



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y
EVALUACIÓN ANTIGENOTÓXICA DEL
EXTRACTO PROTEICO DE *Pisum sativum*
MEDIANTE LA TÉCNICA DE
INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDES
HERMANAS *in vitro* EN LINFOCITOS
HUMANOS.**

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
YESENIA ARREGUÍN BAUTISTA

ASESORES:

DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO
M. EN C. MARITERE DOMINGUEZ ROJAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
**Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la **Tesis**:

Extracción, identificación y evaluación antigenotóxica del extracto proteico de Pisum sativum mediante la técnica de intercambios de cromátides hermanas in vitro en linfocitos humanos

Que presenta la pasante: **Yesenia Arreguín Bautista**

Con número de cuenta: **40203508-8** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

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

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcallí, Méx. a 27 de Abril de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	M. en C. Lidia Rangel Trujano	
1er SUPLENTE	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
2do SUPLENTE	QFB. Vianey Anduaga Rosales	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/bm

AGRADECIMIENTOS

A mi respetable Jurado:

Agradezco su apoyo, sus consejos y observaciones acertadas, sus atenciones y el tiempo invertido en revisar este trabajo, agradezco toda la ayuda que me brindaron para culminar esta etapa de mi vida, gracias.

A mis valiosas asesoras:

A la M. en C. Maritere Domínguez, le doy las gracias por haberme dado la oportunidad de ser su tesista, fue de gran importancia tu guía y tus conocimientos.

A la Dra. Sandra Díaz por todo su valioso apoyo, sus invaluableles consejos, por depositar su confianza en mí, por darme el impulso a terminar este trabajo, por todo su tiempo y dedicación, gracias.

A mis queridos amigos:

A Aury que juntas pasamos gratos y malos momentos durante la realización de este trabajo, porque en el transcurso de este tiempo te convertiste en una gran amiga, ¡gracias! Por todo tu apoyo, tu amistad, ¡lo logramos!

A Janet, Flor y Toño les agradezco por compartir muchas alegrías, por ser unos amigos inolvidables, por su gran y valiosa amistad, por estar en los momentos difíciles, por todos los ánimos que me dieron para concluir este ciclo, mil gracias.

A Yury y Orquídea, gracias por su amistad, porque hicieron más agradables los días en el laboratorio.

A Poncho, Hermes, Liz, Juan, Pancho por los gratos momentos que pasamos durante la carrera, por su compañía, apoyo y amistad, ¡mil gracias!

A los amigos que he tenido a lo largo de mi vida y que me siento afortunada por haberlos conocido, ¡gracias!

A mi querida UNAM, que durante algunos años fue mi segundo hogar, gracias por los logros y fracasos que me hicieron ser la mujer que actualmente soy, gracias por todas tus enseñanzas, las vivencias que tuve.

DEDICATORIAS

A mi amada familia:

A ti Alicia, que como hermana mayor me has enseñado a luchar por mis metas, por todos tus acertados consejos, por todo tu cariño y amor, por ser una buena hermana y una gran líder.

A ti Armando, por ser un hermano con una forma de ser muy peculiar, por todo tu cuidado, por el apoyo brindado, por las bromas los buenos y los malos ratos compartidos, porque siempre estás y estarás ahí para escucharme.

A ti Selene, por ser una hermana con un buen sentido del humor, porque tu carácter fuerte me ha demostrado que se pueden lograr las cosas cuando te los propones, por las risas, el llanto, por todos los momentos y consejos compartidos, por tu cariño.

A mis queridos sobrinos, Oscar, Sergio, Diana, Andrés, Jessica, por todas las alegrías que me han dado, porque son muy especiales para mí y espero ser un buen ejemplo para ustedes, porque tienen una vida por delante llena de tantos logros, porque cada uno de ustedes tienen distinta forma de ser, pero todos son muy inteligentes y capaces de lograr lo que se propongan.

A las más pequeñas Yanilen y Yaretzi, porque apenas están iniciando su camino en esta vida, su llegada le ha dado luz y felicidad a la familia.

Le doy gracias a Dios por darme una maravillosa familia, les doy gracias por todo el apoyo brindado, espero que la unión que tenemos sea más fuerte e inquebrantable con el tiempo.

A mi mejor amigo y compañero del alma:

A ti Emilio, porque me has enseñado lo que es "amar", por estar conmigo en las buenas y en las malas.

Por procurar que los momentos hermosos perduren para siempre en mi corazón.

Por ser mi mejor amigo, por tus valiosos consejos, porque eres una persona muy especial en mi vida, corazón y alma.

Porque a pesar de la distancia siempre me brindas tu tiempo, amistad, ayuda y apoyo.

Porque eres un ser realmente admirable y maravilloso, gracias por haber llegado en el tiempo justo a mi vida.

Gracias por ayudarme a cerrar este ciclo de mi vida, gracias por hacerme partícipe de tus planes, tus ilusiones y anhelos.

Gracias por toda la felicidad que me has dado, por el camino recorrido juntos y por el que falta por recorrer.

Agradezco a Dios por haberte puesto en mi camino cuando más te necesitaba.

Este logro, es de los dos. TE AMO...

A mis amados y muy queridos padres:

A ti mami, porque me has dado tu amor, por toda tu paciencia y por la valentía que has demostrado siempre y en especial en este último año.

Gracias por darme el regalo más valioso que he recibido y que jamás será igualado... gracias por darme la vida.

Por todos tus esfuerzos y sacrificios, todo por darme un tesoro invaluable como lo es una buena educación.

Por todos y cada uno de tus valiosos consejos, y por toda la felicidad y alegrías que me has dado día a día, gracias.

Por toda tu bondad, por darme consuelo en los momentos difíciles.

Por cada abrazo, cada caricia y cada beso que me has dado con tanta ternura y cariño, por cada desvelo y cuidado que solo tú puedes brindarme.

*Te agradezco las palabras de aliento que me hicieron abrir los ojos y me impulsaron a hacer realidad este sueño, mil y un gracias por todo tu amor, **TE QUIERO MUCHO...***

A ti papi, que fuiste un padre ejemplar, gracias por tu compañía, tu amistad, tus sabios consejos que son de gran utilidad.

Gracias por cada uno de los sacrificios que hiciste para darme todo lo mejor y procurar mi bienestar y por darme una buena educación.

Por toda tu infinita ternura depositada en ese beso en la frente que me dabas cuando me desvelaba y me quedaba dormida en el sillón.

Por enseñarme que las palabras "no puedo" no existen, que todo depende de que uno mismo se lo proponga para hacerlo realidad.

Porque fuiste muy bondadoso y cariñoso, y con cada abrazo me demostraste todo el amor de padre.

Porque fuiste un padre enérgico, pero justo, gracias por los regaños porque me hicieron darme cuenta de mis errores.

Por cada alegría que le diste a mi vida, por tu buen sentido del humor que te caracterizaba, por ser mi guía.

Ha sido enormemente difícil aceptar tu partida, lamento mucho que no estés presente en este día que tanto esperábamos, pero estoy completamente segura que desde el cielo estas haciendo a un lado las nubes para mirarnos y enviarnos todo tu amor, y estarás apoyándome desde allá arriba, siempre estarás en mi corazón...

