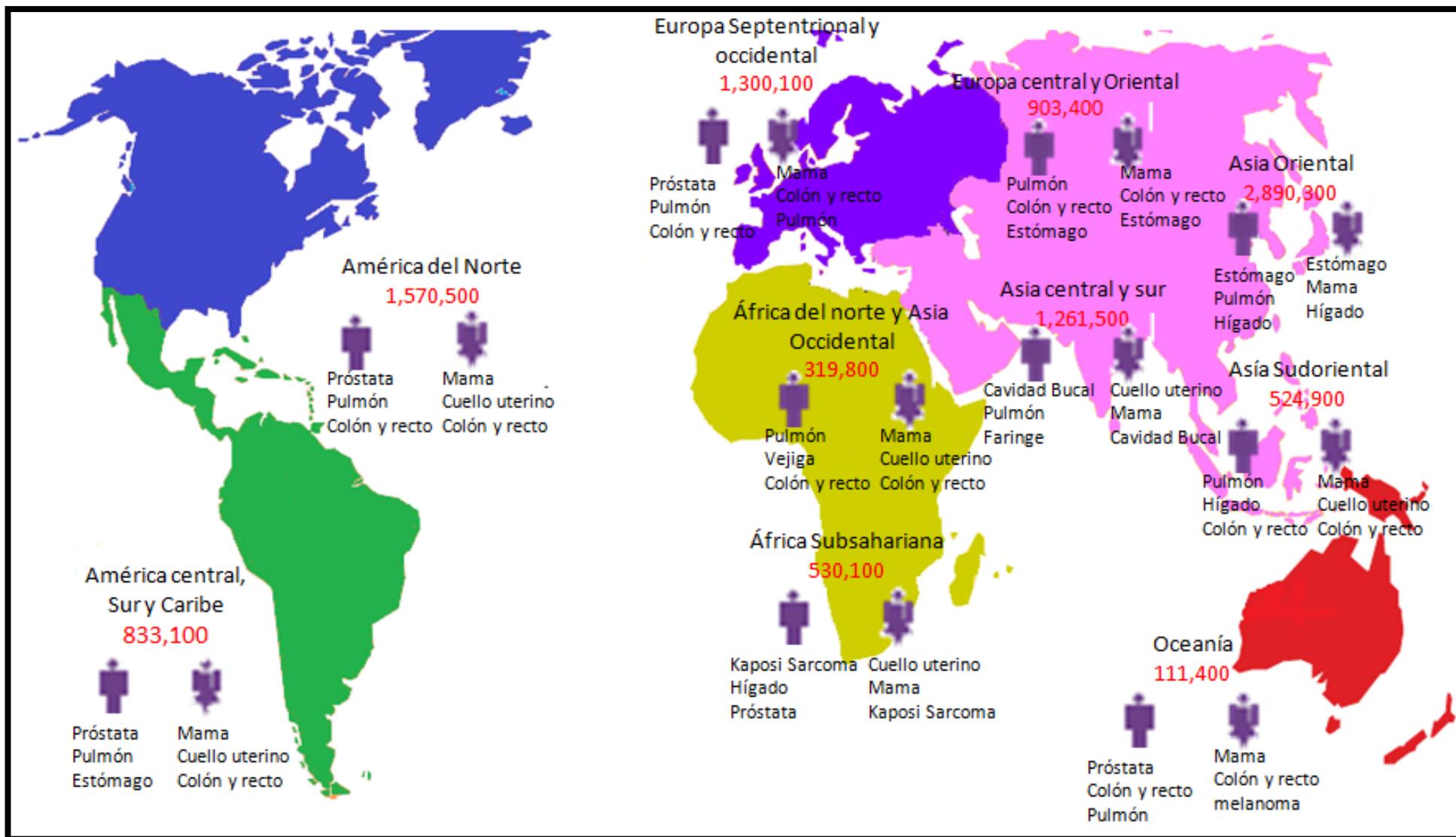


Fig.1- Los tres principales tipos de cáncer a nivel mundial por sexo y región. Modificado de OMS, 2009.

La distribución del cáncer no es homogénea en el mundo, es decir, que algunos cánceres se juzgan propios de países desarrollados como el cáncer de mama, colon y recto; otros son propios de países subdesarrollados como el de cuello uterino y gástrico (Fig. 1). Los primeros se denominan así porque comparativamente, su incidencia es mucho más alta en los países desarrollados por el inicio de su proceso de industrialización más temprana; los cánceres denominados “del subdesarrollo” se denominan así porque las tasas de mortalidad que producen son mucho más altas principalmente por fallas en el diagnóstico y falta de tratamiento oportuno (INCESE, 2004).

Para 2008 en México se registraron 66 600 defunciones por tumores malignos, representando el 13.7% del total de defunciones registradas en el país, ocupando el tercer lugar en la lista de principales causas de defunción. En varones, los tumores malignos representan la segunda causa de muerte con 29 797 siendo el 11.4% de los fallecimientos de hombres; mientras en las mujeres se tienen registrados 31 443 decesos, es decir, el 14.9% para este grupo demográfico (Fig. 2 y Tabla 2).

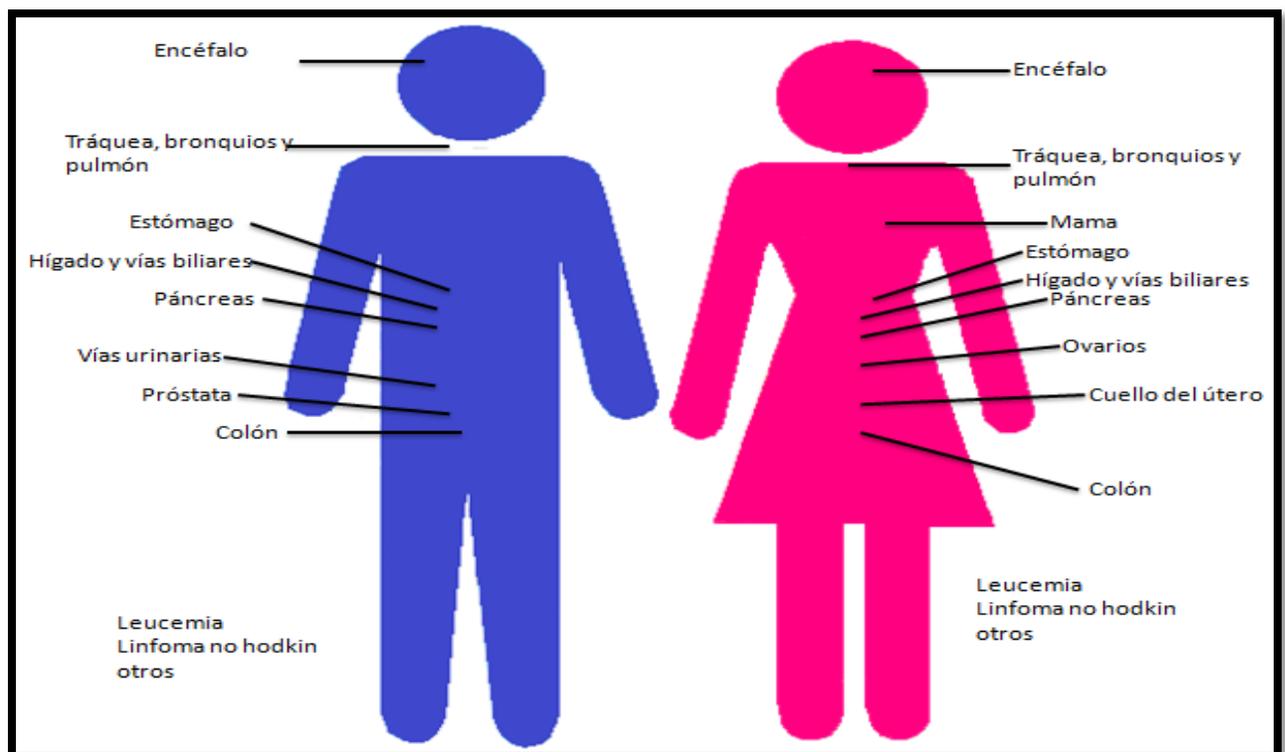


Fig.2 –Tipos de cáncer que se presentan por sexo, 2009. Modificado de INEGI 2009.

Tumores Malignos	Total	Hombres	Mujeres
Total	100.00	100.00	100.00
Hueso y de los cartílagos	2.1	2.5	1.8
Órganos respiratorios e intratorácicos	5.0	7.8	2.9
Labio, cavidad bucal y faringe	1.6	2.2	1.2
Células germinales (ovario y testículos)	6.6	5.6	7.3
Encéfalo y otras partes del sistema nervioso central	2.7	3.3	2.1
Órganos digestivos	14.8	17.5	12.6
Glándula tiroides y otras glándulas endocrinas	2.6	1.6	3.5
Ojo y anexos	0.5	0.6	.05
Melanoma y otros tumores de la piel	3.3	3.6	3.0
Tumores malignos (primarios) de sitios múltiples independientes	0.1	0,1	0.1
Vías urinarias	3.9	5.4	2.6
Órganos hematopoyéticos	17.9	22.8	14.1
Tejido linfático y afines	7.6	9.8	5.9
Mama	12.5	0.4	22.0
Órganos genitales femeninos	7.5	NA	13.5
Órganos masculinos	3.9	8.9	NA
Otros tumores	7.4	7.9	6.9

Tabla 2 – Distribución Porcentual de las defunciones por tumores malignos según sexo, 2009.

Modificado de INEGI 2009.

Lo anterior indica que en México se ha incrementado la incidencia del cáncer, además de que el mayor número de casos registrados es en mujeres, de los cuales principalmente son por cáncer de mama y cervicouterino.

El tratamiento del cáncer está determinado por su localización y el grado en el que se ha diagnosticado, dentro de los tratamientos más utilizados encontramos: cirugía, radioterapia, quimioterapia y otros tratamientos que incluyen:

- a) Terapia fotodinámica
- b) Terapia hormonal
- c) Inmunoterapia
- d) Transplante de medula ósea

Sin embargo estos métodos resultan invasivos y poco efectivos contra la enfermedad; razón por la que se han generado tratamientos alternativos a base de compuestos vegetales, tales como alcaloides, flavonoides, taninos, fenoles, entre otros. Sin embargo solo el 10% de las más de 250 mil especies de plantas han sido investigadas por sus propiedades farmacológicas. En México se estima que existen 30 mil especies vegetales de las cuales 5 mil tienen uso medicinal, de estas se han extraído sustancias antineoplásicas que actualmente forman parte del arsenal terapéutico para la medicina alopática (Cortés, 2005).

II. ANTECEDENTES:

2.1. Anatomía de la Glándula Mamaria

Embriológicamente, la mama tiene sus primeras manifestaciones como un engrosamiento a manera de banda en la epidermis, donde da forma a una línea o pliegue mamario que se extiende de la parte superior de la axila hasta la parte inferior de la ingle por ambos lados; en forma general esta línea desaparece poco después de su formación, quedando un pequeño segmento en la región torácica, que produce una pequeña introducción en el mesénquima subyacente; posteriormente se producen pequeñas invaginaciones macizas que constituirán los alvéolos de la glándula, inicialmente estos conductos galactóforos desembocan en un hundimiento epitelial, que al nacimiento se convierte en el pezón (Fig. 3) (Secretaría de Salud, 2002).

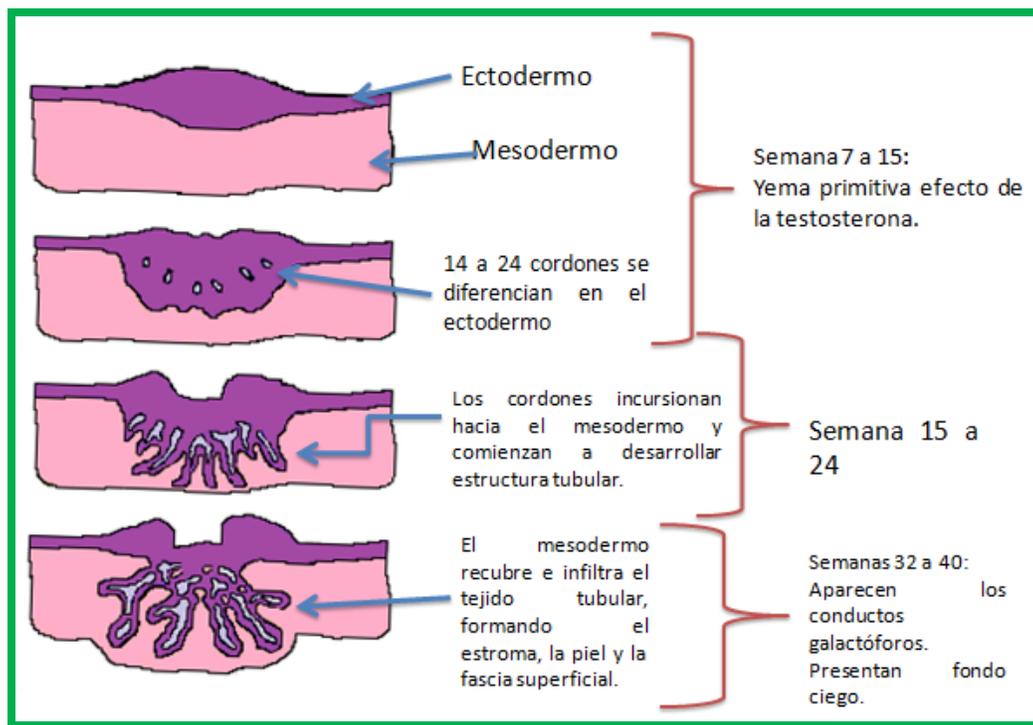


Fig. 3- Desarrollo Embriológico de la glándula mamaria.

La mama se extiende desde el borde del esternón a la línea anterior de la axila y de la primera a la sexta costilla, el resto descansa en la aponeurosis profunda que cubre el pectoral mayor, siendo que toda la mama está incluida en una aponeurosis superficial y su contorno depende de un soporte aponeurótico: algunas digitaciones de los músculos serrato mayor y oblicuo mayor en la zona superior de la vaina de los rectos mayores del abdomen (Fig. 4) (Secretaría de Salud, 2002).

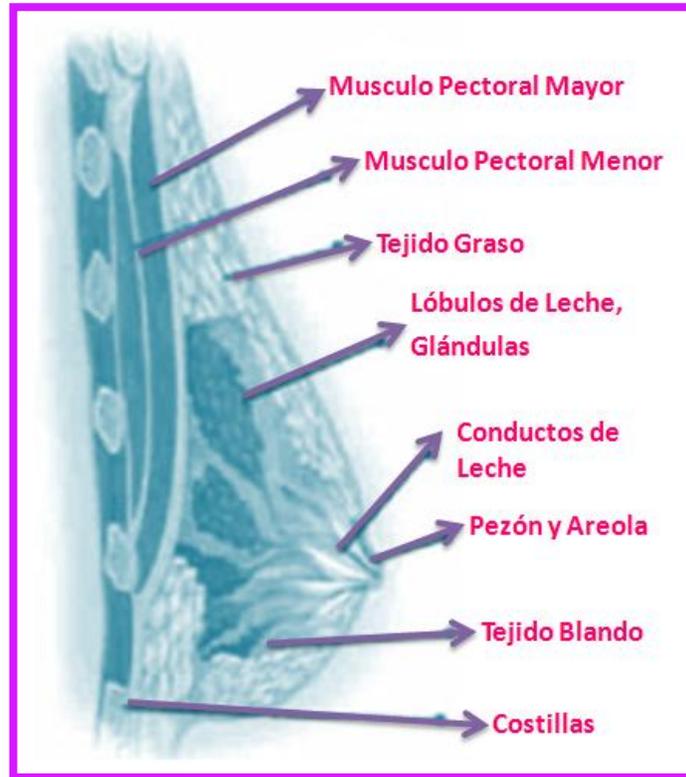


Fig. 4- Anatomía de la mama y su conexión con músculos pectorales. Tomado y Modificado de Sánchez *et al*, 2008.

El riego sanguíneo está constituido por las ramas perforantes de la arteria mamaria interna, entrando y saliendo de la mama por su cara interna, de la misma forma se sitúa la vena mamaria externa. La circulación venosa de este sitio se lleva a cabo por la vena mamaria externa o torácica externa, que desemboca en la vena axilar, muy cercana de la vena escapular inferior (Fig. 5) (Secretaría de Salud, 2002).

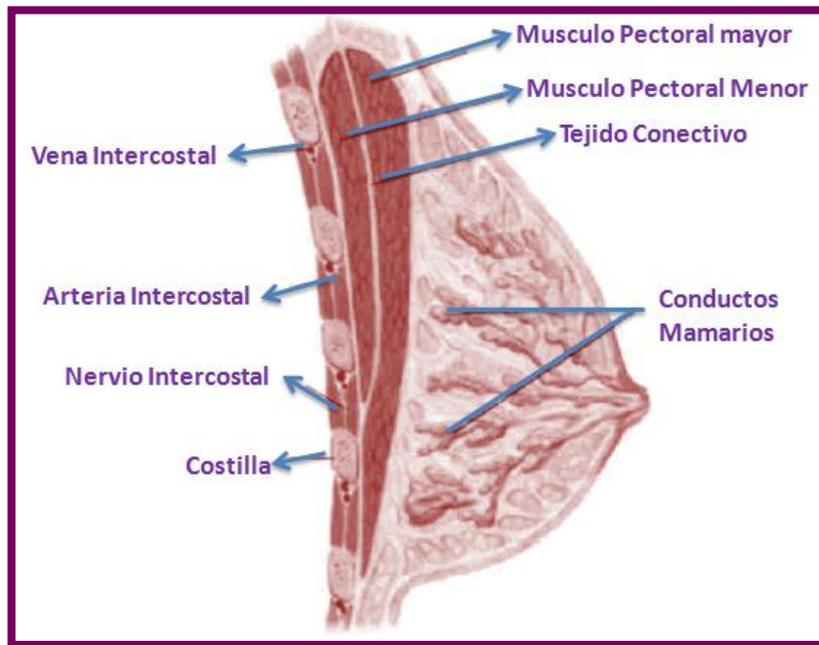


Fig. 5- Relaciones musculares y del sistema circulatorio para la localización de la glándula mamaria. Tomado y Modificado de Sánchez *et al*, 2008.

Se compone de 12 a 20 lóbulos, los cuales se dividen entre 10 a 20 lobulillos y éstos a su vez en alvéolos secretorios. Estos conductos convergen hasta un sitio debajo del pezón en forma de conductos lactíferos; presenta ligamentos que penetran desde la piel a la aponeurosis pectoral, proporcionando un armazón de bandas de tejido fibroso que sostienen a los lobulillos y lóbulos, llamados ligamentos de Cooper o suspensorios (SSa, 2002). Está constituida por tejido conectivo denso y fibras musculares lisas, en cuyo espesor se ubican los conductos galactóforos (Fig. 6) (Sánchez *et al*, 2008).

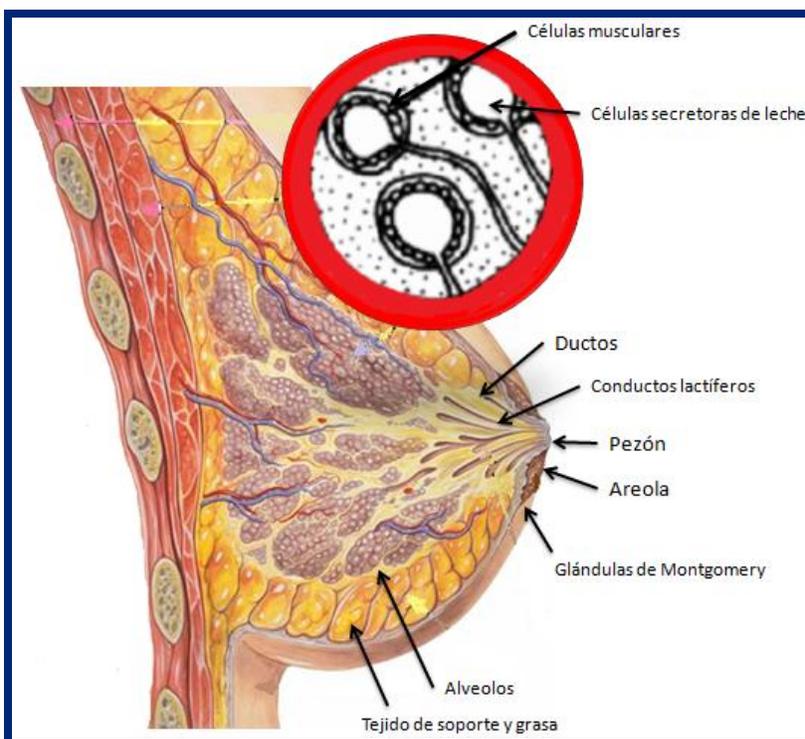


Fig. 6- Anatomía de la glándula mamaria humana. Modificado de Moreno, 2009.

El vértice de la mama está constituido por una región redondeada y pigmentada de 15 a 20mm de diámetro denominada zona areolar, que incluye al pezón y a los tubérculos de Morgagni, que son de 15 a 20 pequeñas elevaciones en la superficie de la areola que corresponden a glándulas sebáceas. El pezón se encuentra en el centro de la areola, es cilíndrico de 10 a 12mm de diámetro y sobresale de la zona areolar, éste contiene numerosas fibras musculares circulares, perpendiculares y horizontales que comprimen la desembocadura de los mismos (Fig. 7) (Moreno, 2009).

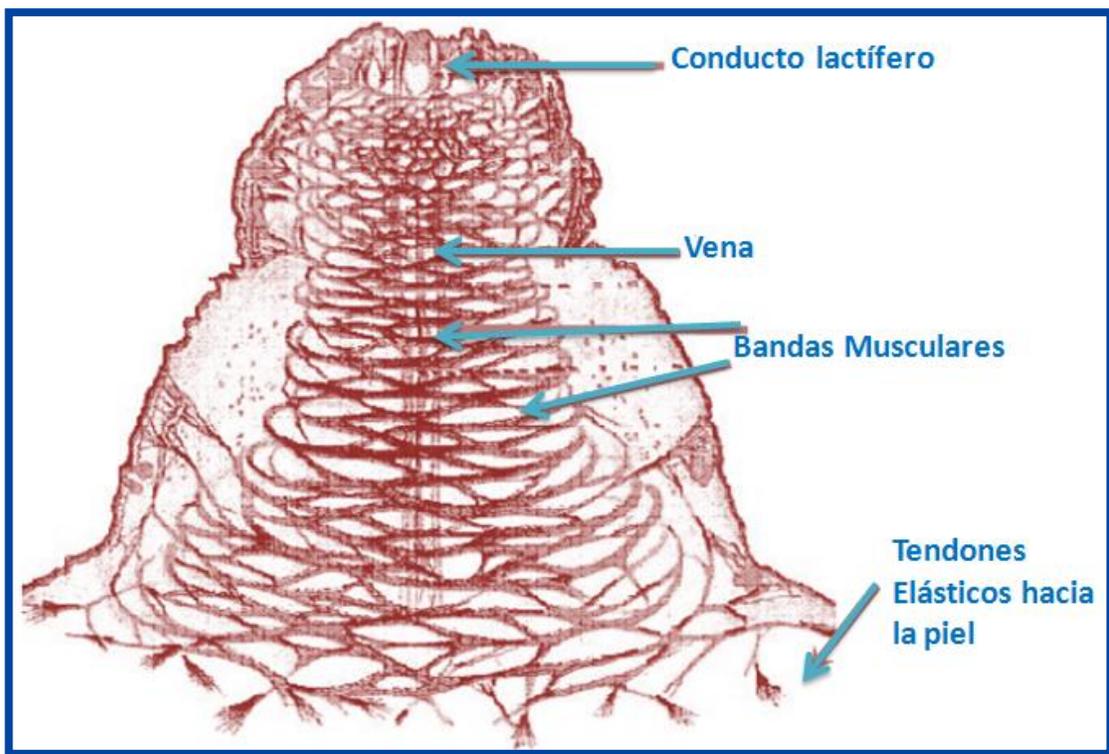


Fig. 7- Anatomía del Pezón. Modificado de Moreno, 2009.

2.2. Fisiología de la Mama

La función principal de la mama durante la gestación es prepararse para la producción de leche; la proporción adecuada de progesterona con los estrógenos y sus concentraciones absolutas son los factores que causan el desarrollo y aumento de volumen de la mama. La adenohipófisis contribuye a la preparación de la mama para la producción de leche, por medio de la liberación de sustancias que junto con los estrógenos estimulan el crecimiento de los conductos lactíferos y alveolos (Secretaría de Salud, 2002).

Principalmente se acepta que el factor más importante en el desarrollo de la mama está determinado por la función ovárica, debido a la secreción de hormonas ováricas. Aunado a la acción de las hormonas ováricas está la adenohipófisis; en donde las hormonas ováricas ejercen el efecto de mayor importancia en el desarrollo de la mama, esta función la hacen por medio de la integridad de la adenohipófisis. El desarrollo normal de la mama depende igualmente de la somatotropina y la prolactina, al igual de los cambios cíclicos que depende del mismo mecanismo que controla el ciclo menstrual (Secretaría de Salud, 2002).

2.3. Cáncer de Mama

Existe evidencia que el caso más antiguo registrado de cáncer de mama data del año 1500 a.c; además del tratamiento paliativo que se proporcionaba (INEGI, 2009). Actualmente a nivel mundial el cáncer de mama ocupa el primer lugar de muerte entre las mujeres con el 22.7% del total de los tumores femeninos. Su incidencia es del 34.9% mujeres mayores de 15 años y de 60.4% mayores de 35 años. Su tasa de mortalidad es de 12-13 mujeres, lo cual aumenta significativamente después de los 40 años, además de los cambios relacionados con la raza (Fig. 8) (Sánchez *et al*, 2008).

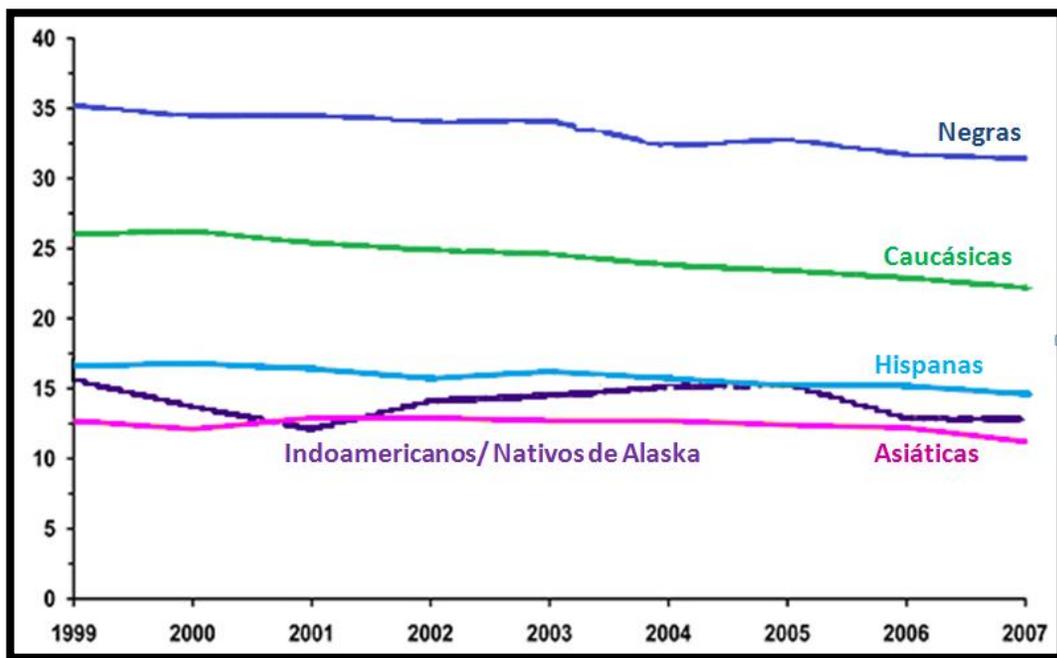


Fig.8 –Mortalidad por cáncer de mama de acuerdo a la raza y etnia. Modificado de Porter, 2009.

La incidencia del cáncer de mama es mayor en las regiones más desarrolladas del mundo, en las poblaciones urbanas, y en las mujeres caucásicas; siendo que en las regiones más desarrolladas se presenta una incidencia de 67.8% en comparación con 23.8% en las regiones menos desarrolladas, posiblemente por las diferencias sociales y étnicas, recursos de salud y los patrones de estilo de vida (Fig. 9) (Porter, 2009 y Brandan *et al*, 2006).

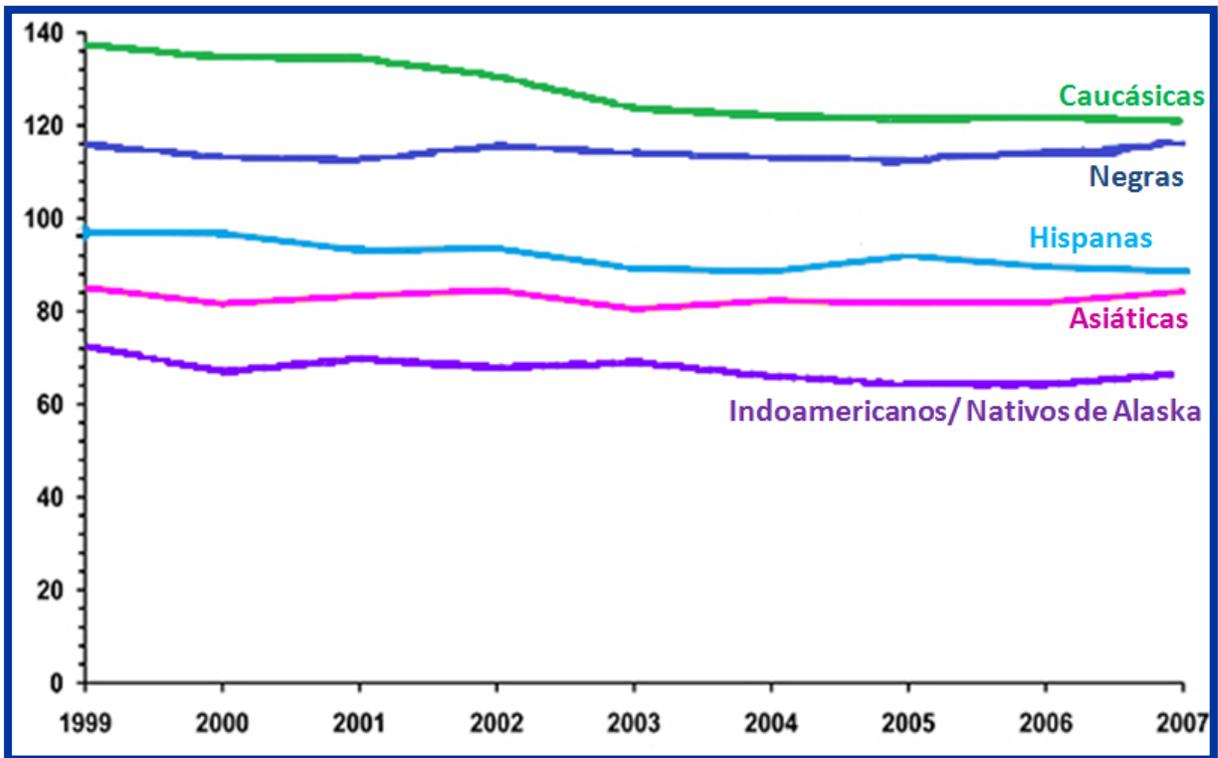


Fig.9 –Incidencia del cáncer de mama de acuerdo a la raza y etnia. Modificado de Porter, 2009.

En México a partir del 2006 este tipo de cáncer desplazó al cáncer cervico uterino, ya que representa la muerte de 27 de cada 100 mil mujeres (Moreno, 2009). Como se observa en la tabla 3, las ciudades más importantes del país son las que presentan mayores tasas de mortalidad.

Entidad Federativa	Tasa
Aguascalientes	46.15
Baja California	15.41
Baja California Sur	22.29
Campeche	5.4
Coahuila	19.06
Colima	16.47
Chiapas	3.15
Chihuahua	19.67
Distrito Federal	64.74
Durango	15.42
Guanajuato	12.15
Guerrero	4.33
Hidalgo	2.89
Jalisco	55.4
Edo. Mex.	1.75
Michoacán	9.28
Morelos	8.9
Nayarit	17.74
Nuevo León	24.64
Oaxaca	8.34
Puebla	12.65
Querétaro	13.25
Quintana Roo	6.32
San Luis Potosí	10.46
Sinaloa	21.49
Sonora	17.88
Tabasco	12.24
Tamaulipas	26.75
Tlaxcala	1.85
Veracruz	16.34
Yucatán	17.85
Zacatecas	8.62

Tabla 3. Tasa de Morbilidad Hospitalaria por cáncer de mama según entidad federativa, 2009. Tomado de INEGI, 2009

2.3.1. Definición del Cáncer de Mama

El cáncer de mama se define como la proliferación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos de la mama, debido a fallas en el balance hormonal y en la capacidad de respuesta del tejido mamario, originando una división celular descontrolada produciendo un tumor o nódulo que puede tener la capacidad de generar una metástasis (Fig. 10) (Moreno, 2009).

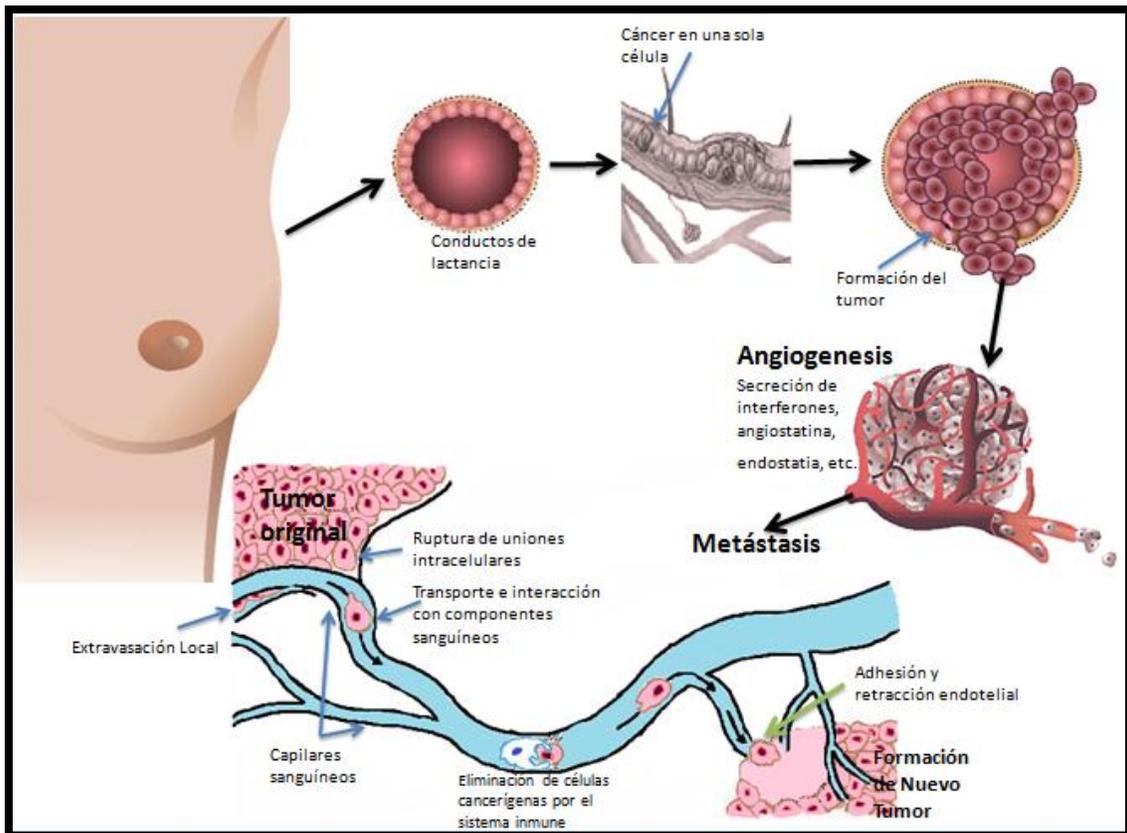


Fig. 10- Evolución del Cáncer de Mama. Transformación de las células normales a la formación de tumores. Modificado de Moreno, 2009.

Los tumores de la mama pueden manifestarse desde un desorden mamario benigno, hasta los que pasan por condiciones premalignas a microinvasión, extensión local y dispersión nodal, o bien presentar diseminación de las células cancerosas a otras partes del cuerpo como pulmón, riñón, aparato digestivo, hueso y cerebro.

2.3.2. Signos y Síntomas

El cáncer de mama se considera una enfermedad multifactorial que se inicia de forma localizada, y se manifiesta generalmente por una tumoración o dolor que puede cambiar de acuerdo a la localización y los posibles sitios de invasión. Los signos y síntomas frecuentemente reportados, además de la presencia de la tumoración y dolor, son la umbilicación del pezón, o bien está retraído o desviado, también se ha mencionado la piel naranja o retracción de la misma, enrojecimiento, ulceración o edema, salida espontánea o provocada de secreción por el pezón de sangre y aumento de la red venosa superficial, también pueden presentarse protuberancias o masas en las axilas que suelen ser indoloras, de firmes a duras y por lo general con bordes irregulares. Los síntomas de enfermedad avanzada son: dolor óseo, pérdida de peso, inflamación de un brazo y ulceración cutánea (Moreno, 2009).

Para que una masa palpable en la mama sea considerada como maligna debe de estar en relación con la edad, postmenopausia y con las siguientes características: consistencia firme, aspecto sólido, bordes irregulares, escaso desplazamiento sobre la piel, unilateral, no dolorosa y la presencia de adenopatías axilares. Sin embargo, aún en ausencia de estos factores un 10% pueden ser malignas, algunas veces una zona de engrosamiento que no llega a masa puede ser cáncer. Para el caso de la secreción por el pezón existe mayor riesgo de lesión maligna en caso de que la secreción contenga restos hemáticos y esté asociado a una masa.

2.3.3. Clasificación

Todos los tejidos de la glándula mamaria son capaces de desarrollar un tumor ya sea benigno o maligno, estos últimos pasan por las fases de inducción, promoción y progresión. Habitualmente a los tumores derivados del epitelio se les denomina carcinomas y a los del mesénquima sarcomas. Los carcinomas son tumores malignos de la mama y se dividen en carcinoma canicular, cuando se origina en los conductos mamarios y el carcinoma lobulillar que tiene su punto de partida en los lobulillos. Los sarcomas se presentan en el 1% de todos los tumores malignos de la mama, histológicamente se dividen en fibrohistiocitoma, liposarcoma, y fibrosarcoma que es el más frecuente (Moreno, 2009). Existen varias clasificaciones y estadios del cáncer de mama basados en las manifestaciones clínicas de la paciente incluyendo el tamaño del tumor y su diseminación.

De acuerdo a la fase de desarrollo del cáncer de mama se clasifica en:

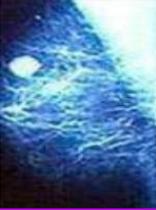
Grado	Síntomas	
Primario	<ul style="list-style-type: none"> -Confinado a los conductos, o a los lóbulos. -No puede ser detectado como un bulto o masa mediante la exploración manual. -Según el tamaño del tumor ductal puede ser detectado por mastografía. 	
Invasivo	<ul style="list-style-type: none"> -Las células malignas se dispersan de los conductos o lóbulos a otras áreas del tejido mamario. -puede ser detectado por autoexploración clínica o mastografía. 	
Metastásico	<ul style="list-style-type: none"> -El cáncer ya se ha dispersado a otras partes del cuerpo. -Detectado por autoexploración, exploración clínica o mastografía e incluso por sintomatología. 	

Tabla 4- Clasificación del cáncer de mama por sus fases de desarrollo. Modificado de Moreno 2009

Existe otra clasificación de acuerdo al tamaño, estado ganglionar y presencia de metástasis:

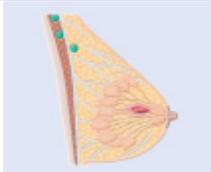
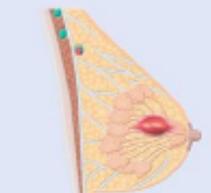
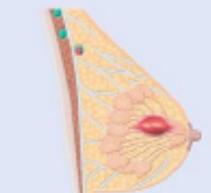
Etapa 0	El carcinoma ductal o lobular in situ, es el cáncer de mama en fase temprana que no se ha diseminado fuera del conducto o lobulillo	
Etapa I	El tumor mide 2 cm o menos y no se ha diseminado fuera de la mama	
Etapa IIA	No se encuentra en la mama pero si en los ganglios linfáticos axilares, o bien el tumor mide 2 cm o menos y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares, o bien el tumor mide 2 cm a 5 cm pero no se ha diseminado a los a los ganglios linfáticos axilares.	
Etapa IIIA	No se encuentra tumor en la mama pero se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares que están adheridos entre sí o a otras estructuras, o bien el tumor mide más de 5 cm y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares que están adheridos entre sí, o a otras estructuras.	
Etapa IIIB	El tumor se ha diseminado a los tejidos cercanos a la mama (la piel o la pared torácica, incluidas las costillas y músculos del tórax) y puede haberse diseminado a los ganglios linfáticos dentro de la zona de la mama o debajo del brazo.	
Etapa IIIC	El tumor se ha diseminado a los ganglios linfáticos debajo de la clavícula y cerca del cuello, y puede haberse diseminado a los ganglios linfáticos de la zona de la mama o debajo del brazo y a los tejidos cercanos a la mama.	
Etapa IV	El tumor se ha diseminado a otros órganos del cuerpo, con más frecuencia a los huesos, pulmones, hígado o cerebro.	

Tabla 5-Clasificación del cáncer de mama de acuerdo al tamaño del tumor, estado ganglionar y presencia de metástasis. Modificado de Moreno, 2009.

También se han clasificado por su histopatología:

Tipo de Tumoración	Incidencia en relación a la raza
<p>No infiltrante (in situ)</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Intralobulillar: proliferación dentro de los lobulillos, carcinoma lobulillar in situ (CLIS), es palpable, se descubre por biopsia, raras veces se ve en la mamografía. El CLIS, no es maligno pero indica aumento de riesgo de carcinoma infiltrante en cualquiera de las 2 mamas, 1-2% presenta cáncer cada año. ❖ Intraductal: (sólido, comedociano papilar, crinforme) proliferación dentro de los conductos, carcinoma ductal in situ (CDIS), se detecta solo mediante mamografía (>80%), hallazgo frecuente microcalcificaciones 75 a 80%. 	
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Lobulillar infiltrante ❖ Ductal infiltrante <ul style="list-style-type: none"> ○ NOS 80% de los carcinomas. ○ Formas especiales medular típico: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mucosecretante ▪ Adenoquistico ▪ Papilar ▪ Tubular ▪ Liposecretante • Secretorio ❖ Metaplásico 	

Tabla 6. Clasificación del cáncer de mama de acuerdo a su histopatología. Modificado de Elias *et al*, 2008.

Clasificación TMN: Clínica y Anatomopatológica:

TUMOR	ADENOPATIAS	METASTASIS
<ul style="list-style-type: none"> ❖ T0 tumor primario no encontrado. ❖ Tis in situ. ❖ T1= <2cm <ul style="list-style-type: none"> ○ T1mic=<0.1cm (microlesión) <ul style="list-style-type: none"> ▪ T1a >0.1 a 0.5cm ▪ T1b >0.5 a 1cm ▪ T1c >1 a 2cm ❖ T2>2 a 5cm ❖ T3 >5cm ❖ T4 <5cm <ul style="list-style-type: none"> ○ T4a Pared torácica ○ T4b edema de piel/ulceración. Nódulos cutáneos. ○ T4c ambos T4a y T4b ○ T4d carcinoma inflamatorio o enfermedad de Paget. 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ N0 sin adenopatías ❖ N1 axilares móviles. El cáncer se ha diseminado a 1-3 ganglios linfáticos axilares. ❖ N2 axilares fijas. El cáncer se ha diseminado a 4-9 ganglios linfáticos axilares o a ganglios linfáticos mamaros internos sin afectar a los ganglios axilares. <ul style="list-style-type: none"> ○ N2a: el cáncer se ha diseminado de 4-9 ganglios linfáticos axilares, existiendo al menos una infiltración de más de 2mm. ○ N2b: el cáncer se ha diseminado sólo a los ganglios linfáticos mamaros internos. ❖ N3: el cáncer se ha diseminado a 10 o más ganglios linfáticos axilares o a ganglios supraclaviculares o a ganglios mamaros internos con afectación de ganglios axilares. <ul style="list-style-type: none"> ○ N3a: el cáncer se ha diseminado a 10 o más ganglios linfáticos axilares. ○ N3b: el cáncer se ha diseminado a los ganglios mamaros y a los ganglios axilares. ○ N3c: el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos supraclaviculares. 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ M0 sin metástasis ❖ M1 con metástasis.
<ul style="list-style-type: none"> ❖ T= tamaño ❖ N= nivel de localización anatómica ❖ M= metástasis 		

Tabla 7. Clasificación del cáncer de mama por su clínica y anatomopatología. Modificado de Elias *et al*, 2008.

Otra de las clasificaciones presentes para el cáncer de mama propuesta por Zepeda *et al* (2008) se basa en el desarrollo de la expresión genética por microarreglos, dando origen a la clasificación molecular que puede considerarse más eficiente que la histopatológica como un factor predictivo de los diferentes tratamientos. Dando como resultado el uso menos frecuente y más selectivo de la quimioterapia, llevando a la ventaja de reducir la toxicidad y los costos. Con la utilización de microarreglos de cADN se puede estudiar la variación en el patrón de la expresión genética del cáncer, empleando un agrupamiento jerárquico es posible diferenciar firmas genómicas en el cáncer de mama.

A partir de esta clasificación se ha podido establecer que: los cánceres de bajo grado tienen receptores de estrógeno (RE) y receptor de progesterona (RP) positivos del cromosoma 16q; mientras que los de alto grado son negativos para RE y RP, además de presentar una sobreexpresión o amplificación de HER2 con cariotipos complejos.

En base a esta clasificación el cáncer de mama se divide en dos grupos basados en la presencia de expresión genética del RE, el cual se ha observado como el mayor factor discriminador del subtipo molecular.

- **TUMORES RECEPTOR ESTROGÉNICO POSITIVO:**

- **SUBTIPO LUMINAL:** expresan receptores hormonales y tienen un patrón que concuerda con el componente epitelial luminal de la glándula mamaria. Expresan citoqueratinas luminales 8/18. RE y genes asociados con su activación como LIV1 y CCND1. Menos del 20% de los tumores luminales tienen mutaciones en p53 y frecuentemente son de grado 1. Se ha reportado que este tipo de tumores responden poco a la quimioterapia convencional, presentando el 6% de respuesta patológica completa a quimioterapia preoperatoria.
 - **Subtipo Luminal A:** tiene alta expresión de genes relacionados con RE α y baja expresión de genes relacionados con la proliferación. Es el más frecuente y corresponde al 67% de los tumores, pueden ser tratados sólo con hormonoterapia.

- **Subtipo Luminal B:** alta expresión de genes relacionados con la proliferación celular, tienden a ser de más alto grado. Estos pueden ser tratados con quimioterapia junto con hormonoterapia.
- **TUMORES RECEPTOR ESTROGÉNICO NEGATIVO:**
 - **SUBTIPO HER2:** se refiere a un grupo de tumores RE- (baja expresión de RE y genes relacionados), se caracterizan por la sobreexpresión de otros genes dentro de ERBB2. Presentan una alta proporción de mutaciones en p53 (40 a 80%) y generalmente son de grado 3. Presentan una alta sensibilidad a la quimioterapia neoadyuvante.
 - **SUBTIPO BASAL:** denominado basal por su patrón de expresión semejante al de las células epiteliales basales y a las células mioepiteliales normales del tejido mamario. Esto como producto de la expresión de RE y genes relacionados, baja expresión de HER2, alta expresión de citoqueratinas 5, 6 y 17, y la expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Por inmunohistoquímica se denomina “triple negativo” por no expresar RE, RP ni HER2. Se ha asociado a mutaciones de BRCA1. Presentan una tendencia a ser muy agresivos, con mutaciones en p53 y de alto grado. Presentan una menor afección de ganglios linfáticos según el tamaño tumoral en comparación con otros subtipos. Histológicamente presentan necrosis central, bordes empujantes, escaso componente de carcinoma ductal in situ, infiltrado linfocitario y proliferación microvascular de tipo glomeruloide (Dogan, 2010).

2.3.4. Factores de Riesgo

No se conocen con exactitud todos los factores que pueden causar el cáncer de mama, sin embargo se han determinado algunos que se reportan con mayor frecuencia (Moreno, 2009)

- ◆ **Edad:** a mayor edad mayor riesgo, la edad promedio de aparición es de 54 años, mientras que el 45% aparece después de los 65 años (Elias *et al*, 2008). Estadísticamente en nuestro país se ha presentado un incremento importante de los cuarenta a los cuarenta y nueve años (SSa, 2002).
- ◆ **Cáncer de mama previo:** aumenta el riesgo de la aparición de cáncer de mama contralateral en 0.5 a 1% al año de seguimiento.
- ◆ **Menarquía temprana:** antes de los 12 años o tardía después de los 14 años.
- ◆ **Nuliparidad:** aumenta el riesgo después de los 50 años, o un menor número de embarazos.
- ◆ **Primera gestación tardía:** después de los 30-35 años aumenta 5 veces el riesgo (Elias *et al*, 2008). Esto debido al tiempo prolongado de exposición a los cambios hormonales; al embarazo se le atribuye un efecto protector cuando la primera gestación ocurre en una época temprana haciendo referencia respecto a que la mujer pierde el efecto protector del embarazo cuando esté se presenta después de los 30 años, adquiriendo el riesgo de la nuligesta. El primer embarazo entre los 20 y 25 años disminuye en proporción de dos a tres veces el riesgo de padecer cáncer mamario, con respecto a la mujer nuligesta y primigesta tardía, provocan un cambio permanente en los factores que causan la transformación maligna del tejido mamario (SSa, 2002).
- ◆ **Cambios fibroquísticos:** aumentan ligeramente el riesgo.
- ◆ **Aborto inducido**
- ◆ **Lesiones benignas:** fibroadenoma complejo, hiperplasia moderada florida (con atipia o sin atipia, adenosis esclerosante y papiloma).

- ◆ **Hiperplasia ductal o lobulillar atípica:** aumenta el riesgo a 4-5 veces y 10 veces si hay antecedente familiar de cáncer (de primer grado).
- ◆ **Antecedente familiar de cáncer de mama:** de primer grado, aumenta el riesgo de 2 o 4 veces, si 2 familiares tienen cáncer de mama aumenta a 5-6 veces. El 60% de los cánceres mamarios familiares ocurre antes de la menopausia contra un 25 % de los no familiares (Elias *et al*, 2008). Se sabe que el riesgo de padecer la enfermedad es de dos a tres veces, es alto cuando el cáncer mamario familiar es en la madre o hermana; mientras que en los casos bilaterales del padecimiento determinan en los descendientes una elevación de seis a nueve veces el riesgo normal, y los casos nuevos se observa en épocas más tempranas de la vida (SSa, 2002).
- ◆ **Antecedente de carcinoma de endometrio**
- ◆ **Hormonas ováricas endógenas**
- ◆ **Dieta rica en grasas y déficit de vitamina A**
- ◆ **Ingesta del alcohol:** dos unidades de alcohol/día tiene un riesgo de 8% mayor de cáncer de mama.
- ◆ **Ser portador del gen BRCA1 o BCRA2:** 5% de las mujeres con cáncer de mama confiere susceptibilidad al cáncer mamario a edades tempranas, bilateralidad y cáncer de ovario. Si un familiar de una mujer es portador del gen, tiene riesgo de presentar cáncer de mama del 50 a 85% casi siempre desarrollan cáncer antes de los 65 años. El 5% de todas las mujeres con cáncer de mama pueden tener mutaciones. La prevalencia de BRCA1 mutante está estimada que es 1/800 en la población general. Estudios recientes han demostrado que la mutación en un gen llamado BARD1 al combinarse con el gen BRCA1 incrementa el riesgo hasta en un 80% (Elias *et al*, 2008). Las mutaciones en estos oncogenes tienen susceptibilidad entre el 5 y 7% convierte al cáncer de mama hereditario en forma autosómica dominante (SSa, 2002).
- ◆ **Presencia de la proteína Her-2-Neu:** es utilizado como marcador de ganglios afectados por problemas de metástasis, presentándose un

aumento en su frecuencia en relación con la población general en personas que presentan un antecedente de haber padecido cáncer (SSa, 2002).

- ◆ **Uso de anticonceptivos orales:** aumenta ligeramente el riesgo de 5 casos por cada 100 000 mujeres, con un mayor riesgo en mujeres que los emplean antes de los 20 años.
- ◆ **Terapia hormonal con estrógenos y/o progesterona:** después de la menopausia por 3 años aumenta ligeramente el riesgo, el uso prolongado a 7-8 casos por cada 10 000 mujeres por cada año de uso.
- ◆ **Exposición a radioterapia antes de los 30 años**
- ◆ **Obesidad:** se asocia con mayor riesgo de cáncer de mama, endometrio, ovario y vejiga.
- ◆ **Ingesta de tabaco**
- ◆ **Dieta occidental**
- ◆ **Vida sedentaria**
- ◆ **Raza:** las mujeres euro-americanas presentan 5 a 7 veces mayor probabilidad que las mujeres japonesas.
- ◆ **Menopausia después de los 52 años:** se adquiere un riesgo doble de padecer cáncer mamario debido al mayor tiempo de exposición a los estrógenos y progestágenos (SSa, 2002).

Factor	Riesgo	Grupo de alto riesgo
Edad	>10	Edades mayores
Localización geográfica	5	Países desarrollados
Edad de la menarca	3	Menarca antes de los 12 años
Edad de la menopausia	2	Menopausia después de 52 años
Edad del primer embarazo a termino	3	Primer hijo después de los 35 años
Historia familiar	≥2	Cáncer de mama antes de la menopausia en familiar de primer grado
Antecedentes de enfermedades benignas	4-5	Hiperplasia atípica
Cáncer en la otra mama	>4	
Grupo socio-económico	2	Grupos I y II (altos)
Dieta	1.5	Alta ingesta de grasas saturadas
Peso corporal		
Premenopáusica	0.7	Índice de masa corporal >35
Postmenopáusica	2	Índice de masa corporal >35
Consumo de alcohol	1.3	Ingesta excesiva
Exposición a radiación ionizante	3	Exposición anormal en mujeres adolescentes
Ingesta de hormonas:		
Contraceptivos orales	1.24	Uso frecuente
Terapia hormonal de reemplazo	1.35	Uso por más de 10 años
Diethylstilbestrol	2	Uso durante el embarazo

Tabla 8. Factores de riesgo que predisponen al cáncer de mama. Modificado de Brandan y Villaseñor, 2006.

2.3.5. Tratamiento

El tratamiento del cáncer de mama puede ser desde un tratamiento local, regional y sistémico con cirugía, radioterapia, hormonoterapia y quimioterapia; lo que depende del tamaño y ubicación del tumor, si se ha diseminado y el estado de salud general del paciente.