Este trabajo lo dedico a tu memoria.

Le doy gracias a Dios por los padres que me dio, no pudo haber hecho una mejor elección.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética L - 521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, bajo la dirección de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo y la M. en C. Maritere Domínguez Rojas.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	3
Índice de figuras	4
Índice de tablas	6
Resumen.....	8
Introducción	
Capítulo 1. La Herbolaria	
1.1 Antecedentes históricos de la Herbolaria	10
Capítulo 2. El cáncer	
2.1 Antecedentes en México	14
2.2 Generalidades.....	15
Capítulo 3. <i>Pisum sativum</i>	
3.1 Generalidades.....	18
3.2 Acción terapéutica	22
3.3 Cultivo. Suelo y siembra.....	24
Capítulo 4. Proteínas	
4.1 Definición.....	26
4.2 Clasificación.....	26
4.3 Estructura de las proteínas.....	28
4.3.1 Estructura primaria.....	29
4.3.2 Estructura secundaria.....	29
4.3.3 Estructura terciaria.....	31
4.3.4 Estructura cuaternaria.....	33

4.4 Factores que afecta la estabilidad estructural de las proteínas o desnaturalización.....	34
Capitulo 5. Métodos de cuantificación y separación de proteínas	
5.1 Importancia de las proteínas.....	35
5.2 Método de Biuret	38
5.3 Liofilización	39
5.4 Electroforesis.....	40
5.4.1 Fundamento.....	40
5.4.2 Clasificación.....	41
5.4.3 Electroforesis no desnaturalizante.....	41
5.4.4 Electroforesis desnaturalizante.....	41
Capítulo 6. Genotoxicidad y antigenotoxicidad	
6.1 Definición.....	42
6.2 Mitomicina C	43
6.3 Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH).....	45
Justificación.....	48
Objetivos	49
Diagrama de flujo experimental.....	50
Metodología.....	51
Resultados.....	59
Discusión	71
Conclusiones	80
Referencias Bibliográficas.....	82
Apéndice A. Material y reactivos.....	86
Apéndice B. Preparación de soluciones	88

ABREVIATURAS

a.a.	Aminoácido
5-BrdU	5-Bromo-2'- Desoxiuridina
°C	Grados Centígrados
CCE	Ciclo Celular Específico
CCNE	Ciclo Celular No Específico
CH	Chícharo o <i>Pisum sativum</i>
CPC	Cinética de Proliferación Celular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EpPs	Extracto proteico de <i>Pisum sativum</i>
EpPs 1, EpPs 2, EpPs 2.5, EpPs 3, EpPs 6	Extracto proteico de Chícharo o <i>Pisum sativum</i> a una concentración de 1mg/mL, 2mg/mL, 2.5mg/mL, 3mg/mL y 6mg/mL, respectivamente.
h.	Hora
ICH	Intercambio de Cromátides Hermanas
IM	Índice Mitótico
IR	Índice de Replicación
KDa	Kilodaltons
Log PM	Logaritmo del Peso Molecular
M	Molaridad
M1, M2, M3	Metafases de 1ª, 2ª, 3ª división, respectivamente
µg	Microgramos
mg/mL	miligramos por cada mL de solución
MMC	Mitomicina C
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PHA	Fitohemaglutinina
PM	Peso Molecular
Rf	Frente recorrido
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio de cultivo
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
Soln.	Solución
SSF	Solución Salina Fisiológica
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etano-1,2-diamina
UV	Rayos Ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No.1. Esquema de iniciación y producción del cáncer.....	16
FIGURA No.2. <i>Pisum sativum</i>	25
FIGURA No.3. Proteína Colágeno.....	30
FIGURA No.4. Estructura secundaria en forma de hoja β -plegada.....	31
FIGURA No.5. Secuencia de conformación de la proteína hemoglobina hasta llegar a su estructura terciaria.....	32
FIGURA No.6. Estructura Cuaternaria de la hemoglobina. Observe los grupos hem en cada dominio.....	34
FIGURA No.7. Estructura química de la Mitomicina C.....	44
FIGURA No.8. Tipos de intercambios.....	47
FIGURA No.9. Curva patrón de Albúmina Bovina Fracción V.....	59
FIGURA No.10. Resultado de SDS - PAGE del EpPs utilizando un gel al 10%.....	60
FIGURA No.11. Gráfico de los valores del logaritmo del Peso Molecular (PM) de las proteínas estándar frente a su movilidad relativa (Rf).....	61
FIGURA No.12. Fotografía de metafases de primera división tomada en el objetivo de 100X de microscopio óptico.....	63
FIGURA No.13. Fotografías de metafases de segunda división tomadas en el objetivo de 100X de microscopio óptico.....	63
FIGURA No.14. Fotografía de metafases de tercera división tomada en el objetivo de 100X de microscopio óptico.....	64
FIGURA No.15. Gráfico que muestra la capacidad mitogénica del EpPs frente a la PHA.....	65
FIGURA No.16. Promedio del Índice mitótico (IM) obtenido en los diferentes tratamientos.....	68

FIGURA No.17. Promedio del Índice de Replicación (IR) obtenido en los diferentes tratamientos.....69

FIGURA No.18. Promedio de la frecuencia de Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) obtenido en los diferentes tratamientos.....69

FIGURA No.19. Generación de metafases de 1^a (M1), 2^a (M2) y 3^a división (M3) en los diferentes tratamientos en la evaluación genotóxica.....69

FIGURA No.20. Generación de metafases de 1^a (M1), 2^a (M2) y 3^a división (M3) en los diferentes tratamientos en la evaluación antigenotóxica.....70

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No.1. Tratamientos contra el cáncer.....	17
TABLA No. 2. Composición nutrimental de <i>Pisum sativum</i>	20
TABLA No.3. Montaje de la curva patrón de Albúmina Bovina Fracción V.....	51
TABLA No.4. Reactivos y sus proporciones para la realización del gel separador al 10%.....	53
TABLA No.5. Reactivos y sus proporciones para la realización del gel concentrador al 5%.....	53
TABLA No.6. Distribución de los cultivos para la determinación de la capacidad mitogénica.....	55
TABLA No.7. Distribución de los tratamientos para la evaluación genotóxica.....	55
TABLA No.8. Distribución de los tratamientos para la evaluación antigenotóxica.....	56
TABLA No.9. Valores de la curva patrón de Albúmina Bovina Fracción V.....	59
TABLA No.10. Valores para la construcción de la curva patrón de los marcadores de peso molecular.....	61
TABLA No.11. Valores de Movilidad relativa (Rf), logaritmo de Peso Molecular (log PM) y Peso molecular (PM) de cada una de las 16 subunidades obtenidas del Extracto proteico de <i>Pisum sativum</i> (EpPs).....	62
TABLA No.12. Capacidad mitogénica del EpPs.....	64
TABLA No.13. Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del EpPs. Índice mitótico.....	65
TABLA No.14. Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del EpPs. Índice de Replicación.....	66
TABLA No.15. Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del EpPs. Frecuencia de Intercambios de Cromátides Hermanas.....	66
TABLA No.16. Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del EpPs. Cinética de Proliferación Celular (CPC).....	66
TABLA No.17. Ensayo antigenotóxico <i>in vitro</i> del EpPs. Índice mitótico.....	67

TABLA No.18. Ensayo antígenotóxico *in vitro* del EpPs. Índice de Replicación....67

TABLA No.19. Ensayo antígenotóxico *in vitro* del EpPs. Frecuencia de Intercambios de Cromátides Hermanas.....67

TABLA No.20. Ensayo antígenotóxico *in vitro* del EpPs. Cinética de Proliferación Celular (CPC).....68

RESUMEN

Últimamente se han investigado posibles tratamientos contra el cáncer, de los cuales uno es el estudio de los compuestos extraídos de las plantas. Las lectinas son proteínas de origen vegetal, que diversos investigadores afirman que éstas poseen propiedades antitumorales y anticancerígenas (Castillo, 2005).

En el presente trabajo se realizó la extracción de proteínas (lectinas) de 20g de *Pisum sativum* por un método de extracción salina. Ya obtenido el extracto proteico se cuantificaron las proteínas por el método de Biuret, la concentración fue de 3.75mg/mL. Con el fin de concentrar a las proteínas y conservarlas durante la manipulación, el extracto proteico se liofilizó, por lo que se volvió a cuantificar a las proteínas por el mismo método, obteniéndose la concentración de 29.6mg/mL.

Se efectuó la separación de las subunidades proteicas del extracto de *Pisum sativum* mediante la técnica de SDS-PAGE consiguiendo 16 bandas cuyo PM se encuentran en un rango de 14.648 - 80.592 kDa.

Se realizó un ensayo para determinar si el extracto proteico de *Pisum sativum* tiene la capacidad mitogénica, comparado con la Fitohemaglutinina, ambos en concentración de 1mg/mL. El extracto por si solo no posee esta capacidad, pero en combinación con la Fitohemaglutinina se potencializa este efecto.

Se llevaron a cabo dos ensayos el Genotóxico y el Antigenotóxico para determinar el daño o en su caso contrario el beneficio que produce el extracto proteico en el DNA frente a un mutágeno como la Mitomicina C.

En el ensayo de antigenotoxicidad se trabajaron con las siguientes concentraciones del extracto proteico de *Pisum sativum*: 1, 2, 2.5 y 3 mg/mL. Los resultados obtenidos muestran que, el Índice Mitótico a las diferentes concentraciones utilizadas del extracto proteico de *Pisum sativum* (1, 2, 2.5, 3 mg/mL) en combinación con la Mitomicina C manifestó un aumento (32, 20, 25.5, 26 metafases/1000 células, respectivamente) del Índice Mitótico en comparación con el control positivo (19 metafases/1000 células).

Con lo que respecta al Índice de Replicación del ensayo Antigenotóxico mostró un comportamiento similar al del ensayo Genotóxico, lo cual no indica diferencias significativas con relación al control positivo, no hay alteración de la velocidad de la división celular.

La frecuencia de Intercambios de Cromátides Hermanas reveló una disminución conforme incrementó la concentración del extracto proteico de *Pisum sativum* (45.1, 26.94, 25.66, 23.84), por lo que se puede decir que contrarresta los daños producidos por la Mitomicina C (49.48).

INTRODUCCION

Capítulo 1. La Herbolaria

1.1 Antecedentes históricos de la Herbolaria.

La salud siempre seguirá ligada a la enfermedad, porque son complementarias; así como el hombre a la Naturaleza. Desde tiempos remotos, el hombre fue adquiriendo conocimientos acerca del manejo de las plantas. En primera instancia, su objetivo era su alimentación, pero en algún punto del tiempo se dio cuenta de que poseía otra utilidad, la propiedad de curar. También se percató de que la forma y la cantidad que ingería influía de manera importante en el tratamiento; era una línea delgada entre la curación y la muerte (Waizer, 2006).

Con el paso del tiempo surgió la “Herbolaria”, la aplicación de la Botánica a la Medicina, es decir, el uso de hierbas contra las enfermedades que aquejan al hombre y a otras especies, con el fin de curar dichas enfermedades y restablecer su salud.

En el documento escrito más antiguo que se ha encontrado sobre el tema, se citan 48 casos de males o enfermedades en el antiguo Egipto que fueron curados con plantas medicinales. Por otra parte, en la mitología griega, un personaje importante es Hygia, quien es considerada la diosa de la medicina y de cuyo nombre se deriva la palabra higiene. Su hermana Panacea simboliza las propiedades curativas que poseen las plantas. La frase célebre de Hipócrates “que tu alimento sea tu medicina” es ampliamente conocida, expresión por la cual fue considerado el padre de la nutrición. Tanto Hipócrates como Galeno utilizaron la herbolaria como base de las atenciones médicas que les hicieron merecedores del reconocimiento como padres de la medicina (Shulterbrandt, 2008). Ambos médicos

recurrieron a ella como medio para restablecer la salud de los enfermos, por lo que sus enseñanzas rigieron el mundo de la medicina hasta la Edad Media.

Posteriormente la Herbolaria continuó su camino hacia Roma y de ahí a los países que surgieron después, como fue el caso de España; el cual estuvo bajo la dominación de los árabes, suceso que llevo consigo los conocimientos de ciencia médica más confiables en el mundo de esa época. La medicina estuvo altamente influenciada por dos médicos musulmanes: Razis y Avicena. Ellos retomaron los conocimientos de Hipócrates y de Galeno, de manera que fueron consolidando el conocimiento del pueblo Árabe. Para entonces las cruzadas habían fracasado, y el comercio de especias (plantas comestibles y medicinales) procedentes de Asia estaba sometido por los pueblos Árabes. El rey Fernando de Aragón y la reina Isabel de Castilla, unieron sus ejércitos para expulsar a los musulmanes de sus tierras y una vez unificado el reino de España, prepararon una expedición marítima en busca de nuevas rutas para el comercio con Asia, y por accidente, se encontrarían con América (Vicario, 2008).

En el México precolombino, los Aztecas tenían un profundo conocimiento en relación al uso de la Herbolaria, del que se enteraron los reyes de España por medio de las llamadas *Cartas de relación* que envió Hernán Cortés durante la Conquista. En una de estas cartas, remitida el 30 de Octubre de 1520 le decía a Carlos V: “*Ai calle de Arbolarios, donde ai todas las Raices, Iervas Medicinales que en la Tierra se halla. Ai casas como de Boticarios, donde se venden las medicinas hechaz asi potables como unguentos, emplastos*”. Esto motivó a Felipe II a enviar a su médico personal, Francisco Hernández, para hacer un estudio en la materia entre los años 1570 - 1577. Hernández fue el primer médico europeo que exploró la medicina de América, recogiendo y estudiando íntegramente más de 1200 plantas medicinales obtenidas durante los siete años que permaneció en el nuevo continente (Waizer, 2006). Así arribaron a Sevilla barcos procedentes de *las Indias* cargados de

productos vegetales que los médicos europeos esperaban con ansia para probarlos y aumentar su arsenal terapéutico (Barquín, 1984).