Moreno (2009) propone que la terapia inicial para la enfermedad en su estado temprano va dirigida principalmente a eliminar cualquier tumor visible, por lo tanto, los médicos recomiendan cirugía para extirpar el tumor con o sin radioterapia. El siguiente paso en el control y tratamiento de la enfermedad en su estadio temprano, es reducir el riesgo de recurrencia de la enfermedad y eliminar las células cancerosas que pudieran quedar. Si el tumor mide un tamaño determinado o si hay compromiso de los ganglios linfáticos, el médico podrá recomendar terapia adicional como radioterapia, quimioterapia o terapia hormonal. Si el cáncer vuelve a aparecer, la paciente podrá elegir cirugía adicional dependiendo del lugar en que se encuentre el cáncer o una variedad de tratamientos diseñados para combatir las metástasis distantes.

- ❖ **Tratamiento Neoadyuvante:** la quimioterapia preoperatoria (neoadyuvante) es una opción adecuada en mujeres con tumores en estadios IIA y IIB que reúnen criterios para realizar una cirugía conservadora de la mama.
- ❖ **Tratamiento Quirúrgico:** no es útil en estadios avanzados.
 - **Mastectomía simple modificada:** mastectomía simple más resección de los ganglios linfáticos.
 - **Cirugía conservadora de la mama (nodulectomía):** resección amplia, mastectomía parcial o cuadrantectomía, y la lindenectomía del primero y segundo nivel de la axila más radioterapia cuando la lesión es menos de 2.5cm y características histológicas favorables.

- ❖ **Radioterapia:** durante 5-6 semanas tras la cirugía conservadora, o bien en casos de afectación de la pared torácica o axilar masiva, ha demostrado una reducción del 30% del riesgo de recurrencia.
- ❖ **Tratamiento sistémico complementario o tratamiento adyuvante:** se entiende por tratamiento sistémico adyuvante la administración de quimioterapia o terapia endocrina después de la cirugía primaria, con el objetivo de eliminar la posible existencia de enfermedad residual microscópica y disminuir el riesgo de reincidencia local o diseminación a distancia.
- ❖ **Quimioterapia:** reduce la posibilidad de muerte anual en mujeres premenopáusicas del 25-35% y en posmenopáusicas de 9-19%, la quimioterapia combinada es más eficaz. Los fármacos citotóxicos más eficaces para el tratamiento del cáncer de mama metastásicos son: capecitabina, doxorubicina, gemcitabina, taxanos paclitaxel y docetaxel, y vinorelbina.
- ❖ **Hormonoterapia:**
 - **Bloqueadores de receptores de estrógenos y progesterona:** incluye el tamoxifeno y toremifen, el tratamiento por 5 años reduce la posibilidad de muerte anual en un 25% en mujeres pre y posmenopáusicas; aunque el tamoxifeno incrementa el riesgo de cáncer de endometrio 1% en mujeres posmenopáusicas.
 - **Inhibidores de la aromatasa:** bloquean la producción periférica de estrógenos en mujeres posmenopáusicas, esto después de 5 años de tratamiento con tamoxifeno. Los fármacos que bloquean los receptores de estrógenos y progesterona son útiles para tratar tumores, 2 a 3 pacientes posmenopáusicas presentar tumores receptor estrogénico positivo, mientras en las premenopáusicas es menor.
- ❖ **Bifosfonatos:** se deben utilizar en combinación con el tratamiento sistémico en las pacientes con metástasis óseas, se ha demostrado que disminuye en un 30% la tasa de eventos óseos, reportando beneficios

después de 3 a 6 meses, siempre y cuando se inicie el tratamiento precozmente (Elias *et al*, 2008).

A partir de la elección de la terapia sistémica el cáncer de mama puede ser clasificado en tres categorías de riesgo establecidas en el consenso de Saint Gallen en 2005:

- Categoría de Bajo Riesgo: pacientes mayores de 35 años con axila negativa, tamaño tumoral menor de 2 cm, grado histológico 1, ausencia de invasión vascular y linfática, y HER2/neu ni amplificado ni sobreexpresado.
- Categoría de Riesgo Intermedio: pacientes con axila negativa y al menos uno de los siguientes criterios: tamaño tumoral mayor de 2 cm, grado histológico 2-3, presencia de invasión vascular y linfática, y gen HER2/neu sobreexpresado o amplificado o bien aquellas pacientes con axila positiva con uno a tres ganglios involucrados y el gen HER2/neu negativo.
- Categoría de Alto Riesgo: pacientes con axila positiva, uno a tres ganglios involucrados y gen HER2/neu sobreexpresado o amplificado, o axila positiva con cuatro o más ganglios (Cabral *et al*. 2005).

Es una patología en la cual no es suficiente el diagnóstico y tratamiento, ya que existe una supervivencia de 5, 10 y 15 años, debido a que la enfermedad se encuentra latente, por lo que debe realizarse un seguimiento a la paciente y así evitar y diagnosticar oportunamente reincidencias locales, cáncer contralateral y metástasis ocultas (Elias *et al*, 2008).

Debido a la problemática en que los tratamientos existentes son poco específicos e invasivos se requiere el desarrollo de nuevas terapias más eficaces que ataquen de forma más directa a las células cancerígenas, lo que lleva a la investigación de medicina alternativa basada en principios activos de las plantas.

2.4. La Etnobotánica

Se define a la etnobotánica como el estudio de las bases biológicas, ecológicas y culturales de las interacciones y relaciones entre las plantas y el hombre a lo largo del tiempo de evolución y el espacio sociogeográfico (Cortés, 2005).'

De las 250 mil especies vegetales el hombre utiliza del 35 al 50%; en México se estima que existen 30 mil especies de las cuales 5 mil tienen un uso medicinal, de estas varias han sido utilizadas para el tratamiento del cáncer, práctica que ha sido empleada desde la antigüedad hasta la actualidad. Para comprobar las propiedades antitumorales de especies vegetales se realizan pruebas *in vitro* en las que las líneas celulares tumorales son expuestas a extractos y sustancias obtenidas de los tejidos vegetales para determinar su citotoxicidad. De estas investigaciones se han aislado sustancias antineoplásicas que actualmente tienen un papel importante en los tratamientos de la medicina alopática. Esta acción antineoplásica está dada a partir de metabolitos secundarios (Cortés, 2005).

2.4.1. Metabolitos Secundarios

Los metabolitos secundarios son sustancias orgánicas de peso molecular inferior a 2000 unidades de masa atómica, estos compuestos se encuentran en las plantas (Cortés, 2005) los cuales no presentan una función directa en procesos importantes del metabolismo de la planta (Ávalos y Pérez, 2009). Son el producto de un metabolismo específico, originados a partir de un metabolismo intermediario (Fig. 11), de distribución restringida, con una función metabólica específica y se encuentran almacenados en el interior de las vacuolas (Arango, 2010).

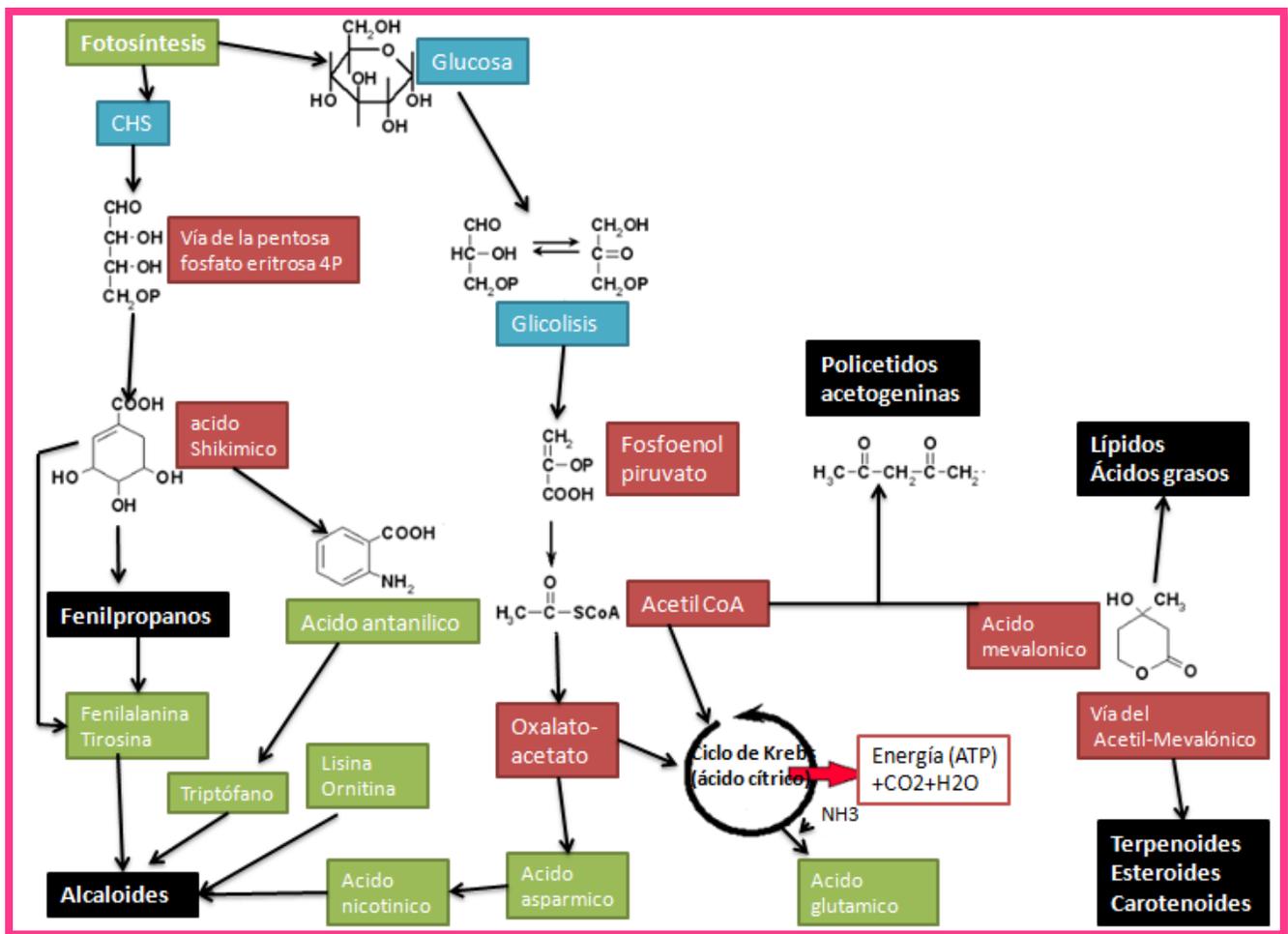


Fig-11. Biosíntesis de Metabolitos secundarios. Modificado de Cortés,

Estos compuestos son agrupados en tres grupos principales: compuestos fenólicos (taninos, fitoestrógenos y cumarinas); compuestos nitrogenados: (alcaloides, glicósidos cianogénicos, glucosinolatos, aminoácidos tóxicos, lectinas e inhibidores de las proteasas); terpenos (lactonas sesquiterpénicas, glicósidos cardíacos, saponinas) e hidrocarburos poliacetilénicos y oxalatos (Cortés, 2005).

A partir del uso medicinal que se le ha dado a las plantas es importante continuar con la investigación sobre esta rama, dado que solo se ha estudiado aproximadamente el 15% de toda la diversidad vegetal, un ejemplo de esto es la ruda, que de acuerdo a los usos medicinales presenta características viables para la eliminación del cáncer.

2.5. *Ruta graveolens* L.

El género *Ruta* comprende alrededor de 60 especies; etimológicamente *Ruta* deriva del griego *ruomai*, que significa refrenar, en alusión a la supuesta acción afrodisiaca (Álvarez *et al* 2006).

Las especies de este género se conocen comúnmente como “ruda”, y la *Ruta graveolens* L. es una antigua planta medicinal nativa del Sur de Europa que fue introducida en América tras la conquista española, la cual es frecuentemente utilizada por sus propiedades medicinales. El término “graveolens” hace referencia a una de sus características principales, “de olor fuerte y desagradable” (Hernández, 2011).

Innumerables civilizaciones han sido adoradoras de la ruda. Los romanos por ejemplo, eran fieles adoradores de esta hierba, los chinos también le adjudicaron características benéficas, para los magos celtas la ruda era una verdadera defensa contra hechizos y trabajos maléficos; e igualmente ese carácter sagrado tuvo para los egipcios, hebreos y caldeos (Hernández, 2011).

2.5.1. Clasificación Científica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae

Subfamilia: Rutoideae

Género: *Ruta*

Especie:

Ruta graveolens L.



Fig. 12- Morfología de *Ruta graveolens*.

2.5.2. Descripción Fisiológica y Morfológica

Es un arbusto muy ramificado que puede vivir varios años, debido a esta longevidad el tallo puede volverse leñoso. Alcanza alturas de entre 70 a 100 cm. Las hojas semi-perennes, de color verde glauco, son alternas compuestas por varios segmentos de los cuales los laterales son alargados y el terminal ovalado o blanquecino, de consistencia algo carnosa. Las flores, forman ramilletes y tienen entre cuatro y cinco pétalos, de un color amarillo vivo. El fruto es una especie de cápsula con cinco lóbulos. La planta entera tiene un aroma característico difícil de confundir con otros. El sabor de las hojas es ligeramente picante pero éste queda enmascarado por el intenso aroma que despiden (Hernández, 2011).

2.5.3. Distribución

Es de origen Europeo y vive en climas cálido, semicálido, semiseco, templado y regiones tropicales. Es cultivada en casas habitación y está asociada a la selva tropical caducifolia, subcaducifolia, perennifolia, matorral xerófilo, bosques de encino y mixto de pino (Muñoz *et al*, 2001).

2.5.4. Propiedades Medicinales

Es una planta muy utilizada en la medicina tradicional debido a sus propiedades curativas como antiespasmódica, antihelmíntica, antimicrobiana, menstruante, oftálmica y rubefaciente (enrojecimiento de la piel). Aplicada en infusión, gracias a la acción de la rutina, tiene una acción fortalecedora de los capilares sanguíneos, regula los ciclos menstruales y reduce las hemorragias; restriñe el vientre; alivia los retortijones del vientre, dolor de costado y pecho, la tos, inflamaciones pulmonares, la ciática, dolores articulares. Presenta propiedades curativas para amenorrea; en caso de inapetencia y dispepsia; insolación, trastornos circulatorios, arterioesclerosis, neuralgias, cefaleas, nerviosismo, histeria; debilidad visual; fiebre, reumatismo, inflamaciones, espasmos y trastornos de la diuresis; refuerza las membranas que rodean a los huesos (Hernández, 2011).

2.5.5. Principios Activos

Todas las partes de la planta contienen los principios activos, aunque la mayor concentración está en las hojas, especialmente antes de la floración.

Sus principales compuestos activos incluyen aceites volátiles, cumarina, glucósido amarillo, alcaloides, rutina, aceite esencial con salicilato de metilo, limoneno, pineno, tanino y vitamina C; además de la presencia de lectinas. Las hojas y yemas jóvenes contienen alcaloides, flavonoides, fenoles, aminoácidos, fucomarinas y saponinas (Hernández, 2011).

Los principales activos de la planta son:

- a) Los glucósidos, como la rutina.
- b) Alcaloides (quinilonas): coquisagenine y skimmianine graveoline
- c) Furocoumarinas (psoralenos): bergaptene (3-metoxipsoraleno) y xantotoxina (8-metoxipsoraleno)
- d) Aceites esenciales: metil-nonil-cetona, metil-n-octil-cetona y heptil-metil-cetona
- e) Alcoholes: metil-etil-carbinol-pineno. Limenenes
- f) Otros compuestos: dictamina, gammafagarina, pteleina y kokusagina.

Los principios activos de importancia clínica son los psoraleno, responsables de la hepatotoxicidad y la fotosensibilización, y metil-nonil-cetona que tiene efectos sobre el útero.

2.5.6. Acción Farmacológica

Se ha demostrado que en los extractos con cloroformo de la raíz, tallo y hoja de ruda muestran significativamente actividad anti-fertilidad en ratas cuando se administra intragastricamente en los días 1-10 post coito (Kong *et al*, 1989).

Algunos estudios sugieren un efecto negativo de la ruda sobre el desarrollo pre y post-implantacional en ratones debido a la presencia de alcaloides de la familia de los acridones (Benavides *et al*, 2000).

Estudios en ratones albinos adultos han demostrado que la ruda proporciona un efecto protector contra daños clastogénicos inducidos por radiación X. La Ruta 6 en combinación con fosfato de calcio ha demostrado contener un potente efecto antitumoral en pacientes con cáncer de cerebro; aunque los mecanismos moleculares o las vías por las que la Ruta 6 produce sus efectos biológicos siguen siendo desconocidos es evidente que destruyen células cancerígenas, protegen a los linfocitos B de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y muestra efectos mitogénicos en linfocitos normales de sangre periférica (Pathak *et al*, 2003).

Los alcaloides presentan efectos espasmolíticos *in vivo*. También inducen contracciones en útero aislado y aumentan los efectos adrenérgicos en las vesículas seminales de caballos. La ruda también es conocida por proteger al ADN contra la ruptura de sus hilos y por prevenir mutagénesis (Pathak *et al*, 2003).

El extracto hidroetanólico presenta un efecto analgésico dosis-dependiente en ratones, debido a una acción tanto periférica como central; también muestra actividad antiinflamatoria frente a inflamaciones crónicas, hecho relacionado con un efecto antiproliferativo (Vanaclocha, 2003).

El extracto metanólico posee actividad antibacteriana frente a *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*. Bacteriostático ante *Bacillus subtilis* y es inactivo frente a *Escherichia coli*,

Candida albicans, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger* (Vanaclocha, 2003).

Presentan actividad antimicótica contra *Fusarium culmorum*, *Heterobasidium annosum* y *R hizoclonia solani*, esta actividad estaría relacionada con los componentes del aceite esencial (Vanaclocha, 2003).

2.5.7. Efecto toxico de la planta

Sus efectos tóxicos son: intoxicación, gastroenteritis, tumefacción de lengua y faringe, sialorrea, vértigos, confusión mental, temblores, convulsiones, metrorragias, nefritis, lesiones hepáticas y del intestino delgado e incluso la muerte por depresión cardiorrespiratoria. Por la presencia de metilnonilcetona contenida en la esencia, tiene un efecto estimulante sobre la fibra muscular uterina, por lo que puede ser abortiva. Además de producir sangrado uterino en mujeres embarazadas con posible muerte fetal.

En el cáncer se ha llegado a utilizar por sus efectos tóxicos:

- Se dice que es un agente preventivo contra el Cáncer.
- Usada como agente quimioterapéutico.
- Empleada como agente antineoplásico.
- Uso potencial como clastogénico

Todas sus actividades tóxicas se han relacionado con la presencia proteica en la planta, en particular con las lectinas vegetales (Hernández, 2011).

2.6. Lectinas Vegetales

El término lectina fue propuesto por Boy y Sharpleigh en 1954, derivada del latín *legere* (seleccionado, escogido) refiriéndose a su capacidad de unión selectiva de azúcares. Hoy en día este término se le adjudica a proteínas de origen no inmune que presentan la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos, las cuales presentan al menos dos sitios de unión, que permiten su enlace en primer lugar a un azúcar específico y en forma secundaria a una molécula glicosilada; sin presentar actividad enzimática y no son producto de una respuesta inmune. Estas proteínas están presentes en todos los organismos vivos; en plantas se han detectado principalmente en los cotiledones y endospermo, constituyendo del 2 al 10% del total de las proteínas; además de estar presentes en órganos de reserva mostrando su papel como proteínas de defensa (Hernández, 1999). Estas pueden tener diversas funciones: participan en las interacciones entre las bacterias fijadoras de nitrógeno con la raíz, presentan actividad mitogénica, efecto protector contra la acción patogénica de microorganismos (Hernández, 2005).

Estudios de los años setentas han reportado la actividad antitumoral de las lectinas vegetales, probando lectinas de ricina (RCA), abrina (APA), GS-1 (*Griffonia simplicifolia*), *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Glycine max* (SBA), *Triticum vulgare* (WGA), TMA I y TMA II (*Tricholoma mongolicum*) y la Con A (*Canavalia ensiformis*); *in vivo* han mostrado que inhibe el crecimiento de tumores e incrementando las posibilidades de supervivencia de los animales de estudio. También se ha demostrado el efecto citotóxico *in vitro* con PHA, GSA, Con A, WGA, PNA (*Arachis hypogaea*), VCA (*Viscum álbum*), frijol tepari (*Phaseolus acutifolius*), mezquite (*Prosopis juliflora*) y VFA (*Vicia faba*); para la identificación de su unión a carbohidratos se han empleado lectinas marcadas con fluorescencia de DBA (*Dolichos biflorus*), PNA, LCA (*Lens culinaris*) STL (*Solanum tuberosum*), UEA-I (*Ulex europaeus* I), ABL (*Agaricus bisporus*) y WGA, mostrando patrones de glicosilación (Castillo y Abdullaev, 2005).

2.6.1. Funciones de las Lectinas Vegetales

La gran importancia de las lectinas se debe fundamentalmente a sus propiedades biológicas, tales como aglutinación de eritrocitos y otras células como linfocitos, espermatozoides, plaquetas y bacterias, inducción de mitosis en linfocitos, efectos citotóxicos sobre linfocitos, aglutinación de virus y otras. El estudio de estas moléculas se basa por su uso en la detección de transformaciones malignas en células, ya que generan una aglutinación preferencial por células transformadas, además de disminuir el crecimiento, son citotóxicas y antitumorales (Hernández, 1999). Actualmente su estudio se basa en su actividad antitumoral, a través de la muerte celular programada dirigida (PCD), que es un mecanismo celular intrínseco para la eliminación de las células dañinas y el mantenimiento de la homeostasis (Fu *et al*, 2011).

Estas moléculas forman parte de conjugados como lectina-lectina, lectina-enzimas y lectina-anticuerpos. Van a presentar mayor afinidad por carbohidratos con estructuras más complejas que aquellos con estructuras simples (monosacáridos y disacáridos), por lo tanto se ha incrementado el estudio de la interacción lectina-carbohidrato.

2.6.2. Estructura de las Lectinas

Presentan una estructura conformada por una cadena polipeptídica, que puede o no presentar residuos de carbohidratos, de 2-15 monosacáridos residuales constituidos por 2 o más azúcares. Contienen 2 sitios de unión, permitiendo que se unan a un azúcar específico y a una molécula glicosilada (Fig. 13).

Para la elección de las células que van a aglutinar requieren:

- Cantidad. de moléculas de azúcar
- Grado de glicosilación de un tejido.

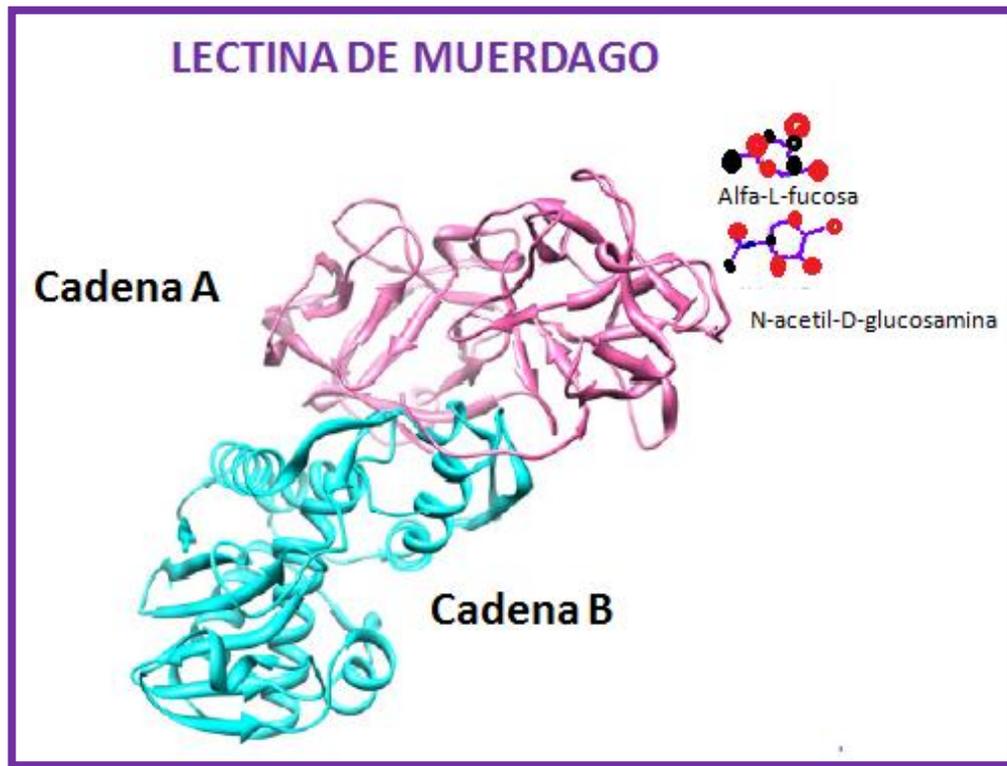


Fig. 13- Estructura de lectinas de muérdago. Tomado y modificado de Fu *et al.* 2011.

2.6.3. Clasificación de Lectinas Vegetales

Las lectinas vegetales se caracterizan por reconocer específicamente carbohidratos por enlaces tipo puente de hidrogeno, iones, interacciones hidrofóbicas entre otras. Estructuralmente van a presentar características comunes que permiten agruparlas en familias; generando así diferentes formas de clasificarlas: por la especificidad hacia el monosacárido que inhibe su actividad hemaglutinante y hacia estructuras oligosacáridicas que reconocen, y otra a partir de su estructura molecular existiendo una del 2006 y una a partir del 2011 que reconoce su especificidad de unión a carbohidratos.

La clasificación establecida a partir de la especificidad hacia el monosacárido que inhibe su actividad hemaglutinante y hacia las estructuras de oligosacaridos que reconocen las dividen en N-glicanos (oligosacaridos unidos a un residuo de asparagina en las proteínas mediante una N-acetil-glucosamina) y lectinas que reconocen a los O-glicanos (oligosacaridos unidos a un residuo serina o treonina en las proteínas mediante una N-acetil-galactosamina (Hernández, 2005).

Lectinas vegetales utilizadas para el estudio de glicoproteínas y su clasificación según su especificidad hacia monosacáridos		
Monosacárido	Lectina	Abreviatura
A-D-manosa, α-D-glucosa	<i>Canavalina ensiformis.</i>	ConA
	<i>Lens culinaris</i>	LCA
β-galactosa, N-acetil-α-D-galactosamina	<i>Ricinus communis</i>	RCA
	<i>Glycine max</i>	SBA
	<i>Arachis hipogea</i>	PNA
	<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL
N-acetil-β-D-glucosamina	<i>Triticum vulgare</i>	WAG
α-D-fucosa	<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA
	<i>Ulex europeus</i>	UEA
A-N-acetilneuramínico	<i>Limulus polyphemus</i>	LPA

Tabla 9- Clasificación por reconocimiento de carbohidratos. Modificado de Hernández *et al*, 2005.

La establecida con base en su estructura molecular distingue seis familias:

1. **Lectinas aisladas de leguminosas.** Es la familia de lectinas vegetales más estudiada, generalmente se encuentran constituidas por dos o cuatro subunidades idénticas de 25 a 30 kDa, cada una de las sub-unidades contiene un sitio de unión para iones metálicos Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} . Una subunidad contienen aproximadamente 250 aminoácidos y presenta una gran homología con las otras subunidades. Está constituida por doce hojas β antiparalelas conectadas entre sí mediante bucles, lo que genera una estructura aplanada en forma de domo, cuatro bucles localizados en la parte superior del monómero forman el sitio de reconocimiento a carbohidratos.
2. **Lectinas con dominios tipo heveína o específicas de quitina.** Los miembros de esta familia generalmente presentan dos subunidades idénticas, ricas en cisteína. Una subunidad está constituida por cuatro dominios tipo heveína, conteniendo cuatro puentes disulfuro, lo cual origina que no existan estructuras secundarias regulares a excepción de una pequeña α hélice de cinco residuos, cada dominio presenta un sitio de reconocimiento a carbohidrato, que no necesita la presencia de iones metálicos.
3. **Lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa.** Presentan secuencias de aminoácidos altamente conservadas. Estas son tetraméricas, cada monómero tiene un peso molecular de 12kDa, así como una secuencia de 36 aminoácidos repetidas tres veces. El sitio de reconocimiento a carbohidrato está constituido por cuatro hojas β antiparalelas unidas entre sí por giros. El conjunto se asocia de manera que forma una corona aplanada dejando aparecer un gran túnel central.
4. **Lectinas en forma de prisma β o del tipo jacalina.** Presentan estructuras tridimensionales, tetraméricas glicosiladas, donde cada sub-unidad contiene una cadena pesada (α) y una cadena ligera (β), y está constituida por tres hojas β antiparalelas arregladas a manera de un prisma triangular.