Tras la Conquista, alrededor del año de 1600, los frailes españoles acompañados de indígenas traductores levantaron un valioso censo de las plantas y sus propiedades curativas. Éste censo se halla documentado en el "*Códice Badiano*", escrito y traducido al latín por el médico indígena Martín de la Cruz. Esa es sólo una pequeña muestra del conocimiento terapéutico de las plantas que tenían los Mayas, Nahuas, Mixtecos y Zapotecos, por mencionar a los principales grupos, ya que estos tenían una extensa sabiduría sobre la herbolaria. Trescientos años después, se produjeron migraciones masivas de campesinos a las ciudades, así trasladaron esta tradición Herbolaria que con el tiempo se fue diluyendo ante el florecimiento de la medicina ortodoxa. No obstante, hubo familias que acuñaron la profesión de la herboristería, sistematizando el uso y combinación de plantas para males y padecimientos específicos. De esta manera el legado milenario de la Herbolaria y su efecto curativo al alcance de todos, ha sido cultivado en México para servir a la salud de sus habitantes. (Vicario, 2008).

La riqueza de la Herbolaria mexicana es infinita. Actualmente en cada una de las regiones de nuestro país, es posible encontrar en los mercados puestos especializados en estos productos (Rodríguez y Gómez, 2008). La Fitoterapia es el uso de plantas, sustancias vegetales empleadas en el tratamiento de enfermedades, y se cree que es la terapia más antigua practicada por el hombre. Proviene del griego "phyton", que significa planta y de "therapeia", que quiere decir tratamiento; es antecesora de la medicina moderna, que a partir del siglo XVII, fue desplazada, ya que se creía que ésta era un fraude y que sólo era practicada por los curanderos. Tuvieron que pasar varios siglos para que tomara auge en nuestros días, incluso los científicos más desconfiados a esta práctica no pueden negar los efectos favorables de las plantas (Fitoterapia, 2008).

Los medicamentos de origen vegetal son aproximadamente una cuarta parte de los que se encuentran en el mercado. Ejemplos de esto son la morfina (*Papaver somniferum*), la atropina (*Atropa belladonna*), la digitoxina (*Digitalis purpúrea*), quinina (corteza de árbol quino), cocaína (*Erythroxylon coca*), por mencionar algunos (Mendoza, et.al. 2008). Diversas enfermedades han sido controladas gracias a que los investigadores han aislado principios activos, uno o varios, en una sola planta. Aquí entran la Farmacología y la Genética Toxicológica, cuyo papel es el de hacerse cargo de estudiar sus propiedades en los seres vivos, así como sus efectos, todo con la finalidad de convertirlos en un recurso útil para el tratamiento de distintos padecimientos.

Uno de estos padecimientos es el cáncer, donde la dieta ha sido foco de investigación, encontrándose diversos compuestos en ella que tienen influencia en el desarrollo del cáncer. Enseguida se muestran algunos compuestos con capacidad anticancerígena:

NUTRIENTES:

Ácido fólico (hortalizas de hoja)
 Vitamina C (cítricos, vegetales de hoja, patata)
 β -caroteno (tomate, zanahoria, espinacas, lechuga,
 Vitamina E (aceites vegetales, frutos secos)
 Selenio (cereales, setas)
 Fibra (verduras, leguminosas, cereales integrales, frutas)

NO NUTRIENTES:

Fitoestrógenos (leguminosas, guisantes, soja, cereales integrales)
 Flavonoides (frutas, verduras, cereales)
 Isotiocianatos e indoles (col, coliflor, coles de Bruselas)
 Alisulfuros (ajos y cebollas)
 Inhibidores de las proteasas (leguminosas, maíz)
 Polifenoles (té verde, soja, manzana, patata, avena, café)

Capítulo 2. El cáncer

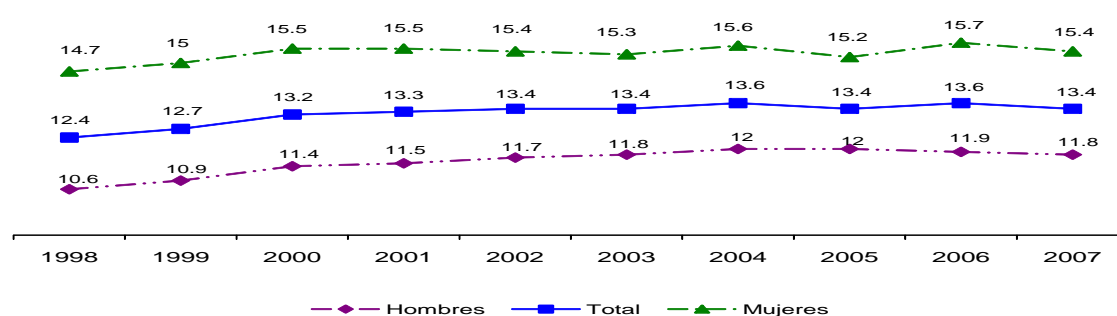
2.1 Antecedentes en México

Una investigación del INEGI, en el periodo que comprende de 1998 al 2007, muestra que la tasa de mortalidad en México es mayor en hombres (55.4%) que en mujeres (44.6%), y además indicó que se ha observado un aumento en la defunción por casos de tumores malignos, que representan la tercera causa de muerte entre las mujeres, con 35 303 defunciones (15.4%), mientras que en los hombres fue la cuarta causa, con 33 509 muertes, representando el 11.8% del total de defunciones entre los varones (Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer, 2009).

La edad es un factor importante, ya que la incidencia de la mayoría de los cánceres posee un crecimiento exponencial con respecto a ésta. Son necesarias hasta 10 mutaciones independientes producidas al azar y con una probabilidad baja, para que una célula se transforme en una célula cancerosa maligna (Klug, et.al; 2006). La edad está relacionada con el tipo de cáncer, en general, la población más afectada es la mayor de 60 años, siguiendo el grupo de personas que tienen entre 30 y 59 años.

Los cánceres malignos más frecuentes (en general) son los de pulmón, mamas y colonrectal, que en conjunto arrojan una cifra del 44% del total de casos de cánceres.

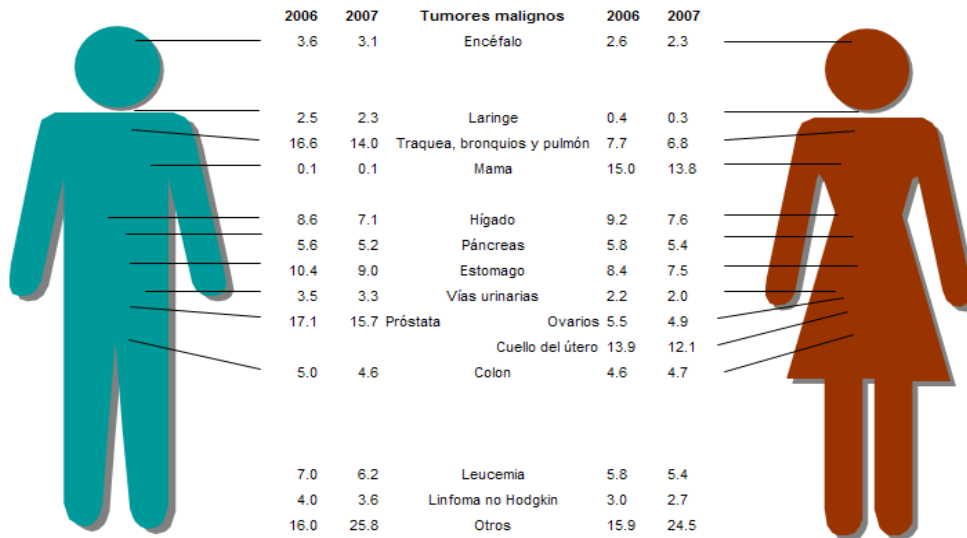
Porcentaje de defunciones por tumores malignos por sexo según año de ocurrencia, 1998-2007



Nota: El porcentaje está en relación con el total de defunciones registradas en cada año, en general y por sexo.
Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales, 1998-2007. Bases de datos.

Dentro de la población femenina, los tipos de cánceres que muestran un índice más alto de defunción son: el de mama (13.8%), cuello del útero (12.1%) e hígado (7.6%). En cambio, en la población masculina, los tipos de cáncer con mayor incidencia son: cáncer de próstata (15.7%), de tráquea, bronquios y pulmón (14%) y de estómago (9%).

Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos para cada sexo 2006-2007



Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales. Defunciones 2006 y 2007. Base de datos.

Dentro de la clasificación del cáncer tenemos que todos comparten el mismo proceso de carcinogénesis, destacando ciertas generalidades o características.

2.2 Generalidades

El cáncer es una enfermedad genética compleja que incluye alteraciones en los genes involucrados en la proliferación, apoptosis, reparación del DNA y envejecimiento celular. Además es un término que designa un grupo de entidades que difieren de forma variable en su histogénesis, morfología, evolución clínica y pronóstico, presentando particularidades morfológicas y biológicas que permiten clasificar e identificar por separado diferentes lesiones (Ferbeyre y Salinas, 2005). Es una etiología multifactorial relacionada con factores genéticos, que dan una determinada susceptibilidad, y múltiples factores ambientales. Estos son los más

modificables y al azar, lo que hace que en una determinada circunstancia se alcance un umbral de expresión de la enfermedad (Castillo, et.al.; 2005).

Las variaciones entre los tipos de cáncer son: la edad de aparición, la tasa de crecimiento, su capacidad invasiva, la prognosis y la respuesta a los tratamientos. En contraste, todos los cánceres coinciden a nivel molecular: existe un crecimiento y división anormales de las células cancerosas (Klug, et.al; 2006).

El proceso de la carcinogénesis puede ser dividido en 3 etapas: iniciación, promoción y progreso basado en evidencia de modelos experimentales (Yokota y Sugimura, 1993). El cáncer inicia con la acumulación de mutaciones en una sola célula, generando que ésta empiece a proliferar descontroladamente, por lo que todas las células de un tumor derivan de una sola célula madre (clona) (Brandan, et.al; 2002). Hay un desarrollo en el sitio donde se inició y se denomina como primario. Este puede crecer lo suficiente para causar síntomas. Después las células cancerosas pueden abandonar el cáncer primario y dirigirse a otras partes del cuerpo a través de la sangre o el sistema linfático, lo que puede producir cáncer en otras partes del organismo, lo que se conoce como cánceres secundarios o metástasis (Qué es el cáncer, 2004).

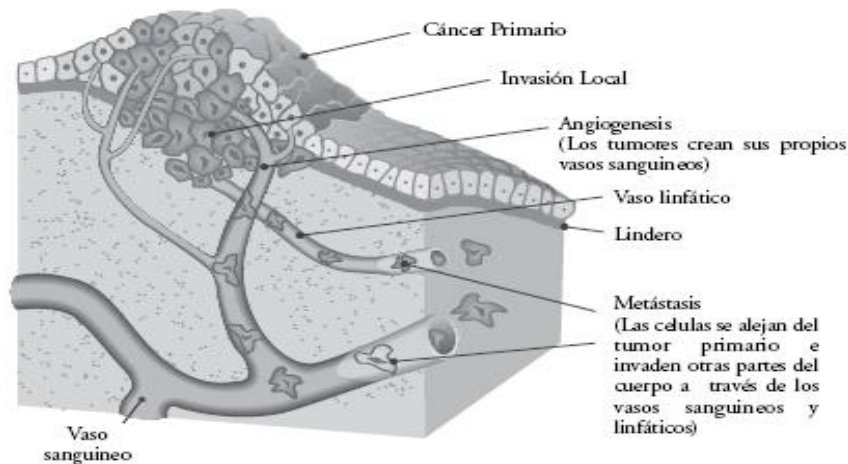


FIGURA No.1. Esquema de iniciación y producción del cáncer (Qué es el cáncer, 2004).

Los tumores originados en la proliferación celular descontrolada pueden ser benignos o malignos (ver FIGURA No.1.) La aceleración de la proliferación provoca la acumulación de mutaciones somáticas adicionales debidas a la no reparación, lo que provoca que las células se hagan más agresivas y su proliferación se incrementa, volviéndose resistentes al tratamiento (progresión) (Brandan, et.al; 2002).

Los tratamientos que se utilizan contra el cáncer pueden dividirse en dos: Los locales, que involucran las cirugías, las radioterapias y los sistémicos, como la quimioterapia (hormonoterapia y terapia molecular) y la bioterapia (inmunoterapia y genoterapia) (Guereña, et.al; 2006).

TABLA No.1. Tratamientos contra el cáncer.

TRATAMIENTO	MECANISMO DE ACCIÓN	EFECTOS SECUNDARIOS	TIPO DE CÁNCER EN EL QUE ACTÚA
CIRUGÍA	Remueve una parte, o el total del tumor canceroso.	Pérdida funcional, obstrucción intestinal, síndrome de mala absorción, sepsis, linfedema, disfunción sexual, psicológica y social.	Tumores de cabeza, cuello, pulmón, mama, útero, vejiga, testículo, recto, sarcoma de tejidos blandos y tumores óseos.
RADIOTERAPIA	Radiación que produce ruptura cromosómica directa, detiene la multiplicación de la células malignas por radicales libres. Esta técnica puede afectar a las células normales, pero éstas se pueden recuperar.	<u>Tempranos</u> : cansancio, coloración roja en la piel, náusea, vómito, sensación de quemadura, diarrea, depilación parcial, esofagitis, alteración de las mucosas, supresión de las hematopoyesis. <u>Tardíos</u> : lesión de las células lentamente proliferativas, mielopatía, necrosis ósea, estenosis intestinal, fibrosis pulmonar, úlceras cutáneas, pérdida de función renal, lesiones cardíacas en miocardio y pericardio, neoplasias secundarias (sarcomas).	Tumores de retina, nervio óptico, cerebrales, piel, cavidad oral, faringe, laringe, esófago, cérvix, útero, vagina, próstata, enfermedad de Hodgkin. También puede ser combinado con cirugía en pulmón mama y útero, vejiga y testículo, recto sarcoma de tejidos blandos y tumores óseos primarios.
QUIMIOTERAPIA	Medicación que detiene la proliferación celular. Actúan sobre DNA, RNA, mitosis y síntesis de proteínas.	<u>Tempranos</u> : náusea, vómito, alopecia, hiperucemia, mucositis, cistitis hemorrágica, mielosupresión, neutropenia, trombocitopenia, anemia. <u>Tardíos</u> : miocardiopatía, fibrosis pulmonar, insuficiencia renal, necrosis avascular y osteoporosis, disfunción sexual y reproductiva, neuropatía, cataratas, disminución de la audición, neoplasias secundarias.	Leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, carcinoma mamario, linfoma de Burkitt, Sarcoma de Swing, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, carcinoma pulmonar de células pequeñas, trofoblástico (gestacional), carcinoma testicular, tumor de Wilms, células tumorales hipóxicas, melanomas.