5. **Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas.** Constituidas por dos cadenas, la A y B, las cuales son diferentes y se encuentran unidas por dos puentes disulfuro. La cadena A es la responsable de la toxicidad, mientras que la cadena B tiene la actividad de lectina, está constituida por dos dominios que presentan cuatro subunidades, las cuales contienen α hélices y hojas β .
6. **Lectinas tipo amaranto.** Cada proteína se encuentra formada por dos monómeros en los que existen dos dominios N y C, unidos por una pequeña hélice, cada dominio muestra una conformación de trébol β (Hernández, 2005).

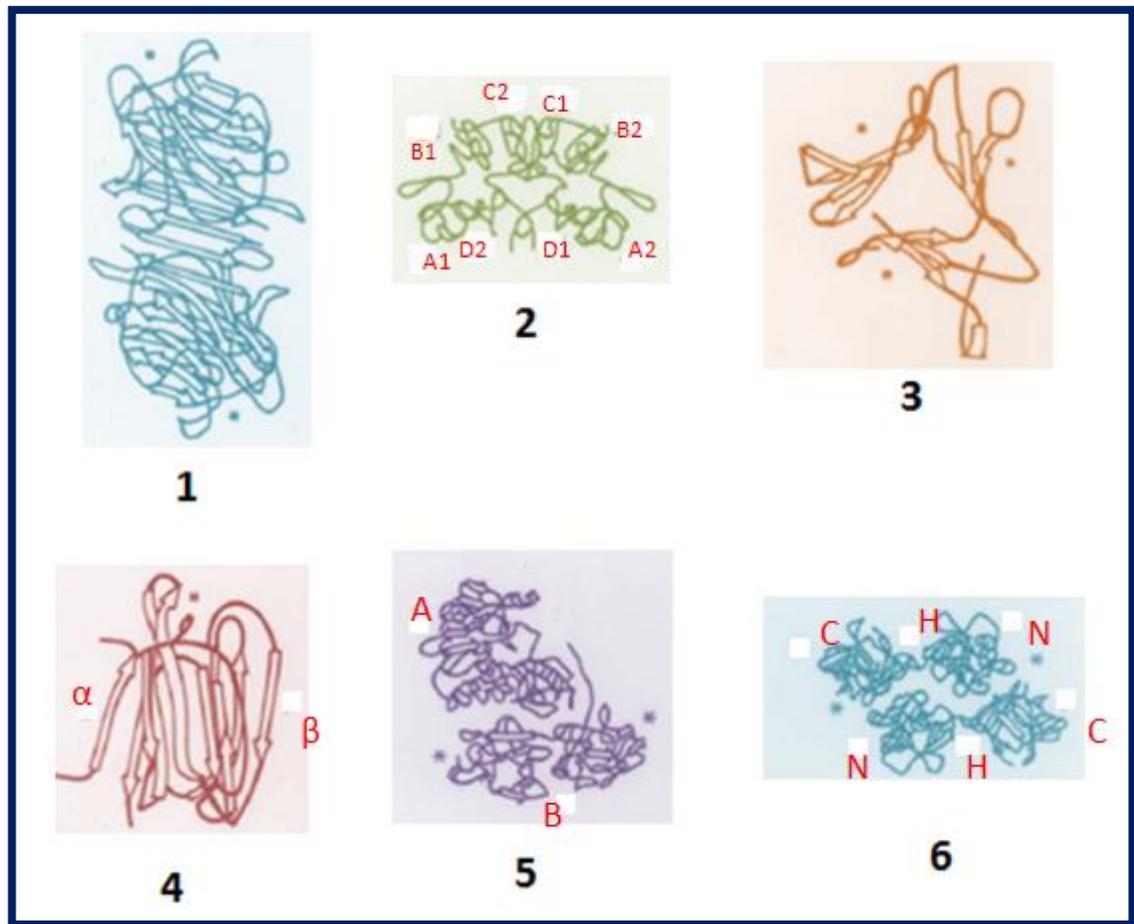


Fig. 14. Representación esquemática de las estructuras tridimensionales en lectinas vegetales. Lectinas aisladas de leguminosas(1), lectinas con dominio tipo *heveina* (2), lectinas aisladas de monocotiledoneas, específicas de manosa (3), lectinas con estructura tipo prisma β (4), lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas (5), lectinas tipo *Amaranto* (6). Modificado de Hernández *et al*, 2005.

Actualmente se estableció una nueva clasificación establecida a partir de sus diferentes especificidades a unión de carbohidratos:

- 1) Homólogos de aglutinina *Agaricus bisporus*
- 2) *Amaranthins*
- 3) Clase V quitinasa homólogos con actividad de lectina
- 4) Familia cianovirina
- 5) Familia EEE
- 6) Familia GNA
- 7) Proteínas con dominios heveína
- 8) Jacalinas
- 9) Proteínas con dominios lectina de leguminosas
- 10) Con dominio LysM
- 11) Familia Nictaba (antes lectinas de *Cucurbitaceae pholoem*)
- 12) Familia ricina-B (Fu *et al*, 2011).

Lectina representativa	Abreviación	Familia	Azúcar de unión específica	estructura
Aglutinina <i>Agaricus bisporus</i>	ABA	Homólogos de aglutinina <i>Agaricus bisporus</i>	Galactosa	1Y2T (PDB)
Aglutinina relacionada con quitinasa	CRA	Clase V quitinasa con actividad de lectina	N-glicanos con manosa	
N-Cyanovirina	CV-N	Familia Cyanovirina	Manosa	2JZJ (PDB)
Aglutinina <i>Euonymus europaeus</i>	EEA	Familia EEA	Manosa/galactosa	
Lectina <i>Polygonatum cyrtonema</i>	PCL	Familia GNA	Manosa/ácido siálico	3 ^a 0C (PDB)
Aglutinina de germen de trigo	WGA	Proteínas con dominio Heveína	N-acetil-d-glucosamina	2UVO (PDB)
Jacalina	JAC	Jacalinas	Manosa	3P8S (PDB)
Concavalina A	ConA	Proteínas con dominios lectina de leguminosas. Dominio LysM	D-manosa	3D4K (PDB)
Lectina de <i>Cucurbitaceae phloem</i>	CPL	Familia Nictaba		
Lectina de muérdago europeo	ML-I	Familia de Ricina-B	B-galactosa	1M2T (PDB)

Tabla 10. Clasificación de lectinas vegetales por unión a carbohidratos y estructura. Tomado y modificado de Fu *et al*, 2011.

Para el caso de lectinas de *R. graveolens* se ha reportado que van a presentar una alta afinidad por oligosacáridos como: galactosa (Gal), glucosa (Glu), N-acetil glucosamina (GlcNAc) y fructuosa (Fru), y una menor afinidad por sacarosa (Sac), Lactosa (Lac), fucosa (Fuc), galactosa acetilada (GalAcet), ribosa (Rib), xylosa (Xyl), manosa (Man) y N-acetilgalactosamina (NANA); sin embargo a estas lectinas aún no se les ha dado una clasificación (Hernández, 2011).

2.6.4. Efecto de las Lectinas Vegetales sobre células Tumorales

Durante la diferenciación celular y la transformación maligna, la biosíntesis de las cadenas de oligosacáridos de glicoproteínas es frecuentemente alterada y esta alteración puede ser detectada por las lectinas, por medio del dominio de reconocimiento a carbohidratos que se encuentra dividido en dos subsitios, el primero referido al sitio donde se da la interacción con el monosacárido y el segundo el sitio extendido que permite la interacción con oligosacáridos más complejos. Esta división permite explicar la diferencia del efecto biológico que presentan las lectinas con la misma especificidad hacia un monosacárido. Las lectinas son capaces de distinguir patrones específicos de la glicosilación de proteínas de superficie, que se encuentra regulando la transducción de señales intracelulares, entre otros (Rambaruth, 2011). Los mecanismos de acción de estas proteínas son muy variados dependiendo de diferentes factores como pueden ser el origen celular, clase de tumor y concentración de lectina (Tabla 11) (Castillo y Abdullaev, 2005).

A nivel bioquímico y molecular se han propuestos diferentes mecanismos de acción del efecto antitumoral de las lectinas. Un mecanismo describe la unión de lectinas a moléculas de adhesión de la superficie (epCAM) que participan en una gran variedad de señales de transducción que son importantes para la regulación celular. Un segundo mecanismo sugiere que la lectina se internaliza en la célula y afecta el proceso celular fundamental para la división celular. La lectina se une a una forma truncada de Orp150 la cual está directamente involucrada en el proceso del importe nuclear dependiente de NLS (Castañeda, 2006). Un tercer mecanismo explica que la lectina induce apoptosis por diversas vías:

- Dependiente de la activación intracelular de la caspasa 8/FLICE requiriendo la internalización de la lectina e involucra su actividad inhibitoria ribosomal y de la síntesis de proteínas.
- A través de la activación de la caspasa-3 y la ruptura de PARP.
- Por la activación de Bax (acelerador de apoptosis) y la inhibición tanto de Bcl-2 (supresor de apoptosis) como de la telomerasa.

Mecanismos de acción de las lectinas de plantas en diferentes células malignas in vitro e in vivo			
Lectina	Mecanismo de acción	Línea células	Tipo
PHA-L (Phaseolus vulgaris)	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones	LoVo, HCT-15, SWB37	Cáncer colorrectal humano
Con A (Concavalina A)	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones	LoVo, HCT-15, SW837	Cáncer colorrectal humano
GSA (Griffonia simplicifolia I-A)	Estimula el crecimiento celular a altas y bajas concentraciones. Inhibe el crecimiento celular a altas concentraciones	SW837 LoVo	Cáncer colorrectal humano
WGA (Triticum vulgare)	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones	LoVo, HCT-15, SW837	Cáncer colorrectal humano
DSA (Datura stramonium)	Inducción de diferenciación irreversible e inhibición de proliferación	C6 glioma, U251, SNB-75, SNB-78	Glioma de rata, tumor de cerebro humano
VCA (Viscum álbum, L coloratum)	Inhibición del crecimiento dosis-dependiente Inhibición de proliferación dosis-dependiente, con inducción de apoptosis. Inducción de la apoptosis a través de la activación de caspasa-3 Inhibición de la telomerasa Inducción de apoptosis por la desfosforilación de Akt.	Molt-4 B16-BL6 HL-60 SK-Hep-1, Hep3B A253	T linfoblastico humano agudo Melanoma metastático Leucemia promieloide aguda Hepatocarcinoma humano Cáncer humano
ML-I (Viscum álbum)	Inducción de apoptosis: inactivación intracelular de caspasas	Jurkat T-cell, BJBAB B-cell	Leucemia humana
ABL (Agaricus bisporus 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 (Vicia faba)	Inhibición de proliferación no asociado a citotoxicidad, posible interacción con la molécula de adhesión epCAM	LS174T, SW1222 y HT29	Cáncer de colon humano
AAL (Agrocybe aegerita)	Inducción de apoptosis con actividad de ADNasa	HeLa, SW4880, SCG-7901, MGC80-3, BGC .823, HL-60, S-180	Canceres humanos Sarcoma de ratón
In vivo			
PHA (Phaseolus vulgaris)	Inhibición del crecimiento de tumores		Murina linfomas ascíticos
SBA (Glycine max)	Fortalecimiento del sistema inmune del huésped		Murina linfoma ascítico
TMA I y II (Triholoma mongolicum)	Inhibición del tumor y prolongación de la vida de los animales		Ratón con células de sarcoma 180
GS-1 (Griffonia simplicifolia)	Inhibición del crecimiento del tumor		Ratón con células ascíticas Ehrlich
VCA (Viscum álbum, L coloratum)	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 B-16-BL6
KML-C (Korean mistletoe; Viscum álbum coloratum)	Actividad inmunomoduladora para fortalecer el sistema de defensa del huésped, efecto en metástasis asociado a muerte natural y macrófagos		Murina melanoma, carcinoma de colon y linfoma
ML-I (Viscum álbum)	Efecto antitumoral con reducción del crecimiento del linfoma trasplantado.		Ratón con tumores de linfoma no-Hodgkin

Tabla 11- Mecanismo de acción de lectinas en células cancerígenas. Modificado de Castillo y Abdullaev, 2005

Por tanto estos estudios han demostrado la capacidad de estas proteínas para tener un efecto adverso sobre las células cancerígenas, lo que las lleva a ser un arma potencial para el tratamiento de este conjunto de enfermedades, debido a su especificidad hacia células malignas y por medio de diferentes rutas son capaces de activar los mecanismos de apoptosis (Fu *et al*, 2011); como se muestra en la Fig. 15.

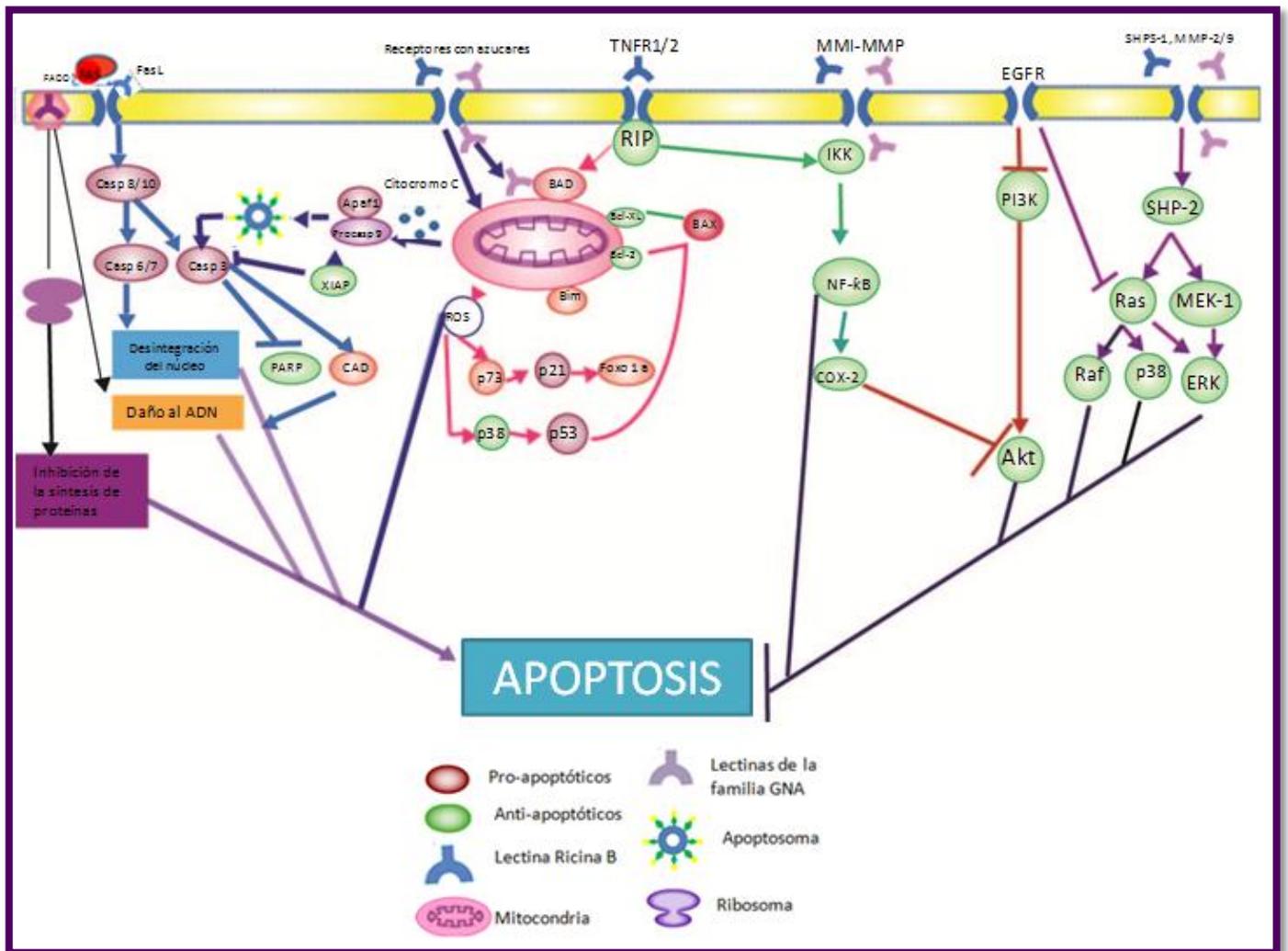


Fig. 15- Red de señalización de muerte celular programada (PCD) por lectinas vegetales. Modificado de Fu *et al*. 2011.

III. JUSTIFICACIÓN:

El cáncer de mama constituye un desafío para la salud de las poblaciones ya que ocupa el primer lugar de muertes a nivel mundial de acuerdo a datos de la OMS (2009). En México a partir del 2006 paso al primer lugar como causa de muerte en la población femenina. Debido a la existencia de un sin fin de tratamientos contra el cáncer, los cuales atacan de manera indiferenciada tanto a células sanas como a cancerosas resultando invasivos, por tanto es indispensable el desarrollo de tratamientos específicos capaces de reconocer a las células de cáncer de mama. Así el estudio de las lectinas extraídas de la ruda permitirá en un futuro encontrar un tratamiento menos agresivo y más específico, esto por su capacidad de producir apoptosis a células cancerosas.

IV. HIPÓTESIS:

Si las células cancerígenas presentan modificaciones en las glicosilaciones membranales entonces se espera que las lectinas de la ruda identifiquen a las células transformadas a través de los cambios en la glicosilación y por ende presenten un efecto citotóxico sobre las células de cáncer de mama.

V. OBJETIVOS:

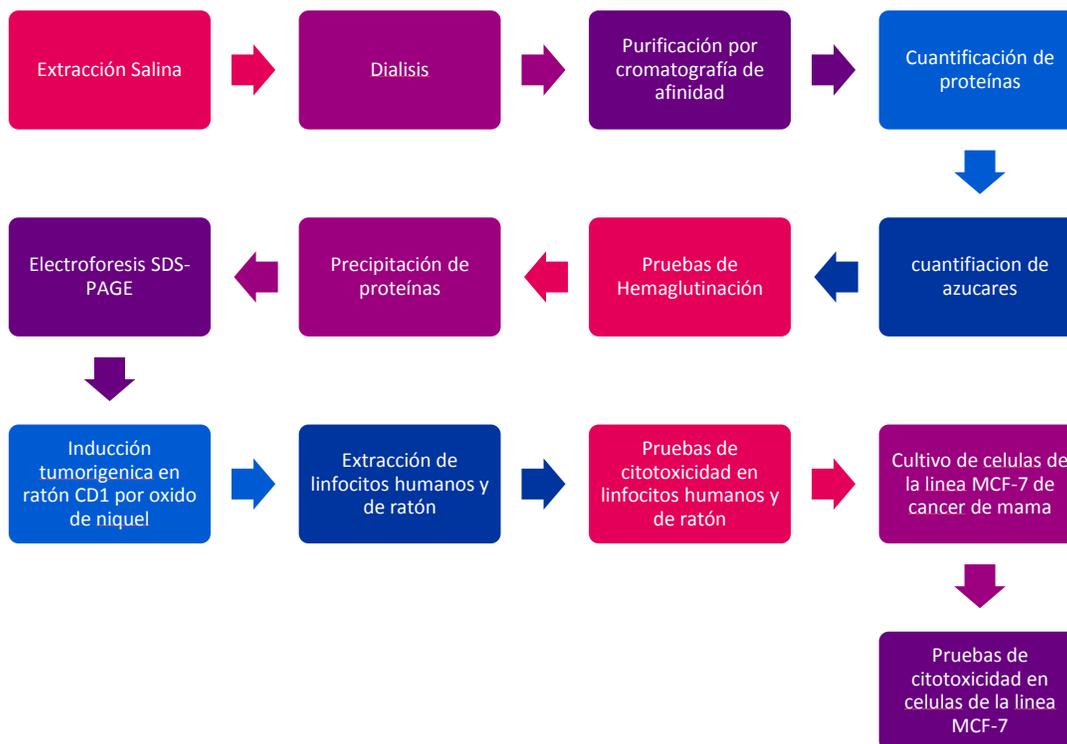
5.1. *Objetivo General:*

- ❖ Evaluar el efecto citotóxico de las lectinas de *Ruta graveolens* sobre células de cáncer de mama.

5.2. *Objetivos Particulares:*

- ❖ Realizar la extracción de lectinas presentes en el extracto de *Ruta graveolens*.
- ❖ Determinación del reconocimiento a carbohidratos de las lectinas de *R. graveolens* por pruebas de hemaglutinación.
- ❖ Determinar el número y peso molecular de las lectinas extraídas de *R. graveolens*.
- ❖ Evaluar el efecto del extracto de lectinas de *R. graveolens* en cultivos de linfocitos humanos y de ratones CD1.
- ❖ Evaluar el efecto del extracto de lectinas obtenidos de *R. graveolens* en cultivos de células cancerígenas de la línea MCF-7 de cáncer de mama.

VI. MATERIAL Y METODO:



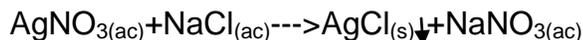
6.1. Extracción Salina de lectinas de *Ruta graveolens*:

La extracción de una mezcla proteica se realizó macerando 100 gr de: hoja, tallo y raíz de *R. Graveolens* con solución de NaCl (J.T. Baker MEX) a una concentración al 10%, en una proporción 3:1(solución: material vegetal), dejando reposar por 24 hrs, esto promueve la solubilización de las proteínas por el aumento de la fuerza iónica del medio, disminuyendo la interacción proteína-H₂O al quitar la capa de solvatación, provocando la precipitación de una mezcla de proteínas. Se eliminó el exceso de material vegetal por filtración con gasas y papel Whatman # 41. Posteriormente se aplicó un gradiente de densidad con una centrifugación a 3000 rpm durante 20 min. Promoviendo la solubilización de las proteínas De acuerdo a la concentración salina utilizada permite la separación y purificación de proteínas particulares, como en este caso se extraen lectinas y proteínas que similares (Villarrubia *et al.*, 1995).

6.2. Procesos de Purificación:

6.2.1. Diálisis

Se realizó la semipurificación proteica de los extractos por medio de una diálisis con un membrana semipermeable de 3 kDa de acuerdo a lo reportado del peso molecular de las lectinas que va de 12-65 kDa; en 1L de tampón NH_4HCO_3 (J.T. Baker MEX) 0.1M pH 8, donde se produce un proceso osmótico que permite la separación de proteínas por su tamaño y cambio en la composición de sal de la mezcla; hasta comprobar la eliminación de sal por la prueba de AgNO_3 (MERCK) 0.1N que en presencia de NaCl el AgNO_3 forma un complejo de cloruro de plata dando una coloración lechosa.



6.2.2. Purificación por cromatografía de afinidad:

Para la obtención de lectinas los extractos se hicieron pasar por una columna con matriz de Silica G-60 para columna (Sigma MEX) con un flujo de 0.5 ml/min sometidas a vacío. Posteriormente las lectinas retenidas en las columnas fueron desplazadas por una solución de D-glucosa (Sigma MEX) 0.1M, está utiliza la alta especificidad de las lectinas a carbohidratos.

6.3. Cuantificación de Proteínas:

6.3.1. Por el método de Biuret:

Se determinó la concentración de proteínas presentes en los extractos tomando 800 μl con 200 μl de agua, agregando 10 ml del reactivo de Biuret, en donde se forma un complejo entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos de la proteína provocando la aparición de una coloración violeta-púrpura que es directamente proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la muestra, cuantificando por la lectura a 545 nm en espectrofotómetro (THERMO SCIENDIFIEC, Genesis 20) y extrapolando a una curva patrón de albumina sérica bovina (Sigma MEX) a una concentración de 10 mg/ml.

6.3.2. Por el método de Bradford:

Se determinó la concentración de proteínas presentes en los extractos tomando 100 µl de la muestra con 700 µl de agua, agregando 200 µl del reactivo de Bradford, en donde se forma un complejo entre la proteína y el colorante azul de Commassie G25 con un coeficiente de excitación mayor que el colorante libre y cuantificando por una lectura a 595 nm en espectrofotómetro y extrapolando a una curva patrón de albumina sérica bovina (Sigma MEX) a una concentración de 1 µg/µl.

6.4. Cuantificación de azúcares totales:

Los azúcares totales presentes en los extractos se determinaron por el método de fenol/ácido sulfúrico tomando 100 µl de la muestra con 900 µl de agua, agregando 100 µl de fenol al 80% y dejando reposar por 15 min, posteriormente se añadió 3 ml de H₂SO₄ concentrado dejando reposar por 30 min, en donde se forma un complejo con el azúcar dando un color anaranjado que se lee a 540 nm y se extrapola a una curva patrón de glucosa a una concentración de 1 mg/ml.

6.5. Pruebas de Hemaglutinación:

Para verificar la presencia de lectinas en los extractos se realizó la prueba de hemaglutinación ya que éstas presentan una actividad como fitohemaglutininas. Se tomaron muestras sanguíneas del sistema ABO con factor Rh+, estas se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante aspirando la capa superior, los eritrocitos extraídos se suspendieron en aproximadamente 10 volúmenes de PBS y se centrifugaron en las mismas condiciones, repitiendo el lavado dos veces más. Posteriormente el volumen de eritrocitos sedimentados se resuspendió en PBS en una disolución al 3%. Finalmente se prepararon pozos con 50 µl de los extractos y 50 µl de la solución de eritrocitos, dejando reposar durante 1 hr y observando al microscopio para determinar el grado de aglutinación presente

que va a estar medida por el reconocimiento del número de determinantes antigénicos sobre la superficie de los eritrocitos.

6.6. Precipitación de proteínas por el método de acetona-TCA-DTT:

Se tomaron alícuotas de 500 µl de muestra a los que se les añadió 500 µl de una solución de TCA (20%)-acetona (90%)-DTT (20mM). Dejando precipitar toda la noche, posteriormente se centrifugo a 15000 rpm a 4°C por 30 min. El sobrenadante se decanta y el precipitado se lavó dos veces, primero con 200 µl de una solución de acetona (90%) con 20mM de DTT, el segundo con 200µl de una solución de acetona (80%) y 10mM de DTT; el pellet se enfrió a -20°C durante 20 min y se centrifugo a 4°C durante 15 min a 15000 rpm. Finalmente el sobrenadante con acetona se decantó y el pellet obtenido se secó para eliminar el residuo de acetona, posteriormente se disolvió en 10-60 µl de RIPA (Sigma MEX).

6.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones reductores (SDS-PAGE):

Para la determinación del número y el peso molecular de las lectinas presentes en los extractos se hizo la separación por medio de una electroforesis en una resina de acrilamida al 16% y 12%. Tomando un volumen de 40 µl de los extractos liofilizados con 10 µl de buffer de muestra y 3-8 µl de los concentrados proteicos con 3 µl de buffer de muestra. Dejando correr a 95 voltios durante 1:30 hr. La tinción se realizó por el método de nitrato de plata de acuerdo a lo establecido en el protocolo de The Protein Protocols Handbook (Walker J. "The Protein Protocols Handbook, Human Press, second edition, 2002, pag. 97-99).