BIOLÓGICO O INMUNOTERAPIA	Utiliza fármacos para estimular el sistema inmune para combatir el cáncer.	Sudor, fiebre, escalofrío, cansancio, dificultad respiratoria, hipotensión, dolores musculares y de cabeza; náusea, vómito, diarrea, insuficiencia renal y hepática.	Cánceres hematológicos, linfomas, leucemias, melanoma, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, cáncer de mama, de células renales.
HORMONOTERAPIA	Fármacos esteroides naturales, o derivados sintéticos. Actúan bloqueando la actividad de ciertas enzimas e interrumpiendo la síntesis hormonal, compitiendo por receptores específicos o mediante antagonismo biológico.	Edemas por esteroides, hirsutismo por andrógenos, cáncer de endometrio incremento del apetito, retención de fluidos y aumento de peso. En algunos casos, la actitud de las personas y su actividad sexual se pueden ver afectadas.	Leucemia linfocítica crónica, enfermedad de Hodgkin, carcinoma prostático, cáncer mamario metastático.

Capítulo 3. *Pisum sativum*

3.1 Generalidades

La familia de las leguminosas (Fabaceae-Leguminosae) es la segunda en importancia económica dentro de la familia herbácea, con un estimado de entre 16 a 19 000 especies, y alrededor de 750 géneros (Barret, R.P; 1990).

Su importancia radica en que son la principal fuente de proteínas, aceites, así como ser el principal fijador de N (con bacteria simbiótica en la raíz), adiciona Nitrógeno del aire de las plantas (Barrett, 1998).

Se reconocen cuatro posibles centros de origen: el abisinico (Etiopia), el mediterráneo (Turquía, Grecia, Yugoslavia y Líbano), el del Próximo Oriente (Irán, Irak, Caúcaso), y el del Asia Central (noroeste de la India, Pakistan, Afganistán y Rusia) (González, 2001).

Es conocida con diversos nombres, los más comunes son: chícharo, arveja o guisante. Esta planta pertenece a la familia Fabaceae (antes llamada Leguminosae). Pertenece a la subfamilia de las *Papilionoideas*. Es una planta trepadora anual que

mide desde 40 cm a 1.5 m de altura (Cultivo de plantas medicinales y alimentarias, 2004).

Las vainas tienen de 5 a 10 cm de largo y contienen de 4 a 10 semillas; son de forma y color variable.

Las semillas se cosechan cuando están cercanas a la madurez y son ingeridas frescas, las vainas se pueden dejar para que maduren sus semillas y son cosechadas y utilizadas secas (Infante y Alexis, 2000). Cada semilla tiene un peso aproximado de 0,20 gramos; su poder germinativo es de 3 años como máximo, en las variedades de grano arrugado la facultad germinativa es aún menor.

De acuerdo al tipo de semillas se divide en: redonda y arrugada, según su aspecto una vez seca. Su principal diferencia es la resistencia, siendo más resistentes las primeras, capaces de pasar el invierno al aire libre (en climas no demasiado extremos) alcanzando su madurez a finales de la primavera o comienzos del verano. En cambio, las semillas arrugadas son menos resistentes y tienen un contenido más elevado de azúcar, su siembra se hace en forma gradual en primavera para poder cosecharlos a partir del inicio del verano.

Existe una especie del género *Pisum*. Entre las subespecies más conocidas se encuentran:

- *Pisum sativum* subsp. *sativum*: De flores blancas o rosadas sobre pedúnculos cortos. Es la que se cultiva con mayor frecuencia. Las semillas pueden ser lisas o rugosas.
- *Pisum sativum* subsp. *elatius*: Con pedúnculos florales más largos y flores con alas de color púrpura oscuro y estandarte de color lila. Se cultiva menos que la especie anterior y aparece asilvestrada con mayor frecuencia. Las semillas poseen granos.

- *Pisum sativum* L. cv. *axiphium*: Llamado comúnmente como tirabeque, se caracteriza por poseer una vaina muy tierna que permite comerse como verdura.

De creciente popularidad son las variedades de guisante dulce (*Pisum sativum* var. *saccharatum*) y la especie *Tetragonolobus purpureus* o *Lotus tetragonolobus*. Ambos se aprovechan por completo, incluida la vaina, aunque el segundo es de sabor inferior al guisante dulce (Cultivo de plantas medicinales y alimentarias, 2004).

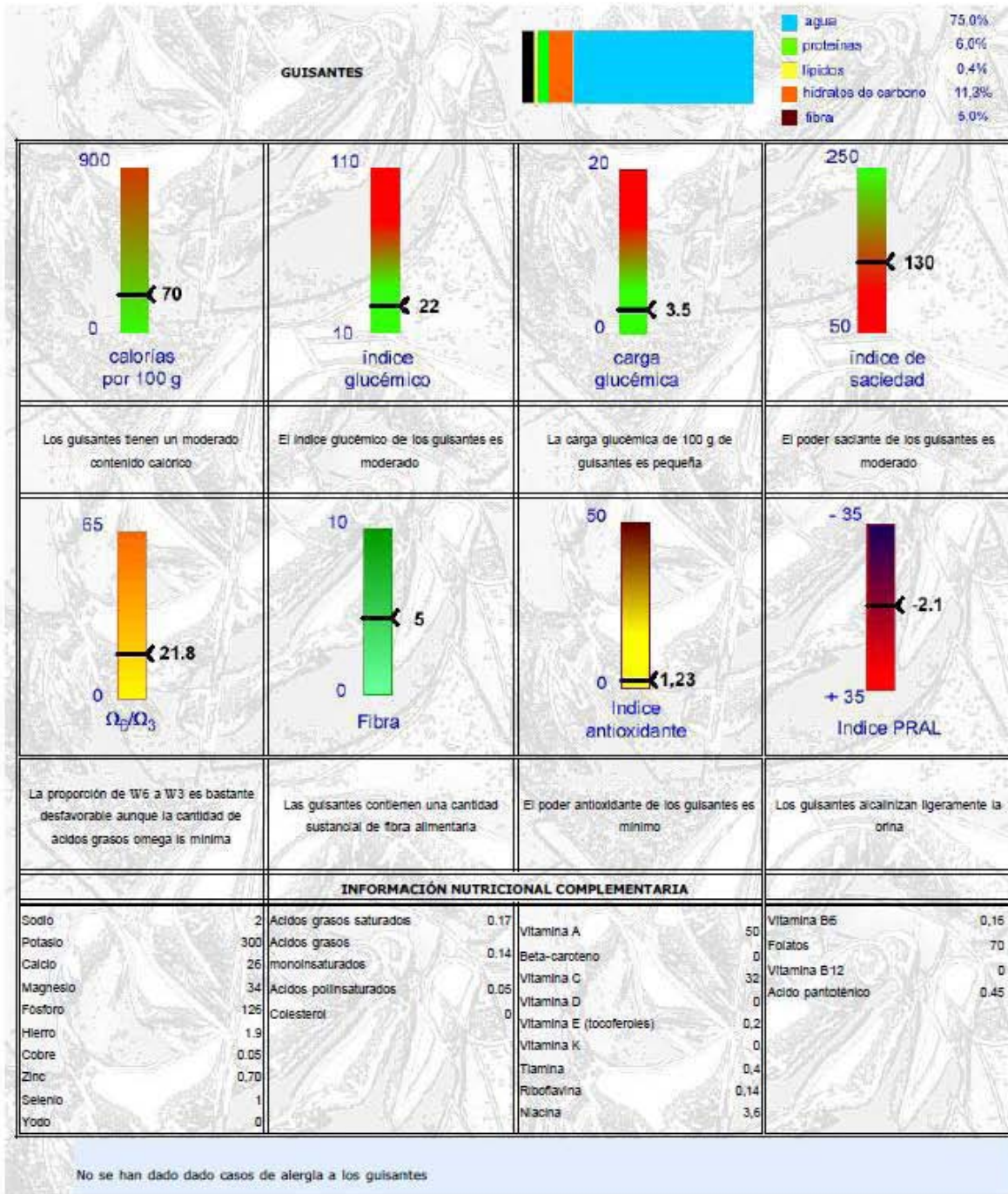
En el Área de Nutrición, *Pisum sativum* es muy rico en carbohidratos y en proteínas, de acuerdo a los valores representados en las siguientes tablas:

TABLA No. 2. Composición nutrimental de *Pisum sativum*. (A) Valor nutricional de guisantes verdes por cada 100g de parte comestible (Guisante, 2012), (B) Ficha nutricional del guisante (Índices dietéticos de los alimentos, 2007).

(A)

Agua (%)	78
Proteínas (g)	6.3
Grasas (g)	0.4
Hidratos de Carbono (mg)	14.4
Fibra (mg)	2
Cenizas (g)	0.9
Calcio (mg)	26
Fósforo (mg)	116
Hierro (mg)	1.9
Sodio (mg)	2
Potasio (mg)	316
Vitamina A (U.I.)	640
Tiamina (mg)	0.35
Riboflavina (mg)	0.14
Niacina (mg)	2.9
Ácido ascórbico (mg)	27
Calorías (cal)	84

(B)



3.2 Acción terapéutica

Las propiedades de *Pisum sativum* son las siguientes:

- Estimula el sistema circulatorio.
 - Al igual que otras leguminosas, impide la formación de las placas en las arterias causantes de la arteriosclerosis.
 - Posee propiedad hipocolesterolémica, es decir, disminuye los niveles de colesterol malo de la sangre.
 - Es un vasodilatador.
 - Previene las enfermedades cardiovasculares como angina de pecho o el infarto al miocardio.

- Componentes que intervienen en las propiedades de *Pisum sativum*.
 - Vitamina C o Ácido ascórbico.
 - Minerales como el Calcio y el Magnesio.
 - Ácido Fítico, málico, oleico y linoleico.
 - Genisteína o lecitina.

- Capacidad de verter la glucosa gradualmente en el torrente sanguíneo.
 - Mantiene la sensación de plenitud durante largo tiempo, mantiene los niveles de glucosa estables lo que determina que el organismo pueda estar saciado.
 - Útil para adelgazamiento. Al mantener el hambre bajo control, no obliga a comer otros alimentos con más calorías.
 - Mantiene los niveles de glucosa dentro de la normalidad sin necesitar mucha insulina.
 - En personas con diabetes, el consumo de este alimento disminuye la dependencia del suministro de la insulina.

- Contiene componentes antiglicémicos como: Ácido ascórbico, salicílico, nicotínico; minerales como cromo o el manganeso. Otros componentes como la pectina, niacina, triptófano.

■ **Función revitalizante.**

- Aporta proteínas necesarias para el desarrollo y renovación de las células. Es rico en legumina y vitamina B2.
- Contiene niveles altos de Magnesio necesarios para la síntesis de proteínas.
- El consumo de este alimento mejora la salud del cabello, piel, uñas, fuerza muscular, la vitalidad tanto física como mental.
- Es un alimento rico en Hierro, Calcio y Fósforo. El primero importante para la prevención de la anemia. El Calcio interviene en la formación de los huesos y el Fósforo es necesario en la producción de energía corporal y es el segundo mineral más importante después del Calcio en la formación de los huesos.

■ **Favorece el tránsito intestinal y previene el cáncer de colon.**

- Contiene fibra insoluble, que aumenta el peristaltismo intestinal, previniendo el estreñimiento.
- Su riqueza en fibra evita la sedimentación en las paredes del colon de sustancias potencialmente cancerígenas.
- Su contenido en fibra soluble al combinarse con el agua, forma un gel que dificulta la absorción del colesterol, las grasas y glucosa en la sangre.

■ **Protege al sistema nervioso y beneficia el estado de ánimo.**

- Sus nutrientes como la vitamina B1 o Tiamina, ayuda a que el sistema nervioso se nutra de glucosa adecuadamente. Su deficiencia provoca

la degradación de las fibras nerviosas y produce síntomas desagradables como la falta de coordinación, sensación de hormigueo en piernas, manos o pies.

- Es rico en Niacina o Vitamina B3 que, en conjunto con la Tiamina, la Piridoxina y la Riboflavina, contribuyen en mantener el sistema nervioso en buen estado.
- Contiene cantidades abundantes de Folato que el organismo transforma en Ácido fólico o vitamina B9, cuyas deficiencias son responsables de la aparición de síntomas de depresión o mal humor.
- Ayuda a superar el nerviosismo y a mantener un estado de ánimo más positivo.

■ Posee acción espermicida, contraceptiva y fungistática.

- El aceite de las semillas, administrado una vez al mes, inhibe la proliferación del endometrio, antagonizando la progesterona, evitando el embarazo en un 60% de las mujeres.
- En el hombre, reduce en un 50% el número de espermatozoides (Cultivo de plantas medicinales y alimentarias, 2004).
- Las cataplasmas con harina de guisantes son útiles en el tratamiento infecciones dermatológicas por hongos y también son utilizadas para el acné.