6.8. Inducción tumorigénica en ratón CD1 con óxido de níquel:

Se tomaron dos grupos de 5 ratones, en donde el primer grupo no fue tratado, mientras el segundo fue inducido para el desarrollo de tumores por medio de la inoculación de 20 mg/Kg de óxido de níquel (Sigma Mex).

6.9. Extracción de linfocitos humanos y de ratón:

Para determinar la DL50 de las lectinas presentes en los extractos se extrajeron linfocitos de sangre periférica y bazo, respectivamente.

6.9.1. Extracción de linfocitos en sangre periférica humana:

Se extrajeron 2 ml de sangre en un vacutainer con 10.8 mg EDTA (BD Franklin) agregándole 2 ml de solución salina balanceada y 3 ml de Hystopaque-1077 (Sigma MEX), la mezcla se centrifugo a 2000 rpm por 30 min, extrayendo la capa de linfocitos y agregando 6 ml de solución salina balanceada; se centrifugo a 1500 rpm durante 10 min. Finalmente se tomaron 10 µl de la solución de linfocitos para su contabilización en un hemocitometro y su posterior cultivo para las pruebas de citotoxicidad.

6.9.2. Extracción de linfocitos en bazo de ratón CD1:

Se sacrificaron ratones CD1 para la extracción de bazo, posteriormente este se tamizo disgregándolo sobre un colador, esperando 2 min para la sedimentación del Debris celular. Se dispensaron aproximadamente 9 ml de suspensión celular con 3 ml de Hystopaque-1077 (Sigma MEX), luego se centrifugo a 1750 rpm durante 20 min, después se recogió la capa de linfocitos y se resuspendió en 1ml de PBS. Finalmente se tomaron 10 µl de la solución para su contabilización en un hemocitometro y su posterior cultivo para las pruebas de citotoxicidad.

6.10. Ensayos de Citotoxicidad:

6.10.1. En linfocitos humanos y de ratón:

Se realizaron pruebas de citotoxicidad para determinar la DL50 que presentan las lectinas en linfocitos humanos y de ratón. Las suspensiones celulares fueron tratadas con concentraciones de 2, 4 y 6 µg de lectinas disueltas en medio de cultivo DMEM (Sigma MEX) y agregándole aproximadamente 200 000 linfocitos en 100 µl de medio de cultivo por pozo, dejando actuar durante 1 y 2 hrs. Posteriormente la viabilidad fue evaluada por la técnica de exclusión de azul tripano (Sigma MEX) al 0.4% tomando 90 µl de suspensión celular tratada y 10 µl de azul tripano dejando actuar por 3 min y se contaron en el hemocitometro diferenciando entre las teñidas como las no viables y las no teñidas y refringentes como las viables, determinando el % de viabilidad por:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\# \text{ de células muertas}}{\text{total de células contadas}} \times 10$$

6.10.2. En Células MCF-7 de cáncer de mama:

Fueron sembradas 10 000 células por pozo en RPMI, suplementado con suero fetal bovino (SFB). Se incubaron a 37°C en atmósfera humificada al 5% de CO₂. A las 24 hrs fue retirado el medio de cultivo y se cambiaron las condiciones con 1, 2, 4, 5, 8, 10 y 20% de lectinas disueltas en RPMI. Las células fueron tratadas por 48 hrs, una vez pasado el tiempo de tratamiento las células se lavaron con PBS y fijadas con glutaraldehído (Sigma MEX) al 4% durante 10 min. Posteriormente se tiñeron con cristal violeta 0.4% (Sigma MEX) y lavadas con agua para eliminar el exceso de tinción. Finalmente se añadió una solución al 10% de ácido acético (Sigma MEX), midiendo la absorbancia a 630 nm utilizando un lector de ELISA, determinando el % de inhibición por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - (D.O.(t) \div D.O.(c) \times 100)$$

VII. RESULTADOS:

7.1. Extracción Salina de Lectinas:

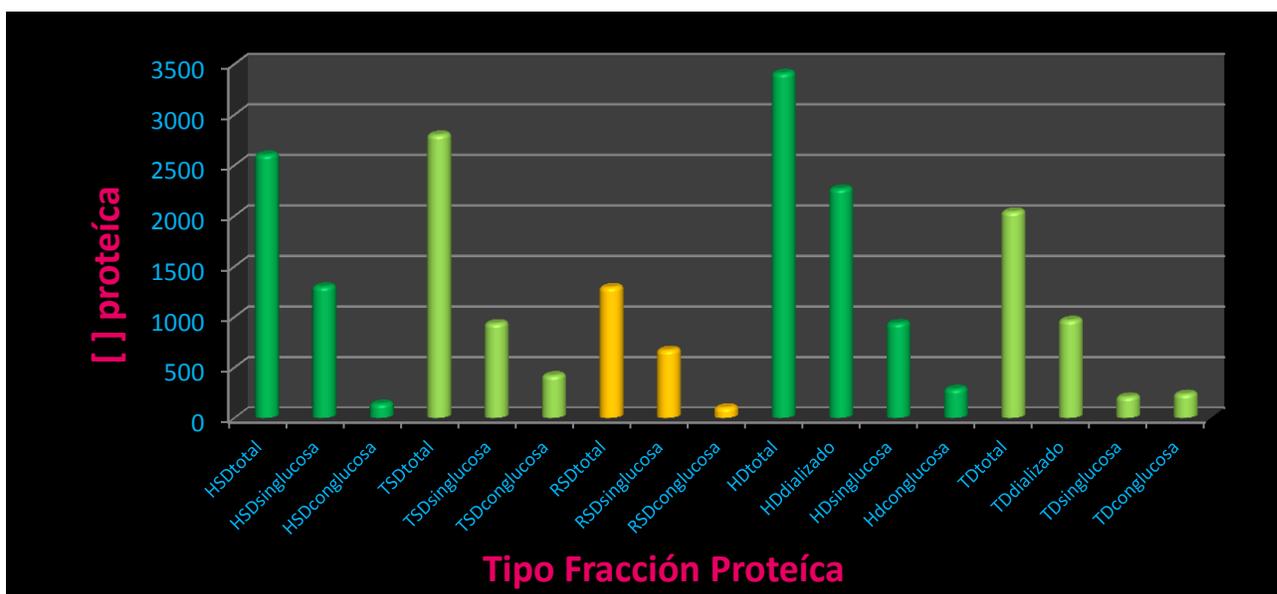
A partir de 100 gramos de material vegetal de hoja, tallo y raíz se realizó la extracción de lectinas vegetales, de los cuales para el caso de tallo y hoja se hicieron dos extractos diferentes que fueron sometidos al proceso de diálisis en una membrana de 3 kDa. Después de cada uno de los procesos de semipurificación se obtuvieron dos fracciones proteicas; una sin glucosa y otra con glucosa, para cada tipo de extracto. Se determinó la concentración proteica en cada uno de los procesos de semipurificación para cada fracción por los métodos de Biuret y Bradford. Cada uno de los extractos se realizó por duplicado, únicamente a los primeros se les sometió a los dos métodos de cuantificación.

En la tabla 12 se muestran las variaciones presentes en cada uno de los procesos de semipurificación a los que se sometieron los extractos, hasta la obtención de fracciones ricas en lectinas. Los datos en rojo indican la obtención de proteínas tipo lectina comparada con la concentración total proteica que presentan las diferentes partes de la planta.

Extracto	Concentración total de proteínas		Después de Diálisis		Fracción sin glucosa		Fracción con glucosa	
	Vol. ml	[] proteica total mg	Vol.	[] proteica total mg	Vol.	[] proteica total mg	Vol.	[] proteica total mg
Hoja sin dializar	230	2602.4	No fue sometido a este proceso		125	1299 mg	85	139.8 mg
Hoja dializada	256	3411.1	245	2267.4mg	75	937.5 mg	40	286.84mg
Tallo sin dializar	245	2800	No fue sometido a este proceso		170	934.86mg	160	420 mg
Tallo dializado	240	2039.2	227	967.3 mg	60	209.21mg	45	236.84mg
Raíz sin dializar	255	1291.7	No fue sometido a este proceso		200	671.05mg	50	102.63mg

Tabla 12- Resultados de la extracción salina de lectinas de *R. graveolens*. Mostrando con rojo | la comparación entre la fracción total y la fracción enriquecida con proteínas tipo lectina.

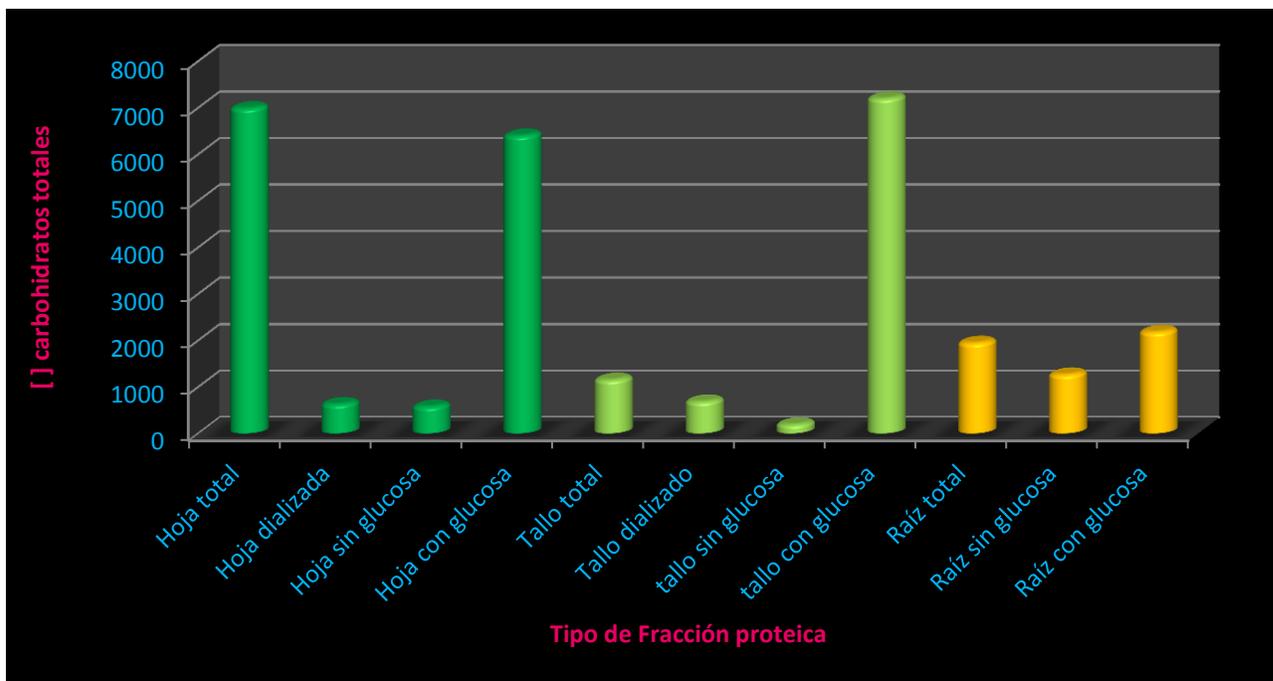
En el grafico 1 se muestra que los extractos de hoja presentaron un mayor contenido de proteínas totales, seguido de tallo y finalmente de raíz; la obtención aproximada de proteínas es entre 1200-4500 mg, variando para cada parte vegetal. Se observó que los extractos de hoja contienen un 35.73% de proteínas con un peso menor a 3 kDa y para tallo un 52.6%. Para las fracciones sin glucosa de hoja la concentración promedio es de 1221.31 mg, para tallo 770.18 mg y para raíz 612.59 mg. Mientras que en las fracciones con glucosa, hoja contiene una concentración promedio de 232.78 mg de proteínas que representan el 6.96% del total de proteínas, el tallo con 326.86 mg siendo el 12.77% y raíz 117.22 mg que es el 7.74% del total de proteínas.



Graf. 1- Concentración de Proteínas presentes en las diferentes Fracciones proteicas de *R. graveolens*. Se muestra la variación en la concentración proteica en cada uno de los procesos de semipurificación. HSD (hoja sin dializar), TSD (tallo sin dializar), RSD (raíz sin dializar), HD (hoja dializada) y TD (tallo dializado)

7.2. Cuantificación de azúcares totales:

Para determinar la presencia de algún otro componente de la planta se realizó la cuantificación de azúcares, ya que estas moléculas normalmente se encuentran ligadas a las lectinas, lo que puede generar cambios en el pH y en el peso de las proteínas. Esta prueba solo se realizó en las fracciones de los extractos dializados.



Graf. 2- Concentración de Azúcares totales en las diferentes fracciones proteicas de *R. graveolens*.

En la gráfica 2 se muestra la cantidad de azúcares totales presentes en los extractos, observando que en los extractos totales la concentración de azúcares es 1000-7000 mg, mientras que en las fracciones dializadas se presentó una disminución de la concentración indicando que se presentaban carbohidratos unidos a las lectinas y que fueron eliminados por este proceso dando una concentración de 600-700 mg, en las fracciones con glucosa la concentración aumenta hasta 6000 mg debido a que las lectinas presentan varios sitios de unión a carbohidratos y alta afinidad por la glucosa. Siendo así que la fracción total de hoja presenta un mayor contenido de azúcares en comparación a tallo y raíz.

7.3. Pruebas de Hemaglutinación en las distintas fracciones proteicas:

La identificación de la presencia de lectinas en las fracciones proteicas se realizó tomando en cuenta su actividad hemaglutinante. Se utilizaron las fracciones proteicas con glucosa y sin glucosa. La cuantificación de la actividad fue cualitativa dando valores de 0-4; donde 0 indica una nula actividad aglutinante, mientras 4 una alta actividad de aglutinación. Se realizaron dos ensayos uno tomando únicamente 50 µl de extracto independiente de la concentración de proteínas y el segundo ensayo fue tomando concentraciones de 80, 8 y 0.8 µg de proteína; esto para determinar la relación entre la concentración y su actividad hemaglutinante.

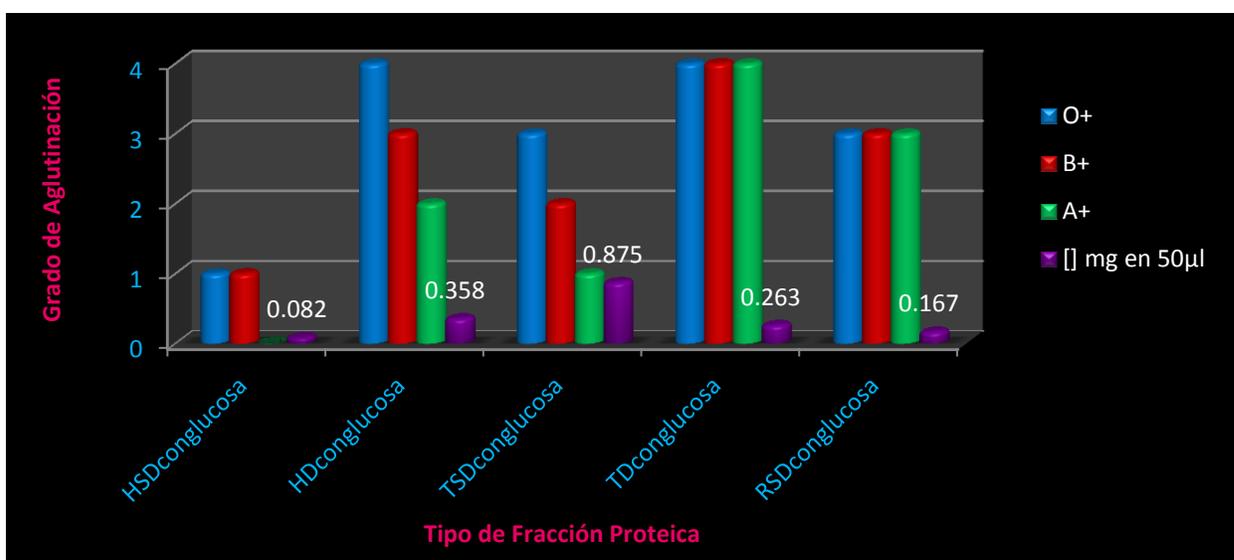
7.3.1. Pruebas de Hemaglutinación a diferente concentración:

Para esta prueba se tomaron 50 µl de cada una de las fracciones proteicas sin tomar en cuenta la concentración de proteínas presentes, en la tabla 13 se muestran los diferentes patrones de aglutinación para cada tipo de fracción proteica y su variación de acuerdo al tipo sanguíneo.

Tipo de Fracción Proteica	O+	B+	A+	
Hoja sin Dializar con Glucosa				Aglutinación grado 1
Hoja Dializada con Glucosa				Aglutinación grado 2
Tallo sin Dializar con Glucosa				Aglutinación grado 3
Tallo Dializado con Glucosa				Aglutinación grado 4
Raíz sin Dializar con Glucosa				

Tabla 13- Comparación de la aglutinación de lectinas de *R. graveolens* a diferentes concentraciones.

En la gráfica 3 se observa que al comparar las fracciones dializadas con las no dializadas, en las segundas se presenta una disminución de su capacidad aglutinante. En donde la fracción de tallo es la que presenta un mayor efecto aunque su concentración es menor comparada con hoja. Para la fracción de raíz se presenta un efecto medianamente alto para los tres tipos sanguíneos. Por otra parte la fracción de hoja requiere de una mayor concentración de proteína para ejercer un efecto donde el tipo más reactivo para estas lectinas es el tipo O⁺, además se muestra que para el tipo A⁺ las lectinas de hoja no presentan una alta especificidad.



Graf. 3- Comparación de la hemaglutinación relacionada con la concentración. Donde se presenta la concentración proteica de cada fracción en relación con el grado de aglutinación para cada tipo sanguíneo. HSD (hoja sin dializar), HD (hoja dializada), TSD (tallo sin dializar), TD (tallo dializado) y RSD (raíz sin dializar),

7.3.2. Pruebas de Hemaglutinación a disoluciones de concentraciones iguales:

Se realizaron pruebas de hemaglutinación tomando una concentración de 80 μg en 50 μl y posteriormente se hicieron diluciones a 8 y 0.8 μg para verificar el efecto de la actividad hemaglutinante respecto a la concentración proteica.

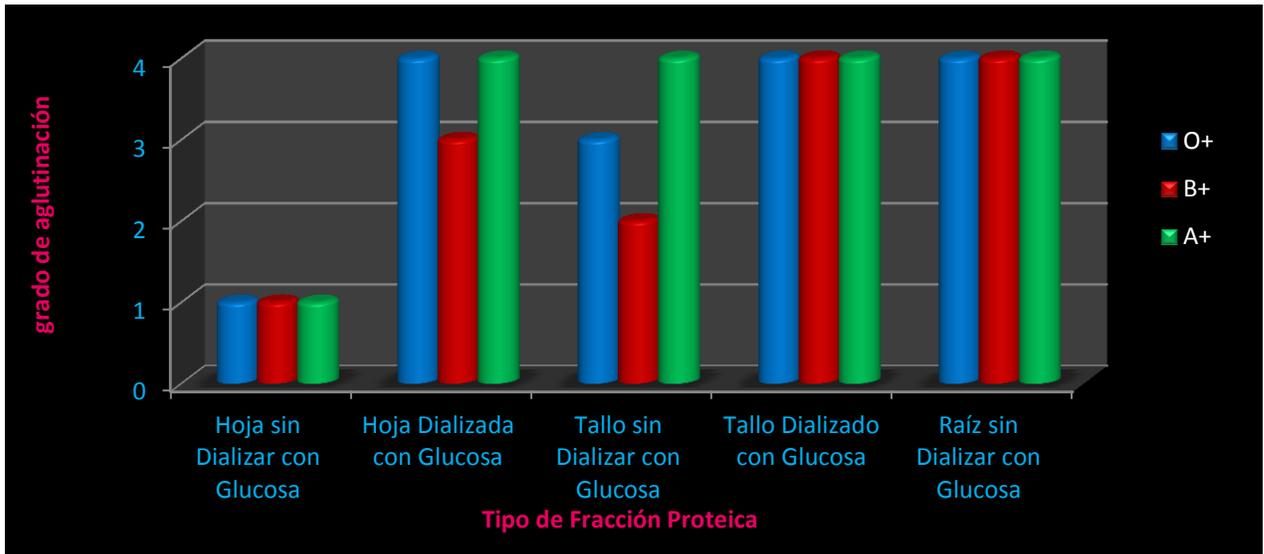
7.3.2.1. Pruebas de Hemaglutinación a concentración de 80 μg :

En la tabla 14 se muestran los diferentes patrones de aglutinación para cada tipo de fracción proteica y su variación de acuerdo al tipo sanguíneo.

Tipo de Fracción Proteica	O+	B+	A+	
Hoja sin dializar con glucosa				Aglutinación grado 1
Hoja dializada con glucosa				Aglutinación grado 2
Tallo sin dializar con glucosa				Aglutinación grado 3
Tallo dializado con glucosa				
Raíz sin dializar con glucosa				Aglutinación grado 4

Tabla 14- Comparación de la aglutinación de lectinas de *R. graveolens* a 80 μg

En la gráfica 4 se muestra que a una concentración de 80 µg las fracciones presentan un mejor efecto de aglutinación en los tres tipos sanguíneos, comparado con el ensayo anterior. Al encontrarse a la misma concentración se establece que la actividad de aglutinación es independiente de la concentración.

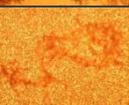
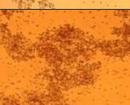


Graf. 4- Comparación de la Hemaglutinación de los diferentes grupos sanguíneos a 80µg de lectinas de *R. araveolens*.

La fracción de hoja con glucosa presenta una aglutinación variable, en el que se encuentra una gran diferencia en el grado de aglutinación de la fracción sin dializar respecto con la dializada, además estas lectinas presenta menor especificidad al tipo B⁺. La aglutinación de las fracciones con glucosa de tallo es alta; pero se presenta una variación para el tipo B⁺ y O⁺ en la fracción sin dializar, sin embargo se mantiene el alto grado de aglutinación para el tipo A⁺. En el caso de raíz muestra un alto grado de aglutinación en los tres tipos sanguíneos, no obstante lo observado al microscopio indica que para el tipo O⁺ es menos específica, en cambio para el tipo B⁺ su reconocimiento es mayor.

7.3.2.2. Pruebas de Hemaglutinación a concentración de 8 µg:

La tabla 15 muestra que a esta concentración no se presentan aglutinaciones 0 y 1 lo que indica que al disminuir la concentración se ejerce en mayor medida la actividad. Comparando a una concentración de 80 µg se pueden observar mismos patrones de aglutinación aunque se presenta una disminución de los aglomerados por la disminución en la interacción presente entre los eritrocitos.

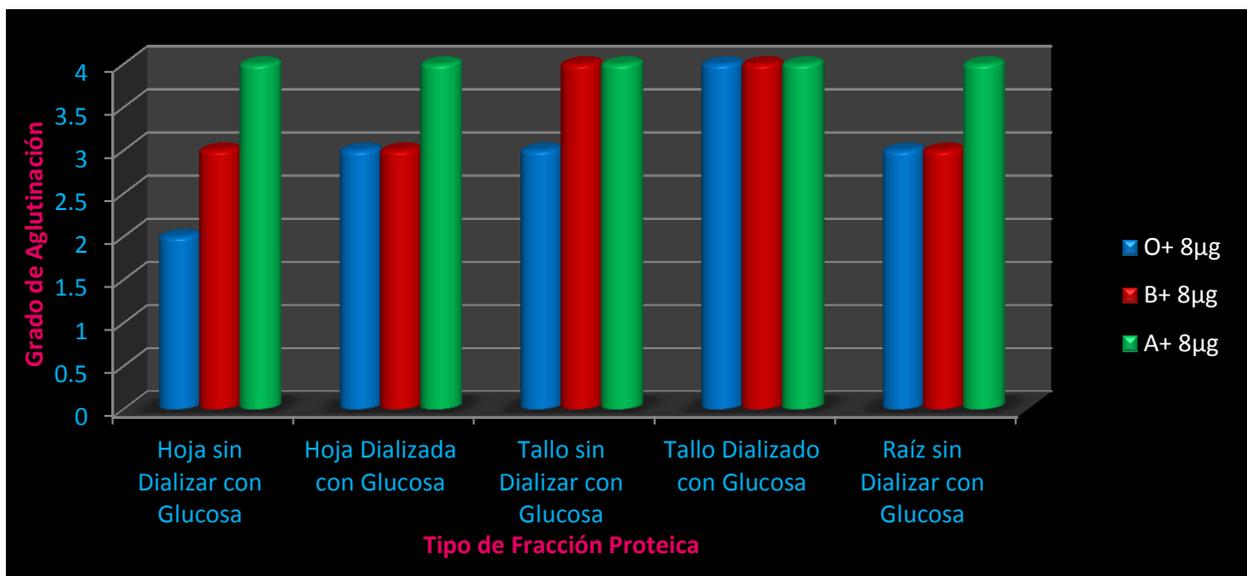
Tipo de Fracción Proteica	O+	B+	A+
Hoja sin dializar con glucosa			
Hoja dializada con glucosa			
Tallo sin dializar con glucosa			
Tallo dializado con glucosa			
Raíz sin dializar con glucosa			

Annotations:

- Hoja sin dializar con glucosa: Aglutinación grado 2
- Tallo sin dializar con glucosa: Aglutinación grado 3
- Tallo dializado con glucosa: Aglutinación grado 4

Tabla 15- Comparación de la aglutinación de lectinas de *R. graveolens* a 8 µg.

En la gráfica 5 observamos que a esta concentración se mantiene la aglutinación, en donde la concentración es importante para el efecto aglutinante. En donde la fracción de tallo sigue manteniendo altos grados de aglutinación para los tres tipos sanguíneos, seguida de las fracciones de raíz y hoja que presenta el mismo patrón de aglutinación, presentando un alto grado de aglutinación para el tipo A⁺.



Graf. 5- Comparación de la Hemaglutinación de los diferentes grupos sanguíneos a 8 µg de lectinas de *R. graveolens*.

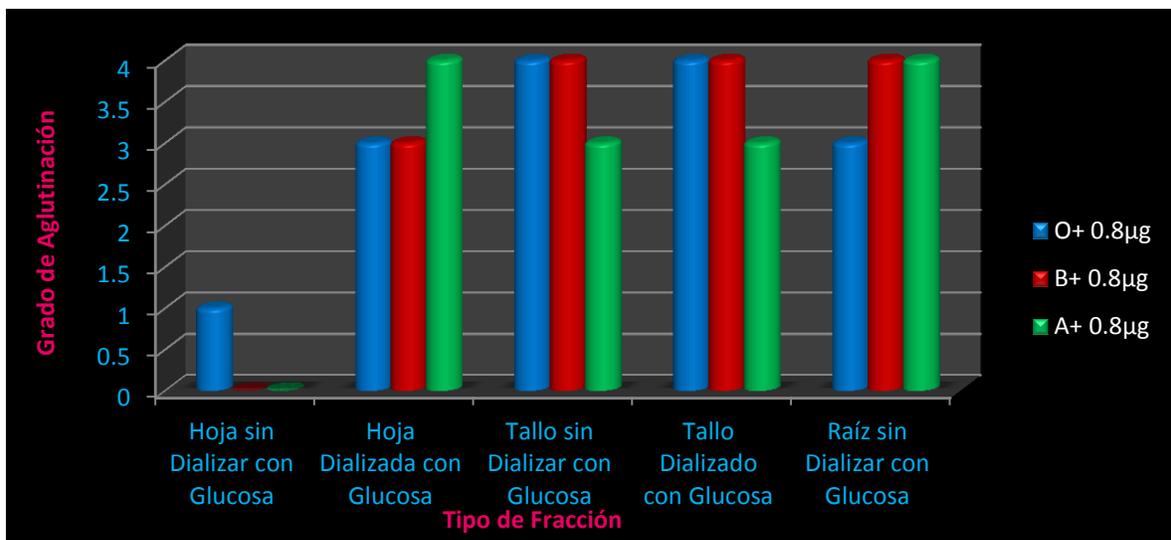
7.3.2.3. Pruebas de Hemaglutinación a concentración de 0.8 µg:

La tabla 16 muestra que se mantienen los patrones de aglutinación en el caso de tallo dializado, pero con un menor número de células comparado con las concentraciones anteriores.

Tipo de Fracción Proteica	O+	B+	A+	
Hoja sin dializar con glucosa				Aglutinación grado 0
Hoja dializada con glucosa				Aglutinación grado 3
Tallo sin dializar con glucosa				Aglutinación grado 2
Tallo dializado con glucosa				Aglutinación grado 4
Raíz sin dializar con glucosa				

Tabla 16- Comparación de la aglutinación de lectinas de *R. graveolens* a 0.8 µg

La grafica 6 muestra que las fracciones que presentan un mejor grado de aglutinación en los tres tipos sanguíneos a una concentración de 0.8 µg son las fracciones de tallo seguida por raíz, esto nos indica que para estas lectinas su actividad es independiente de la concentración, mientras que para la fracción de hoja se presenta una disminución de su actividad posiblemente a diferencias en el número de dominios de reconocimiento en comparación con las lectinas de otros órganos. El tipo sanguíneo que presento una mejor respuesta a esta concentración es el O⁺, en tanto el tipo A⁺ presento una disminución al presentarse un menor número de lectinas afines a sus antígenos. Las lectinas de hoja presentan una mayor actividad aglutinante hacia el tipo A⁺, pero las fracciones sin glucosa presentan un grado importante para el tipo O⁺. En el caso de las fracciones de tallo las lectinas de este órgano tienen una menor actividad en el tipo A⁺, mientras que para O⁺ y B⁺ la aglutinación se da sin importar la concentración. Para el caso de las lectinas de raíz estas presentan una actividad aglutinante grado 4, sin embargo para el tipo O⁺ estas lectinas presentan una menor especificidad.



Graf. 6-Comparación de la Hemaglutinación de los diferentes grupos sanguíneos a 0.8 µg de lectinas de *R. graveolens*.

7.3.2.4. Comparación de la Actividad Hemaglutinante de lectinas de *Ruta graveolens* a diferentes concentraciones.

Los datos obtenidos de las pruebas de hemaglutinación tomando 50 µl sin tomar en cuenta la concentración sugirieron que la actividad aglutinante de las lectinas era independiente de la concentración por lo que se decidió hacer pruebas a tres diluciones 80, 8 y 0.8 µg para verificar si se presentaba algún cambio en el grado de aglutinación. Se establece que en su mayoría no se presentan cambios representativos en los patrones de aglutinación, sin embargo si existe una disminución en la relación de la cantidad de células aglutinadas conforme disminuye la concentración.

A partir de lo obtenido en la tabla 17 se muestra la comparación en la actividad aglutinante conforme disminuye la concentración, evidenciándose que en la mayoría de los casos a una concentración media se incrementa el efecto aglutinante, posiblemente a la disminución en la interacción lectina-lectina lo que posibilita mayor interacción lectina-antígeno.

La tabla 18 muestra la actividad aglutinante que presenta cada fracción, determinado a partir de Unidad de Hemaglutinación (UHA) y la Actividad Especifica (AE), generadas por medio de las diluciones realizadas para este ensayo.

En la gráfica 7 se muestra la comparación de la actividad aglutinante presentada por las diferentes fracciones proteicas, esto conforme varia la concentración y el tipo sanguíneo.

Tipo de Fracción Proteica	O+			B+			A+		
	80µg	8µg	0.8µg	80µg	8µg	0.8µg	80µg	8µg	0.8µg
Hoja sin dializar con glucosa									
Hoja dializada con glucosa									
Tallo sin dializar con glucosa									
Tallo dializado con glucosa									
Raíz sin dializar con glucosa									

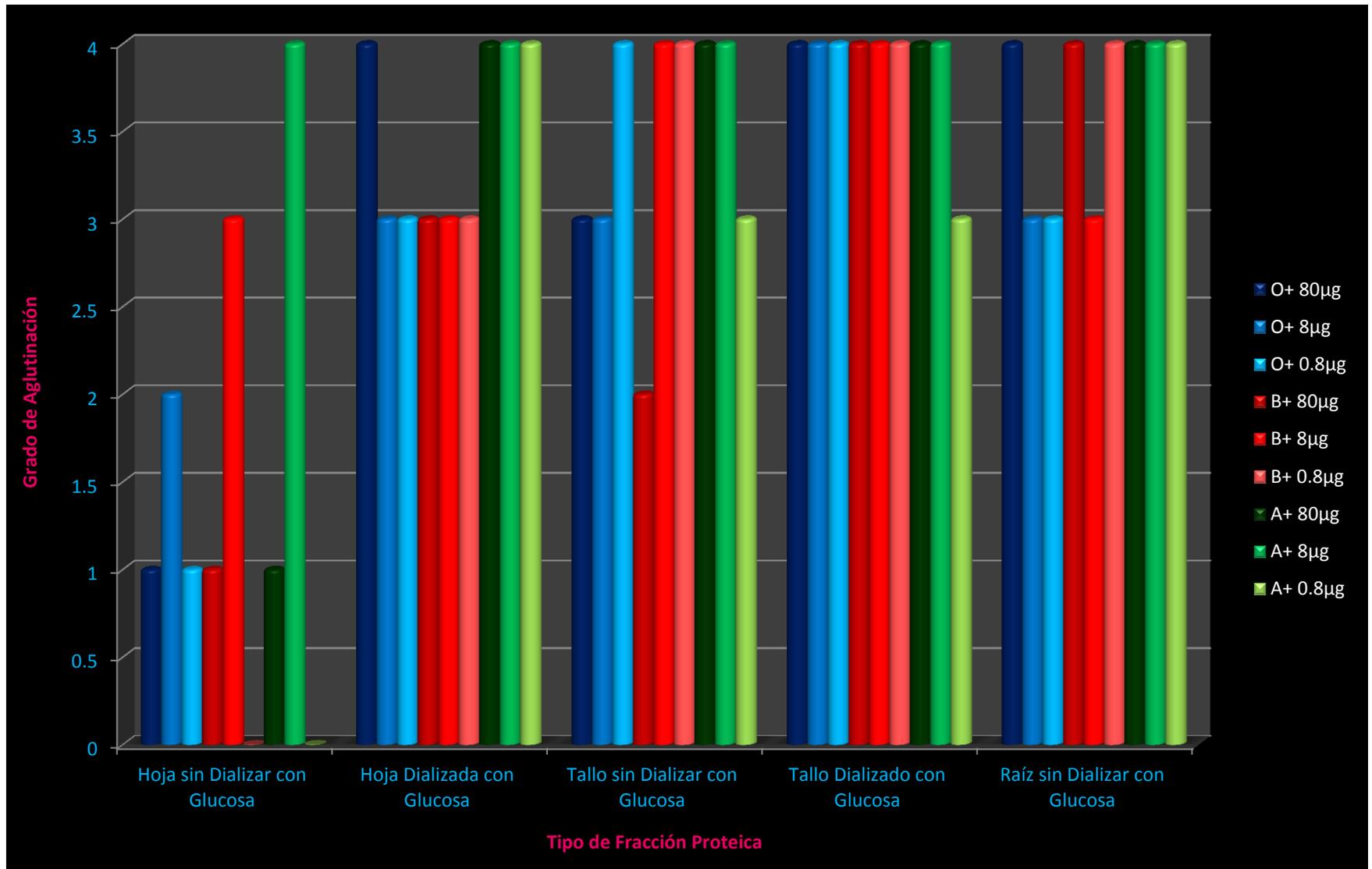
Tabla 17- Comparación de la aglutinación de lectinas de *R. graveolens* a diferentes disoluciones con concentración igual. Se muestra las variaciones en la aglutinación conforme cambia la concentración y como se presenta en cada tipo sanguíneo.

Fracción Proteica	O+				B+				A+			
	UHA	AE	[] mg	# disoluciones	UHA	AE	[] mg	# disoluciones	UHA	AE	[] mg	# disoluciones
Hoja sin dializar con glucosa	256±9	3200±25	.08±.0008	8	32±4	400±25	.08±.0008	8	256±4	3200±25	.08±.0008	8
Hoja dializa con glucosa	1024±16	2860.33±5.58	.358±.0008	10	1024±16	2860.33±5.58	.358±.0008	10	1024±16	2860.33±5.58	.358±.0008	10
Tallo sin dializar con glucosa	512±16	3908.39±15.26	.131±.0008	9	512±16	3908.39±15.26	.131±.0008	9	512±16	3908.39±15.26	.131±.0008	9
Tallo dializado con glucosa	1024±16	3893.53±7.6	.263±.0008	10	1024±16	3893.53±7.6	.263±.0008	10	1024±16	3893±7.6	.263±.0008	10
Raíz sin dializar con glucosa	512±16	3065.86±11.97	.167±.0008	9	512±16	3065.86±11.97	.167±.0008	9	512±16	3065.86±11.97	.167±.0008	9

Tabla 18. Actividad Aglutinante de las distintas fracciones proteicas de lectinas de *R. graveolens* para cada tipo sanguíneo. UHA (Unidad de Hemaglutinación), AE (Actividad Específica), [] concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación.

La UHA y AE se determinaron por las siguientes formulas:

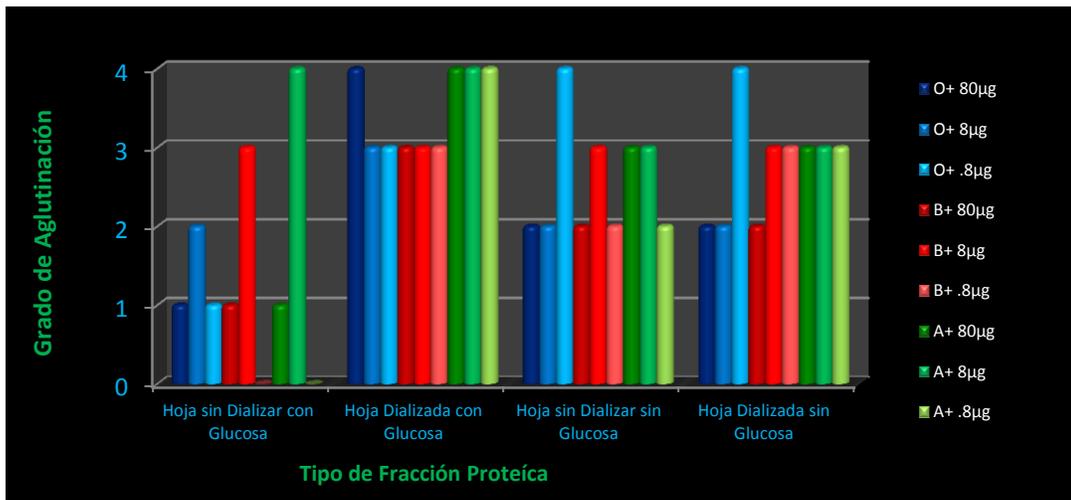
$$UHA = 2^n \quad AE = \frac{2^n}{mg}$$



Graf. 7- Comparación de la Hemaglutinación a diferentes concentraciones de lectinas de *R. graveolens*

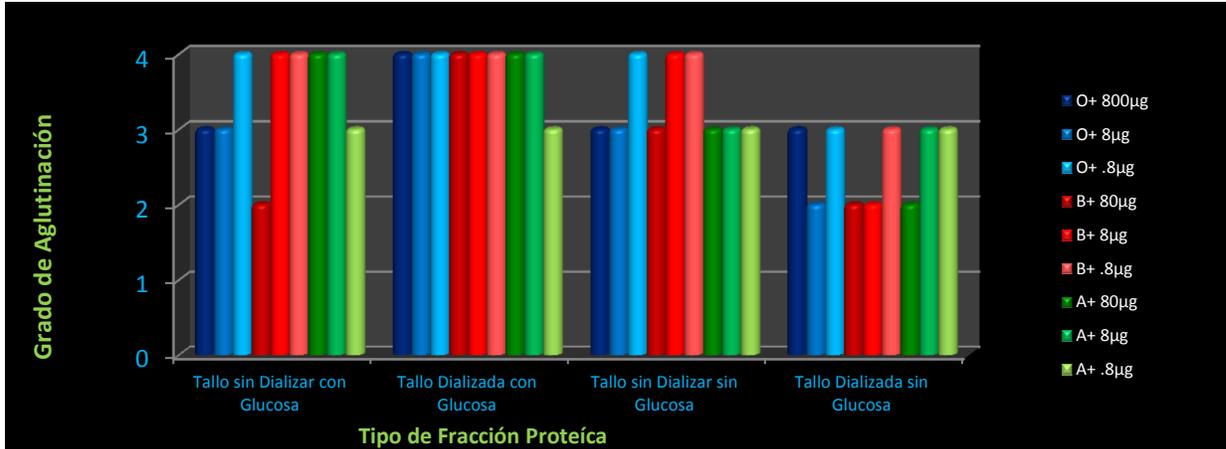
El grafico 7 muestra que en la mayoría de los casos la actividad aglutinante es independiente de la concentración, siendo preponderante para el tipo A⁺, mientras que para O⁺ se presenta una gran variación en el reconocimiento que tienen las lectinas. Pero para el caso de hoja sin dializar con glucosa presenta patrones de aglutinación variados en comparación con las otras fracciones, ya que a una concentración media se presenta una mejor respuesta de aglutinación.

Se observa en el grafico 8 que la actividad de aglutinación de la fracción de hoja sin dializar está en relación con la concentración, mientras la fracción dializada presenta una actividad independiente de la concentración, con una mayor especificidad al tipo A⁺.



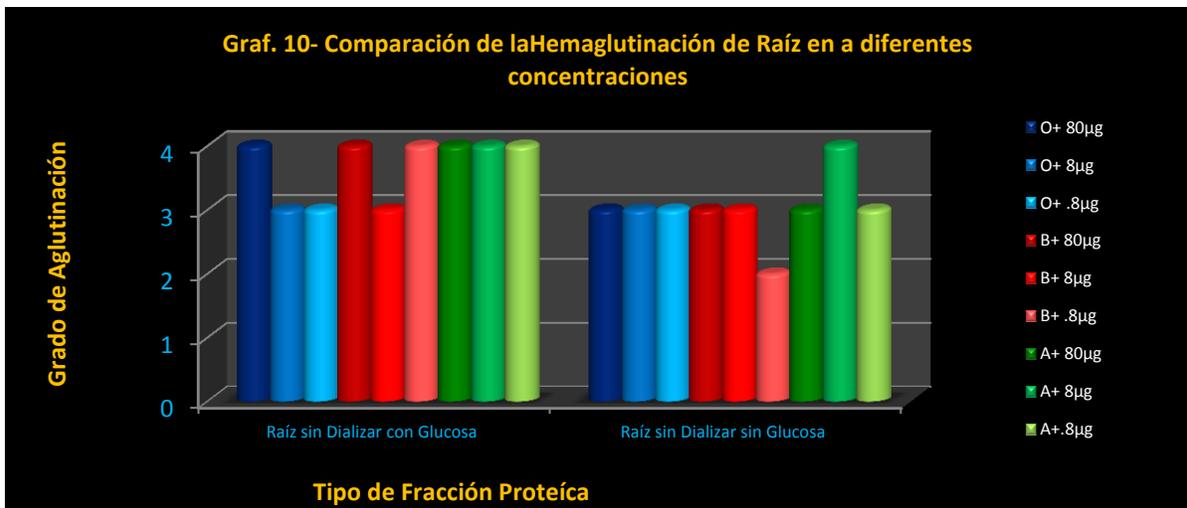
Graf. 8- Comparación de la Hemaglutinación de Hoja en diferentes concentraciones

El grafico 9 muestra que en todas las pruebas la fracción de tallo dializado presenta la máxima actividad aglutinante, pero con una menor afinidad al tipo A⁺ y queda manifestado que la actividad es independiente de la concentración.



Graf. 9- Comparación de la Hemaglutinación de Tallo en diferentes concentraciones

En la fracción de raíz se observa la especificidad al tipo A⁺ y en menor medida al tipo O⁺ donde es dependiente de la concentración, mientras que para el tipo B⁺ el efecto relacionado con la concentración es variable, lo que se aprecia en el grafico 10.



Graf. 10- Comparación de la Hemaglutinación de Raíz en diferentes concentraciones

7.4. Electroforesis SDS-PAGE

Se realizó una electroforesis para determinar el peso aparente de las proteínas obtenidas para cada uno de los órganos de la planta y un monitoreo de los procesos de semipurificación hasta la obtención de fracciones ricas en lectinas.

7.4.1. De Hoja de *R. graveolens*

En la figura 16 se muestra la electroforesis de hoja para monitorear cada uno de los procesos de semipurificación, esto a través de la precipitación de proteínas por el método TCA-acetona-DTT de cada una de las fracciones obtenidas. Con 2.5 µg en todos los carriles.

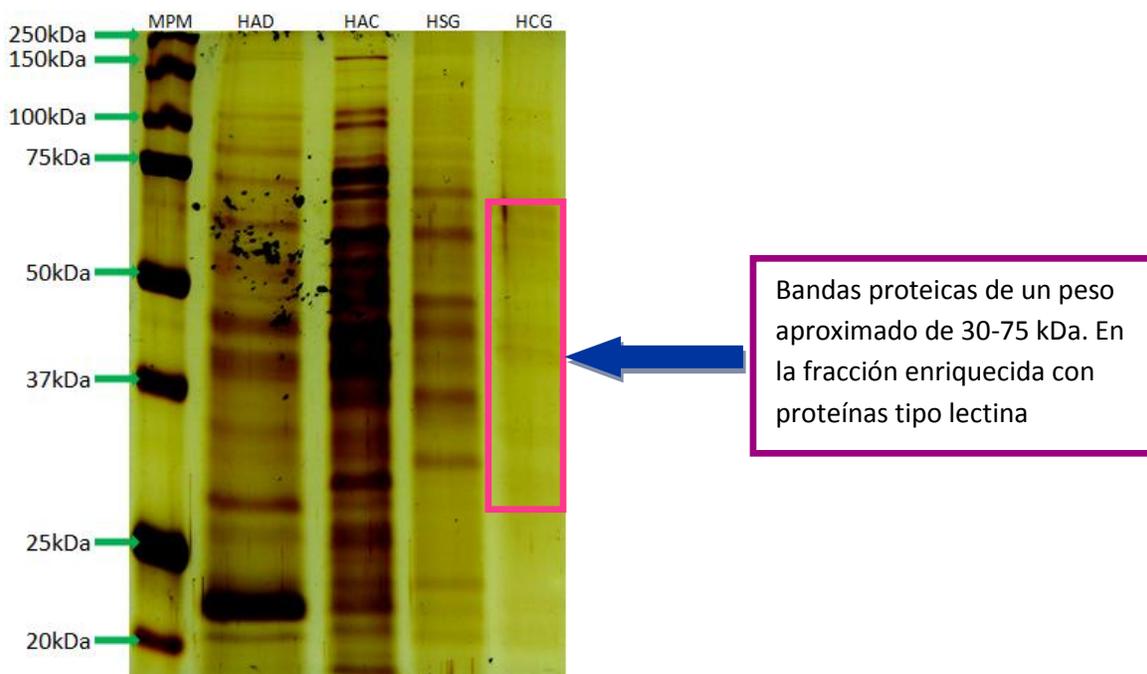


Fig. 16- Electroforesis SDS-PAGE teñida con plata de extractos precipitados de hoja de *R. graveolens*. MPM (marcador de peso molecular), HDA (hoja antes diálisis), HAC (hoja antes cromatografía), HSG (Hoja son glucosa) y HCG (hoja con glucosa).

Podemos observar que conforme se da cada uno de los procesos de semipurificación se presenta una pérdida y enriquecimiento de algunas bandas como en el caso de HSG en donde es visible la pérdida de bandas comparado con HAC. Finalmente en HCG se muestra la obtención de varias bandas que presentan un peso entre 30 a 75 kDa que se encuentran dentro del rango de las lectinas.

7.4.2. De Tallo de *R. graveolens*

En la figura 17 se muestra la electroforesis de tallo para monitorear cada uno de los procesos de semipurificación, esto a través de la precipitación de proteínas por el método TCA-acetona-DTT de cada una de las fracciones obtenidas. Con 2.5 µg en todos los carriles.

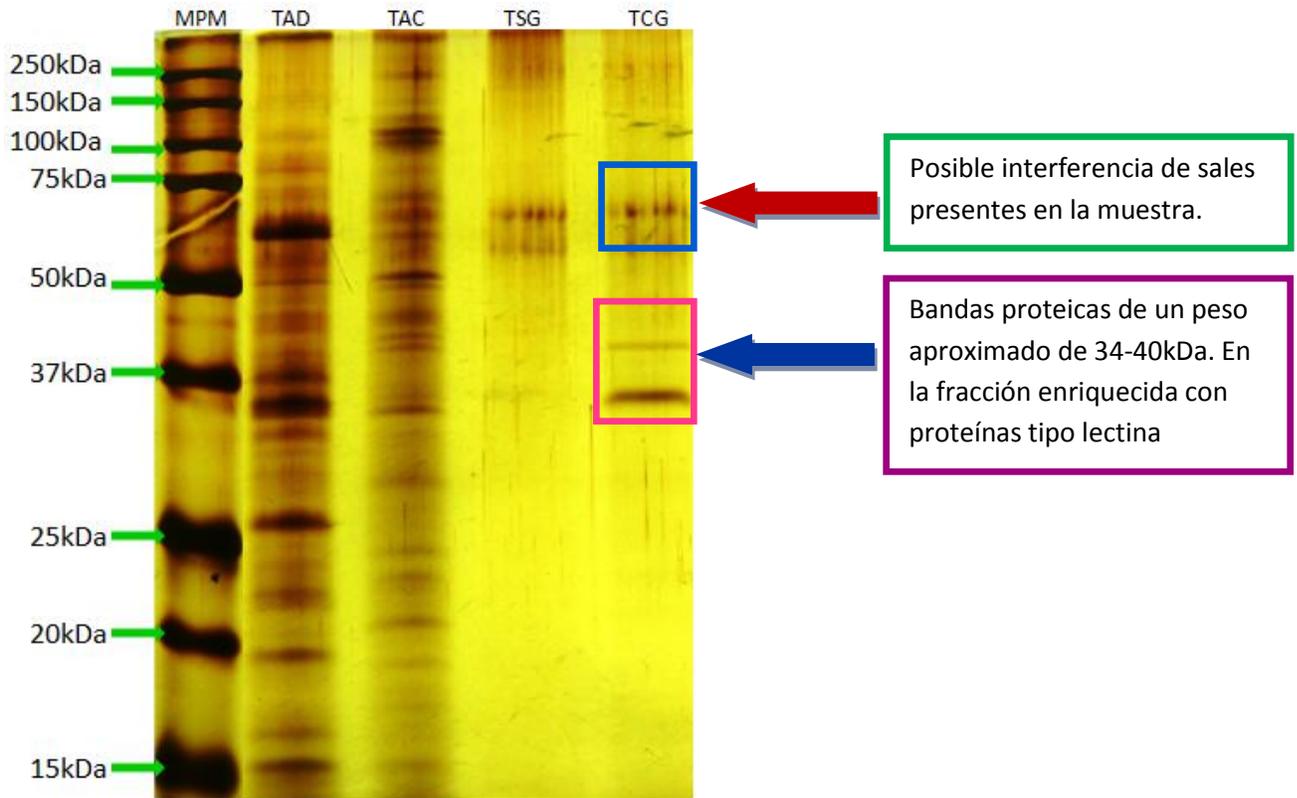


Fig. 17- Electroforesis SDS-PAGE teñida con plata de extractos precipitados de Tallo de *R. graveolens*. MPM (marcador de peso molecular), TDA (tallos antes diálisis), TAC (tallos antes cromatografía), TSG (tallos con glucosa) y TCG (Tallo con glucosa).

Es posible observar que en cada uno de los procesos de semipurificación se van perdiendo y enriqueciendo algunas bandas hasta la obtención de una fracción rica en dos bandas como se muestra en TCG, donde las bandas tienen un peso entre 34 y 40 kDa, indicando un posible enriquecimiento de proteínas tipo lectina.

7.4.3. De Raíz de *R. graveolens*

En la figura 18 se muestra la electroforesis de tallo para monitorear cada uno de los procesos de semipurificación, esto a través de la precipitación de proteínas por el método TCA-acetona-DTT de cada una de las fracciones obtenidas. Con 2.5 µg en todos los carriles.

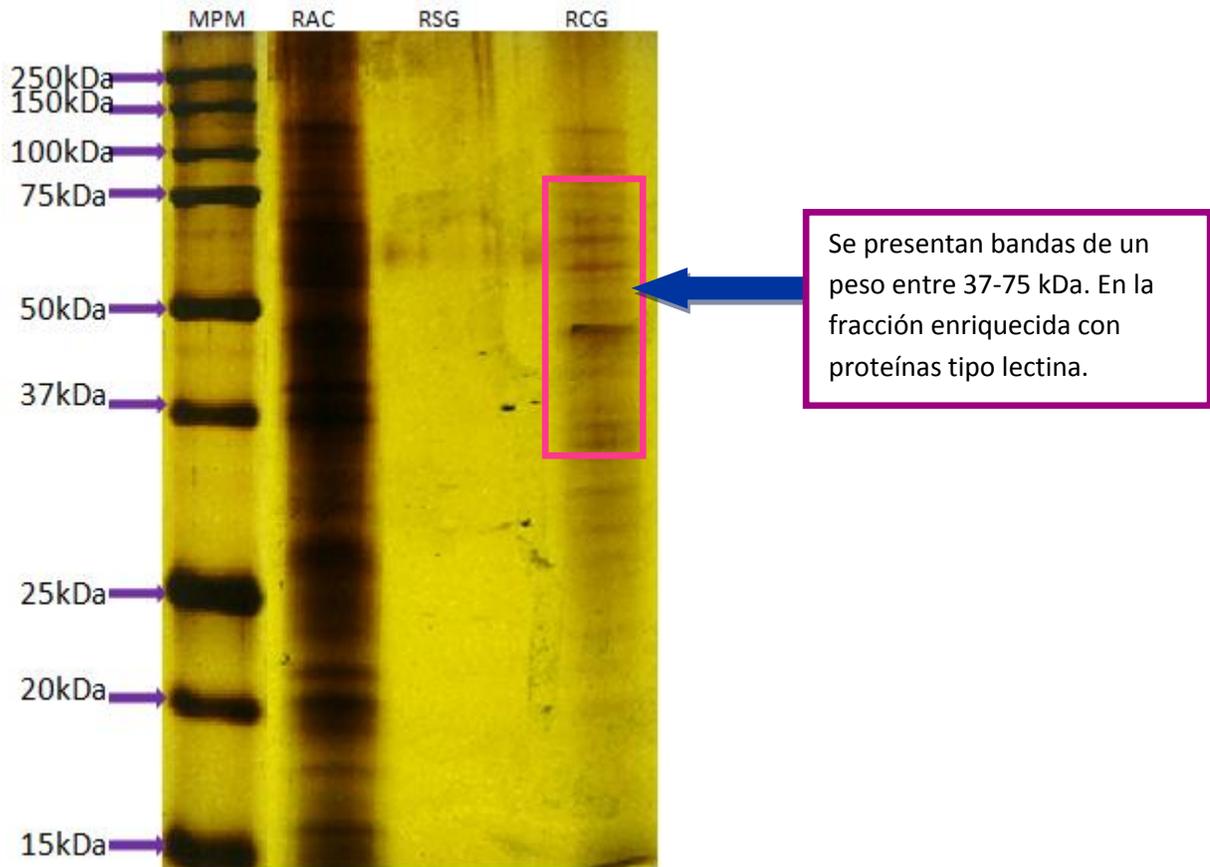


Fig. 18- Electroforesis SDS-PAGE teñida con plata de extractos precipitados de Raíz de *R. graveolens*. MPM (marcador de peso molecular), RAC (raíz antes cromatografía), RSG (raíz son glucosa) y RCG (Raíz con glucosa).

A una concentración de 2.5 µg se observa el proceso de purificación comparando RCA y RCG, donde se presenta un enriquecimiento de proteínas con un peso de 35-73 kDa, indicando que posiblemente se trata de proteínas tipo lectina. Cabe destacar que se presentan varias bandas sin embargo las de mayor interés son aquellas que se encuentran en mayor proporción, ya que con los procesos de semipurificación se trató de obtener una fracción rica en lectinas.

7.4.4. De fracciones liofilizadas de *R. graveolens*:

Para obtener una mejor definición de las bandas proteicas, los extractos enriquecidos con lectinas fueron sometidos a una segunda diálisis y posteriormente fueron liofilizados.

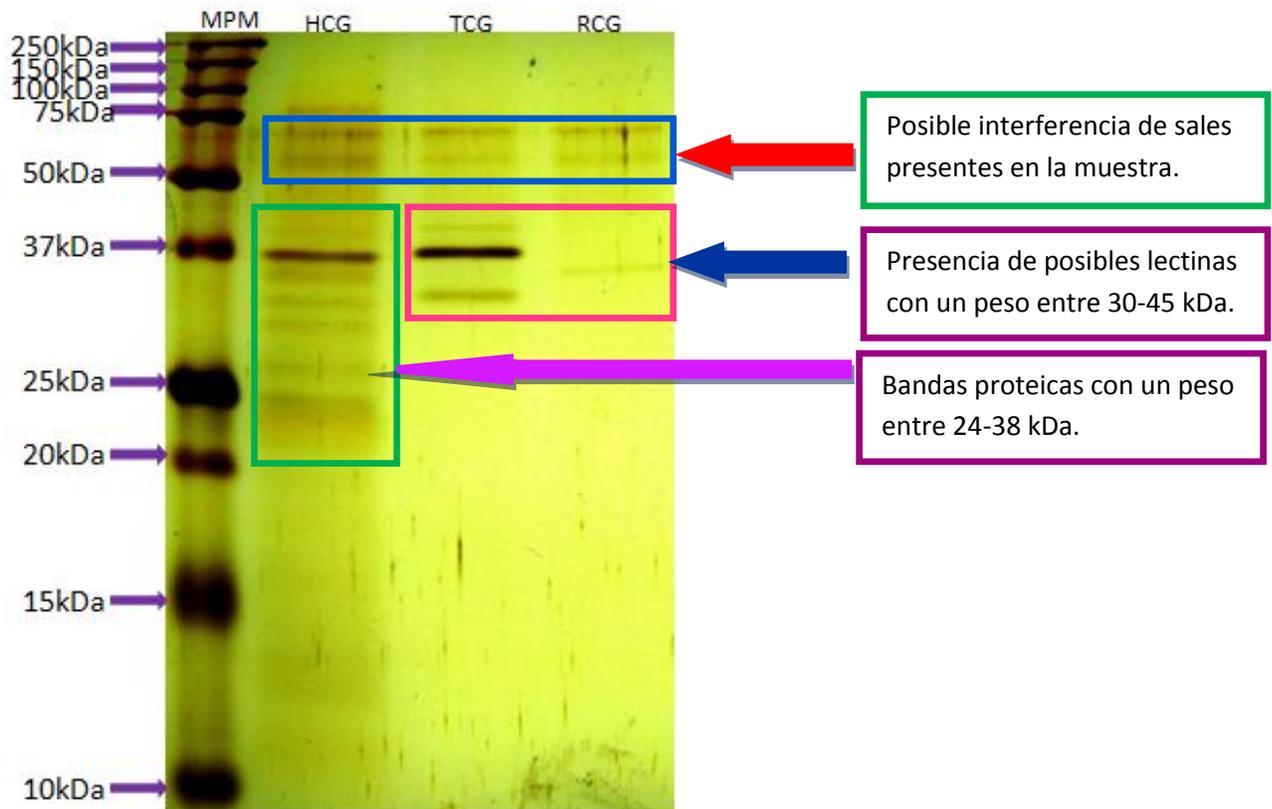


Fig. 19- Electroforesis SDS-PAGE teñida con plata de extractos liofilizados de *R. graveolens*. MPM (marcador de peso molecular), HCG (hoja con glucosa), TCG (tallo con glucosa) y RCG (Raíz con glucosa).

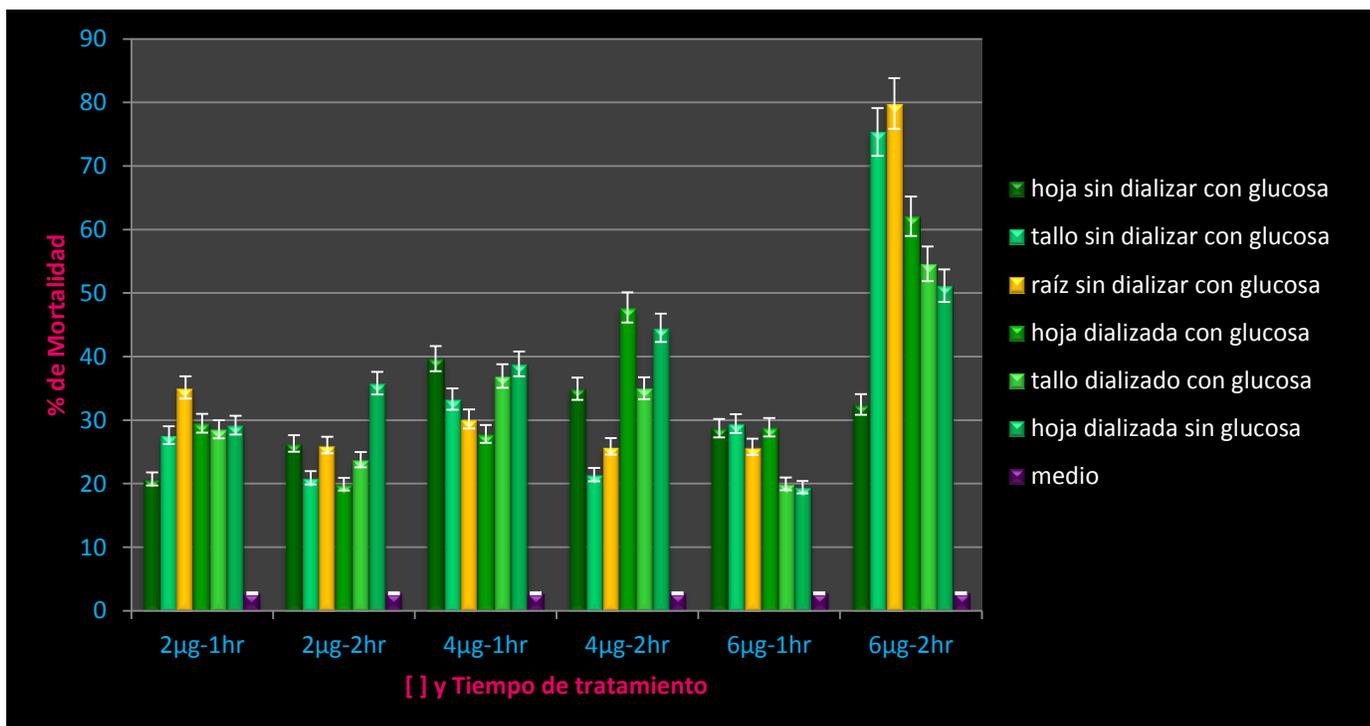
Podemos observar en la fig. 21 que los extractos se encuentran semipurificados en el caso de tallo y raíz al presentarse bandas definidas y en una concentración adecuada; mientras en el caso de hoja observamos un repertorio de bandas. Lo anterior indica que en la *R. graveolens* posiblemente se presenta una mezcla de proteínas tipo lectina con un peso entre 24-38 kDa.

7.5. Pruebas de citotoxicidad en linfocitos:

Para verificar la citotoxicidad que pueden presentar las lectinas extraídas de *R. graveolens* en sistemas *in vivo* se realizaron pruebas de citotoxicidad en linfocitos humanos, linfocitos de ratones sanos y de ratones que desarrollaron tumores en presencia de óxido de níquel. Donde fueron utilizadas solo las fracciones con glucosa y como control negativo la fracción de hoja dializada sin glucosa.

7.5.1. Pruebas de citotoxicidad en Linfocitos Humanos

En el grafico 11 observamos el efecto es dependiente de la concentración, sin embargo el tiempo es preponderante para incrementar el efecto, ya que el mayor grado de citotoxicidad en linfocitos humanos es a una concentración de 6 μg a 2 hrs, la raíz presenta un mayor porcentaje de citotoxicidad y en menor medida las fracciones de hoja.



Graf. 11- Citotoxicidad de Linfocitos Humanos por Lectinas de *R. graveolens*

Se presenta un porcentaje de citotoxicidad para las fracciones de hoja en linfocitos humanos: a una concentración de 2 µg la citotoxicidad es del 27.6%, a 4 µg es del 46.33% y a 6 µg 48.57%. La LD50 de las lectinas de hoja es aproximadamente de 4-5 µg.

El efecto citotóxico promedio de la fracción de tallo a 2 µg es 26.59%, a 4 µg es 31.67% y para 6 µg 44.83%. Su citotoxicidad es media, con una LD50 de 5-6 µg para la fracción dializada.

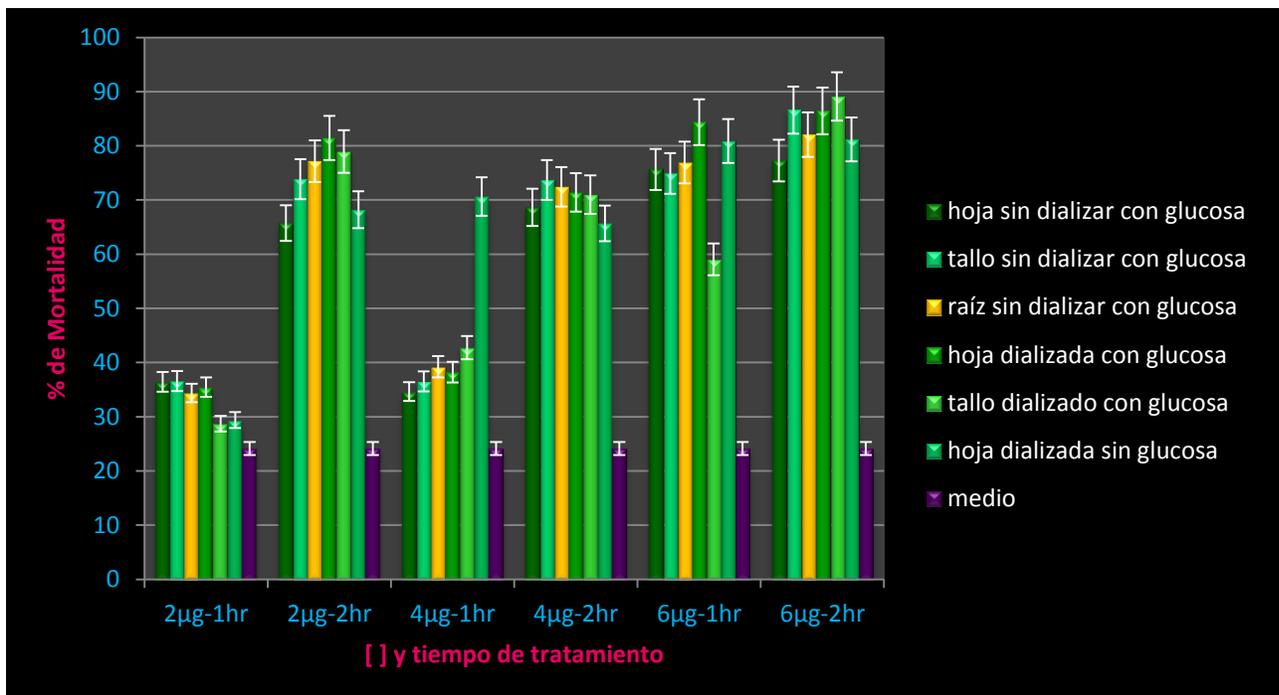
Los patrones de citotoxicidad de las fracciones de raíz muestran que conforme aumenta la concentración aumenta la citotoxicidad y conforme aumenta el tiempo disminuye, exceptuando para 6 µg a las 2 hrs. Para 2 y 4 µg el promedio de la citotoxicidad es de 30.6% y para 6 µg es del 52.80%. Su LD50 es de 6 µg.

7.5.2. Pruebas de citotoxicidad en linfocitos de ratón:

Para determinar si el efecto citotóxico de las lectinas extraídas de *R. graveolens* pueden variar de acuerdo a la especie se realizaron los ensayos citotóxicos en linfocitos de ratón extraídos de bazo, sumado a esta variación se quiso determinar si existía alguna modificación de la actividad dependiendo de las condiciones en las que se encuentra un sistema *in vivo* por lo cual se realizaron los ensayos en ratones a los que se les indujo carcinogénesis.

7.5.2.1. Pruebas de citotoxicidad en linfocitos de ratón sano:

En el grafico 12 se muestran los patrones de la citotoxicidad que presentan las lectinas de ruda en linfocitos de ratones sanos, observando discrepancias en comparación con los linfocitos humanos ya que las fracciones más citotóxicas son las de tallo, seguidas por las de hoja y finalmente raíz, esta última en el caso de humano fue la que presento un mayor efecto citotóxico. Es observable que conforme aumenta la concentración y el tiempo de tratamiento aumenta el efecto citotóxico.



Graf. 12- Citotoxicidad de Lectinas en ratones sanos

El promedio de la citotoxicidad para las fracciones de hoja a 2 µg para 2 hrs es del 73.6%, para 4 µg 70% y para 6 µg es del 80.5%. Por lo tanto la LD50 en linfocitos de ratón es de 3 µg. Para tallo el promedio de la citotoxicidad a 2 µg es para 1hr 32.67% y a 2 hr 76.39%, para 4 µg 39.66% y 72.35% respectivamente, por ultimo para 6 µg es del 66.97% y 87.85%. Mostrando que la LD50 es de 2 µg. Mientras para raíz el promedio para 2 µg a 1 hr es del 34.38% y para 2 hrs del 77.17%, a 4 µg es del 39.22% y 71.43% respectivamente, para 6 µg en ambos tiempos es aproximadamente del 79.45%; con una LD50 de 4 µg.

7.5.2.2. Pruebas de citotoxicidad en linfocitos de ratón con tumor:

Para este ensayo se llevó a cabo la inducción tumorigénica de ratones CD1 con óxido de níquel, dejando actuar durante 5 meses hasta la aparición del tumor. De esta inoculación se obtuvieron tumores de aproximadamente 1-2 cm de diámetro, presentes en las axilas y patas traseras de los ejemplares. En algunos casos se presentó metástasis en las patas traseras. Hubo diferencias en el tamaño de los órganos comparado con ratones sanos, como en el caso del bazo se incrementó 3 veces, además de anomalías en el hígado ya que se presentó una disminución en el tamaño e incremento de la cantidad de sangre. En cuanto a los linfocitos se presentaron diferencias en el tamaño del núcleo, presentaron la membrana rugosa, además del incremento de la población linfocítica aproximadamente al doble.

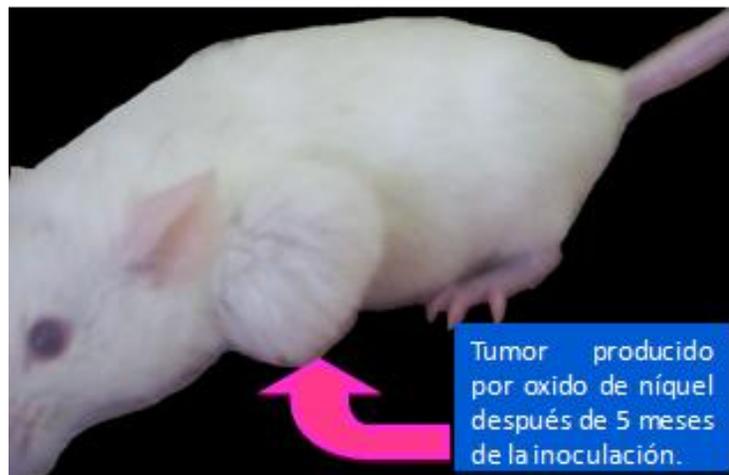


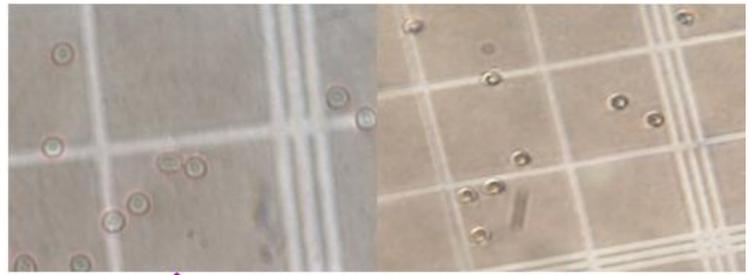
Fig. 20- Ratón CD1 con tumor en la axila producido por óxido de níquel



Fig. 21- Extirpación de tumor producido por óxido de níquel en ratón CD1.



Fig.22- Tumores extraídos de ratones tratados con oxido de níquel

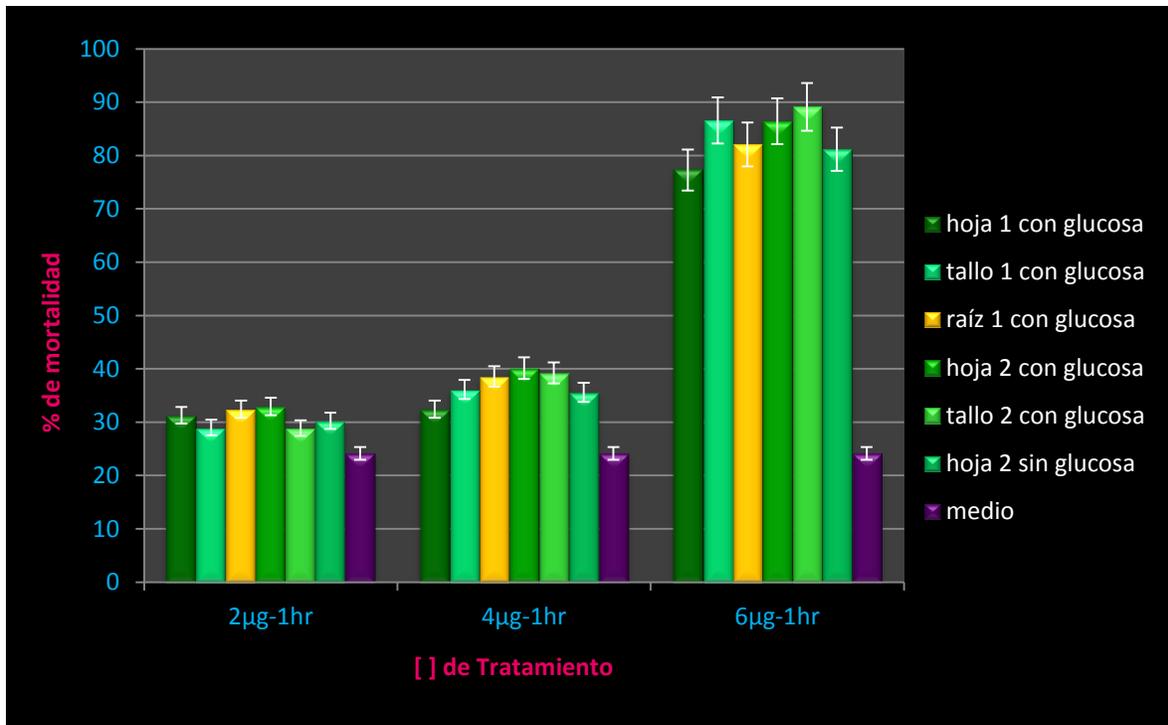


Linfocitos de ratones con tumores:
 •Membrana rugosa
 •Mayor tamaño
 •Mayor tamaño de núcleo

Linfocitos de ratones sanos

Fig. 23- Comparación entre linfocitos de ratones sanos y ratones inducidos con oxido de níquel

Se observa en la gráfica 13 que el efecto citotóxico en linfocitos de ratones con tumor a una concentración de 6 μg se incrementa el efecto al doble, siendo dependiente de la concentración. En este ensayo se vuelve a repetir la especificidad que presentan las lectinas de tallo en comparación con los linfocitos humanos que tienen un mayor efecto por lectinas de raíz. Por ende el mayor efecto citotóxico está dado por las fracciones de tallo, seguida por raíz y finalmente por hoja.



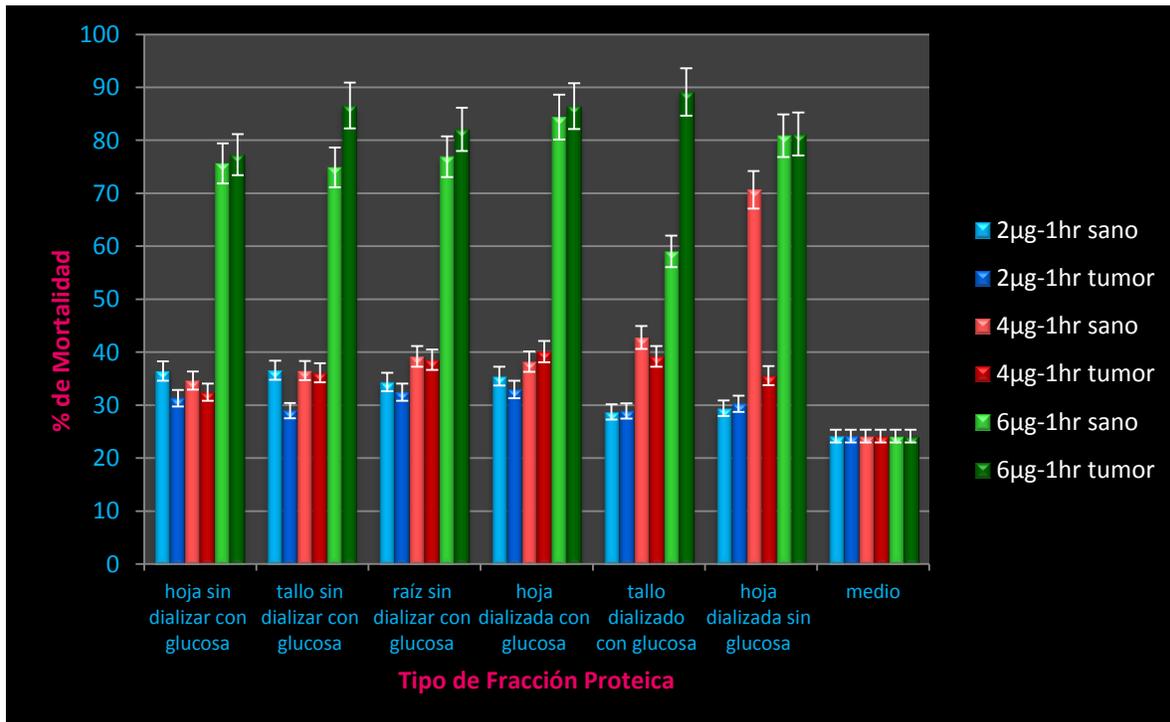
Graf. 13- Citotoxicidad de Lectinas en ratones con Tumor

En las tres partes vegetales podemos observar que el porcentaje de viabilidad está en relación con la concentración, sin embargo para las concentraciones 2 y 4 µg la variación en su efecto es mínima, en comparación con el aumento aproximado de 2.5 veces que se presenta a una concentración de 6 µ. Cabe mencionar que a pesar de que las fracciones de tallo presentan un mayor grado de citotoxicidad se presenta una diferencia mínima con respecto a las fracciones de hoja y raíz. Para todos los casos se establece que la LD50 promedio es de 5 µg.

7.5.2.3. Comparación de la citotoxicidad en ratones sanos y con tumores:

Por las diferencias que presentaron los ratones con tumores respecto a los ratones sanos se realizó una comparación de la citotoxicidad que se presentó en cada caso.

En grafica 14 se observa que se mantiene el mismo comportamiento en la citotoxicidad en ambos casos, sin embargo si existe una pequeña diferencia dado que a una concentración de 6 μg los ratones con tumor son más sensibles a las lectinas. También es observable que se presenta una discrepancia para la fracción de tallo dializado con glucosa en la concentración de 6 μg donde se presenta una disminución del 30% en los ratones sanos comparado con los ratones con tumor; de igual forma para la fracción de hoja sin glucosa a una concentración de 4 μg los ratones sanos presenta una mayor sensibilidad a estas proteínas.

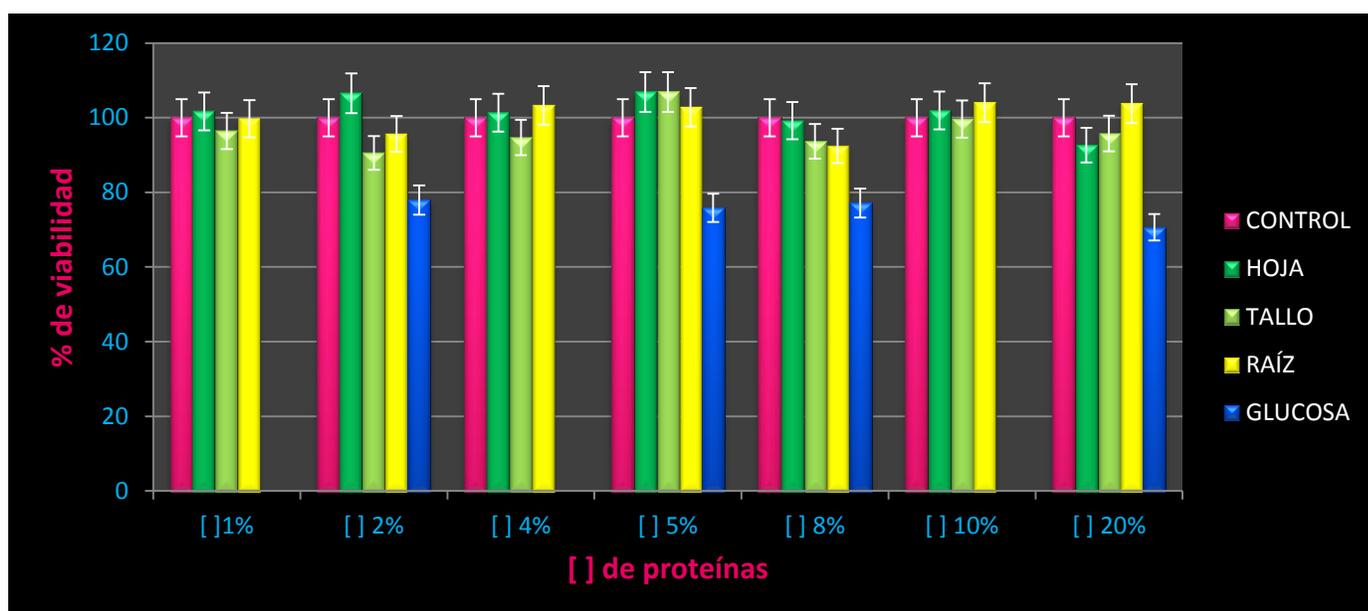


Graf. 14- Comparación de la citotoxicidad en linfocitos de ratones sanos y con tumor

Las fracciones de hoja presenta el mismo patrón de citotoxicidad al no existir una gran variación en los porcentajes, la fracción dializada es la que presenta un mayor efecto en los ratones con tumor. El efecto citotóxico que se presenta con las fracciones de tallo en concentraciones altas es mayor en los ratones con tumor ya que tienen una mayor sensibilidad a estas, pero a concentraciones más bajas el efecto es similar para ambos casos. El comportamiento citotóxico de la fracción de raíz, en ambos casos presenta los mismos valores promedio del porcentaje de citotoxicidad. Pero se presenta un mayor efecto de la citotoxicidad en los ratones con tumor a una concentración de 4 µg. Se determina que en ambos casos la LD50 en promedio se encuentra entre 3-5 µg de lectinas de *R. graveolens*.

7.5.3. Pruebas de citotoxicidad en células MCF-7 de cáncer de mama:

Las pruebas en células tumorales se realizaron en células de la línea MCF-7 de cáncer de mama en donde se aplicaron los extractos con glucosa en concentraciones 1, 2, 4, 5, 8, 10 y 20%, como control negativo glucosa 0.1M en concentraciones de 2, 5, 8 y 20%; durante 48 hrs de tratamiento. En el grafico 15 muestra los porcentajes de citotoxicidad obtenidos para cada caso. Observamos que a concentraciones bajas estas moléculas presentan capacidad mitogénica sobre células MCF-7, ya que al comparar con el control se presenta un incremento aproximado del 4%, mientras que a concentraciones más altas se presenta una disminución del 10%.



Graf. 15- Citotoxicidad de lectinas de *Ruta graveolens* en células MCF-7 de cancer de mama

La fracción que presenta un mayor efecto en la mayoría de los casos es tallo ya que presenta una disminución celular aproximada del 2-10%, exceptuando a una concentración del 5%; posteriormente la fracción de raíz es la que presenta un efecto, sin embargo es mínimo en comparación con la fracción anterior ya que solo presenta una disminución del 4.5%. Finalmente la fracción que presenta un efecto mitogénico en la mayoría de las concentraciones es hoja posiblemente a una menor concentración de proteínas o a la variación en el reconocimiento que presentan, por tanto se deduce que no presenta un efecto citotóxico.

VIII. DISCUSIÓN:

Se le han atribuido varias propiedades medicinales a la ruda contra diferentes enfermedades, esto por la presencia de moléculas como alcaloides, fenoles, aminoácidos, furanocumarinas, saponinas y flavonoides, dentro de los cuales se encuentra la Ruta 6 que se ha reportado induce la muerte celular en cáncer de cerebro, además de estos compuestos se ha reportado la presencia de lectinas vegetales (Hernández, 2011).

La actividad antitumoral que presentan las lectinas vegetales se establece a partir de las investigaciones de los 70s, donde se establece que las lectinas que presentan una mejor actividad, tanto *in vivo* como *in vitro*, son las de *Ricinus communis* (RCA), *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Canavalina ensiformis* (Con A) y *Viscum álbum* (VCA) (Castillo y Abdullaev, 2005).

Nuestro estudio se basó en las partes aéreas y subterráneas de la ruda donde a partir de una extracción salina encontramos una concentración total de proteínas para hoja del 3.34%, tallo 2.55% y raíz 1.51%. Del total proteico los extractos dializados muestran que tallo presenta un 52.6% de proteínas con un peso menor a 3 kDa, mientras que hoja un 35.73%; donde lo reportado indica que el peso molecular de lectinas vegetales se encuentra entre 12-65 kDa (Hernández, 2005). Al finalizar cada uno de los procesos de semipurificación (diálisis y cromatografía) se obtuvo un rendimiento de lectinas respecto a la concentración total para hoja del 6.96%, tallo 12.77% y raíz con 7.74% que concuerdan con lo reportado que es aproximadamente del 2-10% del total proteico (Hernández, 1999); y con un rendimiento neto por cada 100gr de material vegetal se obtuvo para hoja 0.232%, tallo 0.326% y raíz 0.117%.

De los métodos reportados para la extracción de lectinas encontramos el método salino propuesto por Villarrubia *et al* (1995) (citado por Ganem 2000) que fue empleado en este estudio y el salino con sulfato de amonio propuesto por Ganem y Martin (2000), para ambos casos se reporta que en promedio el rendimiento neto se encuentra entre el 75 y 90%, sin embargo en el método de sulfato de amonio

se puede afectar la actividad dado el alto grado de saturación que alcanza el 60% y donde se modifica el estado de agregación a sólido ya que las proteínas ceden intercambios iónicos entre SO_4 y NH_4^+ sustituyendo los sitios de intercambio que comparte con el agua por lo cual disminuye su solubilidad y precipitan (Sierra y Pérez, 1999); mientras en el método salino únicamente aumenta la fuerza iónica del medio y elimina la capa de solvatación que presentan las proteínas, estableciendo una interacción proteína-proteína (Mendoza, 2007).

Dentro de las principales funciones que presentan las lectinas es su unión a carbohidratos, siendo que de forma natural establecen una asociación con los azúcares presentes en la planta, para llevar a cabo una función biológica (Maraaten *et al* 1991).

Por tanto en una extracción salina es posible el acarreo de moléculas asociadas a lectinas vegetales, como son los carbohidratos; la cuantificación de azúcares realizados a cada una de las fracciones proteicas obtenidas indican que las asociaciones lectina-carbohidrato (Hernández, 2005) se mantienen, sin embargo al ser uniones reversibles al someter las fracciones al proceso de diálisis se lleva a cabo el rompimiento de algunos de estos enlaces. Al presentarse un alto nivel de carbohidratos en las fracciones con glucosa nos indica que las lectinas presentes en la ruda posiblemente presenten varios sitios de unión a carbohidratos sumados a la cantidad de carbohidratos presentes en la estructura de la molécula.

Boy y Sharpleigh (1954) denominaron a estas proteínas como lectinas, derivando del latín *legere* (seleccionado, escogido) haciendo referencia a su capacidad de unión selectiva de azúcares lo que les brinda su capacidad de hemaglutinación, siendo esta la principal característica que identifica a estas proteínas.

La aglutinación consiste en la agregación sistemática de células, mediada por macromoléculas específicas (anticuerpos o lectinas) que reconocen estructuras moleculares determinadas (antígenos) sobre la superficie celular; la cual dependerá del número de determinantes antigénicos y de su localización sobre la célula (Rodríguez *et al*, 2004).

Las membranas de los eritrocitos están formadas por varias capas de moléculas lipídicas, proteicas y carbohidratos distribuidos en tal manera que permiten la separación entre el medio intracelular y el extracelular. Estos carbohidratos de superficie se encuentran formando oligosacáridos y polisacáridos que principalmente se encuentran ligados a lípidos y proteínas formando glicolípidos y glicoproteínas que presentan capacidad antigénica constituyendo los grupos sanguíneos (Santoyo *et al*, 2003).

Algunas de las lectinas son específicas en sus reacciones con los grupos sanguíneos ABO, MN, A₁ y A₂ de humanos, por lo cual han sido utilizadas en la determinación del tipo de sangre. La mayoría de las lectinas aglutinan eritrocitos de todos los grupos sanguíneos en humanos y actúan a similares concentraciones, éstas son lectinas no específicas y existen otras con una mayor especificidad (Hernández, 1999).

La especificidad que muestran las lectinas sobre los tipos sanguíneos está mediada por la presencia de carbohidratos terminales en la superficie celular; esta variación en la presencia de carbohidratos está dada por el producto genético de un único locus que codifica tres alelos comunes de una enzima glucotransferasa. Todos los humanos sintetizan un glucano central común, denominado antígeno O que carece de actividad enzimática, mientras que el alelo A transfiere una porción N-acetilgalactosamina terminal y el alelo B transfiere una porción galactosa terminal (Santoyo *et al*, 2003).

Las pruebas de hemaglutinación con lectinas de *R. graveolens* indican que con este método de purificación es posible obtener una fracción enriquecida con proteínas tipo lectina al presentar un efecto aglutinante en el sistema ABO, mostrando que su capacidad no está dada por la concentración ya que conforme varía la concentración.

Hernández (2011) reporta que las lectinas extraídas de hoja de ruda presentan mayor actividad aglutinante con los tipos A₁, A₂ y B, esto por el reconocimiento a carbohidratos terminales presentes en estos tipos y por la presencia de diferentes

tipos de lectinas con un reconocimiento variable a carbohidratos. Lo obtenido en este trabajo indica que posiblemente se presenta una mezcla de proteínas tipo lectina en los diferentes órganos, además de la presencia de más de dos dominios de reconocimiento a carbohidratos; promoviendo un reconocimiento variable a carbohidratos presentes en los diferentes tipos sanguíneos. Lo anterior podría explicar lo obtenido en la fracción de tallo dializado con glucosa, en donde presenta el mismo grado de aglutinación para los tres tipos sanguíneos y al variar la concentración no presenta cambios en los patrones de aglomeración pero sí una disminución en el número de células aglutinadas.

En la mayoría de las fracciones proteicas se presentaron altos grados de aglutinación para el tipo A⁺ sugiriendo que las lectinas extraídas de los diferentes órganos de la ruda presentan una mayor afinidad al carbohidrato N-acetilgalactosamina; para tallo se presenta una mezcla de lectinas variables ya que se presenta un reconocimiento para todos los tipos, pero se presenta una menor proporción en el reconocimiento a N-acetilgalactosamina. La mayoría de las lectinas extraídas de hoja de igual forma presentan un mayor reconocimiento a N-acetilgalactosamina y se presenta una fracción menor que reconocen a la galactosa, sin embargo al variar las concentraciones podemos suponer que las lectinas de este órgano presentan pocos sitios de unión a carbohidratos. Se presenta una pequeña variación en la proporción de lectinas extraídas de raíz con afinidad a galactosa en comparación con las que reconocen a la N-acetilgalactosamina. Esta especificidad se debe a la diferencia en la distribución de los ligandos en la superficie de la membrana que se presenta para cada aglutinina, que va a depender de la afinidad y del sitio de unión específico (Rodríguez *et al*, 2004).

La precipitación de proteínas se lleva a cabo por varias metodologías de las cuales la más empleada es por acetona, sin embargo de acuerdo a lo reportado por Jesse *et al* (2008) el método de TCA (10%)-acetona(90%)-DTT (20mM) presenta una mayor eficiencia en la precipitación y una menor contaminación de las muestras para su utilización en otro tipo de ensayos. Debido a la

concentración de proteínas en las diferentes fracciones proteicas obtenidas de la ruda fue necesaria su precipitación, donde las fracciones ricas en lectinas presentan una concentración de entre 6-20 µg por cada 500µl.

Lo reportado para el peso de las lectinas es de 12-65 kDa (Hernández, 2005), mientras que el peso reportado para lectinas de hoja de *Ruta graveolens* es de 25,220 kDa; sin embargo lo obtenido en este estudio identifica la misma proteína identificada además de la presencia de otras proteínas con un peso variable entre 24-45 kDa. En el caso de tallo y de raíz no se ha encontrado ningún reporte, en este estudio se obtuvo, para el caso de tallo tres proteínas con un peso entre 34 a 40 kDa; mientras que en el caso de raíz se presentó una banda de 35 kDa. Sin embargo se requiere de un estudio a profundidad para establecer con mayor claridad cuáles de estas bandas corresponden a proteínas tipo lectina, más el ensayo de aglutinación es un alto indicativo de la presencia de este tipo de moléculas.

Las lectinas en concentraciones nanomolares han sido utilizadas por sus propiedades mitogénicas para el estudio de la proliferación y migración de linfocitos en cultivo (Hernández, 1999). Son altamente reconocidas por su capacidad de activar linfocitos y promover su proliferación a través de la interacción con residuos sacarídicos presentes en las glicoproteínas de membrana (Toscano *et al*, 2006). Se han empleado para el análisis de funciones linfoproliferativas y citotóxicas en células mononucleares; además del efecto que presentan sobre estos a altas concentraciones (Castillo y Abdullaev, 2005).

Las diferencias en el reconocimiento de diferentes grupos celulares esta mediada por la variación que presenta la membrana celular en la composición de azúcares, debido a la glicosilación de N-glicanos y O-glicanos presentes en una secuencia peptídica, mediando el reconocimiento de la estructura sacáridica por lectinas. Estudios con la lectina PNA (aglutinina de maní) muestran la variación en el reconocimiento de timocitos conforme se da el proceso de maduración, debido a la disminución de la expresión de una enzima que modula la unión de otras moléculas a O-glicanos (Toscano *et al*, 2006).

La citotoxicidad presentada por las lectinas de ruda varía de acuerdo a la especie con la que se trabaje, ya que en las pruebas de citotoxicidad en linfocitos se pudo observar que existe un mayor reconocimiento de linfocitos humanos por la fracción de raíz mientras que la fracción de tallo tiene un mayor efecto en linfocitos de ratón, lo que se puede explicar por las diferencias en los grados de glicosilación que presentan los linfocitos de cada especie.

En todos los casos se observó que a una menor concentración el efecto citotóxico se da rápidamente, mientras que conforme pasa el tiempo el efecto es prácticamente el mismo; posiblemente porque al presentarse un menor número de proteínas se facilita el reconocimiento de los carbohidratos de superficie, e independientemente del tiempo no se incrementa su efecto ya que el número total de proteínas establece el contacto en un solo tiempo.

Contrariamente a una alta concentración requiere un mayor tiempo para llevar a cabo su efecto, dado que a una hora su efecto es similar comparado con la concentración más baja, y conforme aumenta el tiempo su efecto se incrementa; esto puede ser explicado por una mayor presencia de proteínas que entran en competencia lo que puede provocar una autoinhibición y por tanto se requiere más tiempo para que se lleve a cabo la interacción de un mayor número de proteínas con los carbohidratos o receptores, lo que conlleva al incremento de la citotoxicidad.

En 1957 Thomas y Burnet establecen la teoría de la “vigilancia inmunológica” postulando que dentro de un organismo se generan continuamente células malignas, pero estas son identificadas y destruidas rápidamente por el sistema inmune; sin embargo las células tumorales poseen mecanismos de evasión a la respuesta inmune (Bioarrayanes, 2000).

En el sistema inmune de los mamíferos participan varias poblaciones celulares (linfocitos T y B, macrófagos y otras células), así como moléculas solubles (citocinas); generando una interacción entre todos estos elementos permitiendo que se desarrolle una respuesta inmune eficaz contra tumores (Bioarrayanes, 2000).

Para que se produzca una respuesta inmune celular eficiente contra tumores se requiere que los determinantes antigénicos sean expresados por las células tumorales; luego que los antígenos sean eficientemente presentados por las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, posteriormente que el reconocimiento de estos antígenos estimule la respuesta de los linfocitos T y B y macrófagos, y finalmente que las células efectoras sean capaces de llegar al sitio de localización del tumor y causar la destrucción del mismo (Bioarrayanes, 2000).

En los ratones que fueron tratados con el óxido de níquel para el desarrollo de tumores se presentó un incremento en la población linfocitaria B, además de modificaciones en su morfología sugiriendo que se encuentran activados y por ende que los tumores originados por este compuesto son secretores de interleucina 4, ya que se ha reportado que está citocina estimula a los linfocitos B (Bioarrayanes, 2000).

Este incremento de la población linfocitaria concuerda con los reportes de infiltración linfoide en los tumores mamarios presentando una gran cantidad de linfocitos B, que constituyen el 40% de la población total de linfocitos (Arango, 2010).

Ortiz *et al* (1995) reportaron que en ratones inoculados con óxido de níquel se presentan procesos neumónicos y distróficos en hígado y bazo, además de la presencia de trazas de la suspensión de níquel en estado quiescente; lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo ya que se presentó un incremento en el tamaño del bazo y disminución de hígado además del incremento de sangre en el órgano indicando que se presenta una alteración en el funcionamiento del órgano.

Las variaciones en la LD50 que es de 4 y 5µg en ambos grupos de ratones indican que en un sistema comprometido por anomalías celulares, el sistema inmune presenta cambios en los grados de glicosilación de sus células, lo que conlleva a que el efecto antitumoral de las lectinas se potencialice.

Castillo y Abdullaev (2005) denotan el uso de las lectinas vegetales como agentes anticancerígenos, ya que reconocen con mayor eficiencia los cambios en la glicosilación de las células tumorales, esto mediado por la unión a carbohidratos

permitiendo estudiar los cambios que ocurren en la superficie de las anormales (Valadez *et al*, 2006); además del reconocimiento de células tumorales, se ha adjudicado a las lectinas un efecto antiproliferativo y citotóxico (Castañeda *et al* 2006).

Para el caso de las lectinas de la ruda no se han presentado reportes sobre su actividad antitumoral; sin embargo la planta ha sido empleada como anticancerígeno, lo que hace suponer que este efecto esta mediado por la presencia de lectinas vegetales. En este trabajo se evaluó el efecto citotóxico de lectinas de *R. graveolens* en células MCF-7 de cáncer de mama, donde se obtuvo que a concentraciones nanomolares se presenta un efecto mitogénico, sin embargo los datos obtenidos indican que posiblemente a concentraciones más altas el efecto se vuelve citotóxico, por tanto la acción de estas moléculas es dependiente de la concentración.

Las LD50 reportadas para la línea celular MCF-7 para lectinas vegetales se encuentran en un rango entre 2-9 µg, sin embargo en este estudio no se pudo determinar la LD50 ya que las concentraciones a las que fueron tratadas no permitieron incrementar la concentración debido a la dilución en que se encontraban las fracciones proteicas, se evitó utilizar extractos sometidos a procesos de concentración ya que se podría haber afectado el efecto biológico de las lectinas.

Los datos obtenidos en este ensayo indican que las lectinas de tallo posiblemente presentan efecto citotóxico, ya que presenta una disminución del 10% en la población celular; esto no es un porcentaje representativo sin embargo nos da pie para suponer un posible efecto. Mientras que en el caso de hoja en la mayoría de los tratamientos no se presenta disminución de la población celular, contrariamente se presentó un pequeño, lo que podría sugerir un efecto mitogénico. Para el caso de la fracción de raíz no se presentan una disminución considerable ya que se presenta un 4%. No se obtuvieron los resultados esperados, sin embargo se establece que las lectinas de tallo de *Ruta graveolens* podrían presentar un efecto citotóxico dependiente de la concentración.

IX. CONCLUSIONES:

Se comprobó la presencia de una mezcla de proteínas tipo lectina en la *Ruta graveolens* que constituye entre el 6-13% del total proteico.

La actividad hemaglutinante de las lectinas de ruda es independiente de la concentración, además de que presentan más de dos dominio de unión a carbohidratos.

Las lectinas extraídas de la Ruda muestran una mayor actividad aglutinante a tipo sanguíneo A+.

Tallo presenta una menor proporción de lectina con afinidad a la N-acetilgalactosamina mostrando una menor aglutinación para el tipo A+; mientras que hoja y raíz presentan un menor reconocimiento a la galactosa, provocando menor aglutinación en el tipo B+.

La *Ruta graveolens* presenta proteínas tipo lectina con un peso aproximado entre 24 a 38 kDa, siendo que la hoja presenta una mayor diversidad de este tipo de proteínas en comparación con tallo y raíz que presentan 3 y 1, respectivamente.

De acuerdo al órgano de extracción, las lectinas de la ruda presentan variaciones en el reconocimiento de los grados de glicosilación de cada especie.

En linfocitos humanos se muestra una mayor citotoxicidad por la fracción de lectinas de raíz. Donde la LD50 para hoja es de 5µg, mientras que para tallo y raíz es de 6µg.

La fracción de tallo presenta una mayor citotoxicidad en los linfocitos de ratón, además de mayores porcentajes comparado con el humano. Para las fracciones de hoja y tallo se presenta una LD50 de 2µg y para raíz es de 4µg.

En los ratones con tumor se incrementó la LD50 comparado con los ratones sanos, en este caso el promedio de la LD50 es de 5µg.

A concentraciones nanomolares el efecto de las lectinas de ruda es mitogénico, mientras que para un efecto citotóxico es dependiente de la concentración, siendo que las lectinas de tallo presentan un mejor efecto citotóxico en células MCF-7 de cáncer de mama.

X. REFERENCIAS:

1. Álvarez C., Doroteo V., Cabello I., Lock O. (2006) “**Análisis de rutina en *Ruta graveolens* o *ruta spp.*, “ruda”, utilizando técnicas cromatográficas” www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry**
2. American Cancer Society (2010),”**Breast cancer facts y figures 2009-2010**”
3. Arango M., Faxas M., Álvarez I., Camacho R., Rodríguez C. (2010), “**Compromiso del sistema inmune en pacientes con cáncer de mama**” *Cancerología*, vol:3: 191-197.
4. Ávalos A. y Pérez E. (2009), “**Metabolismo Secundario de Plantas**”, *Reduca (Biología)* 2(3): 119-145.
5. Benavides V., Trujillo G., D’Arigo G., Paredes U., Pino J. (2000) “**Evaluación toxicológica preliminar de *Ruta graveolens*, *Origanum vulgare* y *Persea americana* sobre embriones preimplantacionales de ratón**” *Rev Per Biol.* 7(1):86-88
6. Bioarrayanes (2000) “**Inmunología del cáncer**”
7. Brandan M. y Villaseñor Y. (2006), “**Detección del cáncer de mama: Estado de la mamografía en México**”, *Cancerología* 1, pp. 147-162.
8. Cabral y Alonso (2005) “**Avances en el tratamiento del cáncer de mama**” Universidad del Salvador.
9. Castañeda A., Yllescas L., López J., Mendiola E., Blanco A., García T.(2006), “**Efecto antiproliferativo in vitro de una lectina de frijol tépari sobre diferentes tipos de cáncer humano**”. Unidad Bioquímica y biotecnológica de plantas. CIVESTAV-Irapuato.
10. Castillo A, Abdullaev F, (2005), “**Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer**”. *RIC*, vol. 57: 55-64.
11. Cortés J. (2005), “**Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento del cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo**”, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
12. Dogan I, Cumaoglu A. and Aricioglu A. (2010), “**Inhibition of ErbB2 by Herceptin reduces viability and survival, induces apoptosis and oxidative stress in Calu-3 cell line**”, *Mol Cell Biochem*, Springer.
13. Elias S, Contreras A. y Llanque C. (2008), “**Cáncer o Carcinoma de Mama**”, *Rev. Paceaña de Med. Fam.* pp 14-23
14. Fry SA, Afroug B, Loma-Browne HJ, Timms JF, Velentzis LS, Leathem AJC, (2011), “**Lectin microarray profiling of metastatic breast cancers**”. *Glycobiology*, vol. 21: 1060-1070.

15. Fu L, Zhou C, Yao S, Yu J, Liu B, Bao J, (2011), "**Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents**". ELSERVIER, vol. 43:1442-1449.
16. Ganem F. y Martín O (2000), "**Lectina concavalina A: obtención y purificación**", Laboratorios Beterá.
17. Hernández P, Martín O, Rodríguez Y, Ganem F, (1999), "**Aplicaciones de las Lectinas**". Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter, vol. 15:91-96.
18. Hernández P, Pérez E, Martínez L, Ortiz B, Martínez G, (2005), "**Las Lectinas Vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato**". REB, vol. 24:21-27.
19. Hernández J (2011), "**Lectinas en Hojas de ruda (*Ruta graveolens* L.). Purificación y Caracterización**" Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo
20. I.N.C.E.S.E. (2004), "**El Cáncer Aspectos básicos sobre su biología, clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento**".
21. INEGI (2009), "**Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer**"
22. Jesse K., Hashim O. y Rahim Z. (2008) "**Protein precipitation method for salivary proteins and rehydration buffer for two-dimensional electrophoresis**", Biotechnology 7(4): 683-693
23. Kong Y., Lau C., Wat K., (1989) "**Antifertility principle of *Ruta graveolens***" Planta Med. 55:176-178.
24. Márquez D (2005), "**Receptor de Estrógeno: Bases Moleculares Aplicadas a Medicina**", Universidad de California, Los Ángeles. Escuela de Medicina. Departamento de Medicina, División de Hematología y Oncología.
25. Márquez D., Pareja A., Márquez M., Martínez A.(2008), "**Evaluación citotóxica y clastogénica en linfocitos humanos de un 5^a, 8^a-EPIDIOXIESTEROL**" Edi. Vitae.
26. Massagué J, (2009), "**Evolución y metástasis del cáncer**". SEBBM.
27. Meza J, Montaña A, Aguayo A (2003), "**Bases moleculares del cáncer**". Revista de Investigación Clínica, Vol.58:56-70.
28. Mendoza W., Gandolfo L., Ponce L, Novello J., Marangoni S. (2007), "**Estudios estructura y función de una lectina aislada de semillas de *Caesalpinia spinosa kuntze* (Tara)**". IDESIA.
29. Moreno (2009), "**Variabilidad del gen CYP19 y su asociación con el cáncer de mama**", Instituto Politécnico Nacional
30. Muñoz A., Covarrubias S., Delena J., Pacheco U., Sánchez C., Alvarado J. y Yahuaca P (2001) "**Efecto de extractos de *Ruta graveolens* (Ruda) sobre la contractilidad de útero de rata y perro, ex vivo**" BIO/UMH.
31. Organización Mundial de la Salud Ginebra (2011) "**Control del Cáncer**".

32. Ortiz A., Castillo R., Beausoleil I. (1995), "**Carcinogénesis por óxido de níquel en dos líneas de ratones consanguíneas**", Scielo cuba.
33. Pathak S., Multani a., Barerji P. y Banerji P. (2003) "**Ruta 6 selective induces cell death in brain cancer cells but proliferation in normal peripheral blood lymphocytes: A novel treatment for humane brain cancer**". International Journal of Oncology. USA. 23:975-982.
34. Porter P (2009), "**Global trends in breast cancer incidence and mortality**", Salud Publica Mex, supl:2 pag. 141-146.
35. Rambaruth NDS, Dwek MV, (2011), "**Cell surface glycan-lectin interactions in tumor metastasis**". ELSERVIER, vol. 113:591-600.
36. Rodríguez D, Gil FJ, Planell JA, Jorge E, Álvarez L, García R (2004), "**Capítulo 4. Estudio de la citotoxicidad de los vidrios de fosfato**", Journal of Materials Science-Materials in Medicine; vol.10: pp847-851.
37. Rojas N. y Perrone T. (2000), "**Electroforesis en SDS-PAGE**" Editorial Reverté.
38. Saeland E, Belo AI, Mongera S, van Die I, Meijer GA, van Kooyk Y, (2011), "**Differential glycosylation of MUC1 and CEACAM5 between normal mucosa and tumour tissue of colon cancer patients**". International Journal of Cancer.
39. Sánchez R., Scheneider E., Martínez G. y Fonfach C (2008), "**Cáncer de mama Modalidades terapéuticas y marcadores tumorales**", Cuad. Cir. Vol. 22 pag- 55-63.
40. Santoyo V, Mendiola E, Blanco A y García T (2003), "**Papel de la vía fosfatidilinositol Concentradas de Lectinas de Fijo Tépari (*Phaseolus acutifolius*) por eritrocitos humanos**", CINVESTAV-Irapuato.
41. Secretaria de Salud (2002), "**Compendio de Patología Mamaria**". Primera Edición. México D.F.
42. Toscano M, Ilarregui J, Bianco G, Rubinstein N y Rabinovich G (2006), "**Interacción entre proteínas y glicanos en la regulación fisiológica de las células T**", Medicina, vol. 66, pp. 357-362.
43. Ueno S, Mojic M, Ohashi Y *et al*, (2011), "**Asialoglycoprotein Receptor Promotes Cancer Metastasis by Activating the EGFR-ERK Pathway**". Cancer Res, vol.71:6419-6427.
44. Vanaclocha B. y Canigeral S. (2003), "**Fitoterapia**". 4ª. Ed. MASSON Edt. Barcelona España.
45. Valadez M., Riverón L., Abdullaev F., Álvarez G., García A. (2007) "**Efecto antitumoral de lectinas de frijol sobre células cancerosas SW480**"
46. Zepeda E., Recinos E., Cuéllas M, Robles C. y Maafs E. (2008), "**Clasificación Molecular del cáncer de Mama**" Cirugía y Cirujanos, año/vol. 76, núm. 001.