3.3 Cultivo. Suelo y siembra.

Los guisantes necesitan un suelo bien abonado, excavado y labrado a fondo, con un pH de 6 a 7.5. Poco antes de la siembra se aplica un abono general con un contenido bajo en nitrógeno. No hacen falta abonos nitrogenados, ya que al igual que otras leguminosas, tienen bacterias en los nódulos de sus raíces que fijan el nitrógeno del aire.

Se traza un surco aplanado con la pala, de unos 15 cm de ancho y 8 cm de profundidad y se siembran las semillas en hileras alternas de tres, separadas 8 cm. Otra opción es colocar en surcos en forma de V una hilera de semillas, separadas 4 cm. Las hileras deberán alejarse entre si según la altura de la variedad cultivada; para los tipos enanos, los surcos se espacian de 45 a 60 cm, distancia que se aumenta hasta 1.25 m para las variedades más altas.

Para que comiencen su desarrollo en primavera se obtienen plantones de variedades de semilla arrugada en bandejas con mezcla de cultivo mixta y se les trasplanta al exterior cuando el suelo está en condiciones de ser labrado y el tiempo es suave. Se pueden obtener en interior en invernadero si se les protege (Cultivo de plantas medicinales y alimentarias, 2004).

La planta crece en climas fríos y calientes. En México su cultivo debe realizarse desde fines de marzo hasta fines de junio, siendo mejor el periodo comprendido desde el inicio de la segunda quincena de abril hasta el 15 de mayo. Para producir semillas se debe sembrar durante la última parte del período, así la cosecha coincide con la fase más seca del invierno, con la finalidad de evitar pérdidas del grano obteniendo material de propagación de buena calidad (Infante y Alexis, 2000).



Figura No2 .*Pisum sativum*. La imagen del lado izquierdo esquematiza la flor de *Pisum sativum* y la imagen del lado derecho representa el fruto o semilla de *Pisum sativum* (Plantas medicinales. Guisante. *Pisum sativum*, 2009).

Capítulo 4. Proteínas

4.1 Definición

Las proteínas son el principal componente estructural y funcional de las células y tienen numerosas e importantes funciones dentro del organismo que van desde su papel catalítico (enzimas) hasta su función en la motilidad corporal (actina, miosina), pasando por su papel mecánico (elastina, colágeno), de transporte y almacén (hemoglobina, mioglobina, citocromos), protección (anticuerpos), reguladora (hormonas), etc. Su característica más importante es que contienen nitrógeno, siendo el contenido medio de este elemento de un 16%. Son macromoléculas formadas por cadenas de unidades estructurales, los aminoácidos. Estos aminoácidos se unen por medio de enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y el grupo α -amino (imino), con pérdida de agua (Martínez y Martínez, 2006).

4.2 Clasificación

Las proteínas pueden ser clasificadas, en base a diversos tipos:

- De acuerdo a su composición.
 - Proteínas simples u Holoproteínas. Formadas exclusivamente o predominantemente por aminoácidos.
 - Proteínas conjugadas o Heteroproteínas. Poseen un componente de proporción significativa no aminoacídico que recibe el nombre de grupo prostético. Según la naturaleza de este grupo se consideran a las glicoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, metaloproteínas, hemoproteínas o cromoproteínas (Proteínas, 2012).

- De acuerdo a su morfología y solubilidad.
 - Proteínas fibrosas. Son insolubles en agua, presentan formas moleculares alargadas, con un número variado de cadenas polipeptídicas que constituyen fibras resistentes, con cierto grado de

elasticidad, fragilidad o ductilidad. Funcionan como proteínas estructurales o de soporte. Las más comunes son: Elastina, Colágeno, Queratina, Fibrina.

- Proteínas Globulares. Tienden a ser más solubles en agua, debido a que su superficie es polar. Sin embargo, pueden presentar mayor solubilidad en otros solventes como soluciones salinas, ácidos o bases diluidas o alcohol. Su estructura es compacta con formas casi esféricas. La mayoría de las proteínas conocidas son globulares, dentro de las que se consideran todas las enzimas, las proteínas del plasma y las presentes en las membranas celulares (Proteínas, 2012). Las proteínas globulares se pueden clasificar de acuerdo con su solubilidad en: albúminas, globulinas, glutelinas, prolaminas, sistonos, protaminas.

■ De acuerdo a su función biológica

- Proteínas estructurales. Forman parte de células y tejidos a los que confieren apoyo estructural. Dentro de estas podemos citar, el colágeno, la elastina, las queratinas y la espectirna.
- Proteínas de transporte. Transportan sustancias como el oxígeno en el caso de la hemoglobina y la mioglobina, ácidos grasos en el caso de la albúmina de la sangre, o las que realizan un transporte transmembrana en ambos sentidos.
- Proteínas de defensa. Protegen al organismo contra posibles ataques de agentes extraños, como los anticuerpos (inmunoglobulinas), los interferones y el fibrinógeno.
- Proteínas hormonales: Se sintetizan en un tipo particular de células pero su acción la ejercen en otro tipo, se puede citar a la insulina.

- Proteínas como factores de crecimiento. Estimulan la velocidad de crecimiento y la división celular, como ejemplo la hormona de crecimiento y el factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- Proteínas catalíticas o enzimas. Permiten aumentar la velocidad de las reacciones metabólicas. Entre otras se consideran las enzimas proteolíticas.
- Proteínas contráctiles. Poseen la capacidad de modificar su forma, dando la posibilidad a las células o tejidos que estén constituyendo de desplazarse, contraerse, relajarse razón por la cual se encuentran implicadas en los diferentes mecanismos de motilidad. Ejemplo de éstas son la actina y la miosina.
- Proteínas receptoras. Se encargan de combinarse con una sustancia específica. Si se encuentran en la membrana plasmática, son las encargadas de captar las señales externas o simplemente de inspeccionar el medio. Si encuentran en las membranas de los organelos, permiten su interacción. Sin embargo, no son proteínas exclusivas de membrana ya que algunas se encuentran en el citoplasma. Un ejemplo son los receptores de las hormonas esteroides.
- Proteínas de transferencia de electrones. Son proteínas integrales de membrana, comunes en las mitocondrias y cloroplastos cuya función se basa en el transporte de electrones desde un donador inicial hasta un aceptor final con liberación y aprovechamiento de energía. Como ejemplo se citan a los Citocromos que hacen parte de la cadena respiratoria (Proteínas, 2012).

4.3 Estructuras de las proteínas

De acuerdo a su estructura, las proteínas se dividen en cuatro grupos: estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, las características principales de estos grupos se desglosan a continuación.

4.3.1 Estructura primaria

Las proteínas constan de un esqueleto formado por la secuencia repetida de los grupos nitrógeno-carbono alfa y carbonilo. Los enlaces que se forman y la secuencia de restos de aminoácidos que forman cada proteína se conocen como su estructura a nivel primario (Anatomía de una proteína, 2012). Es decir, la estructura primaria se considera a la secuencia lineal específica (sin ramificaciones) de aminoácidos de una cadena polipeptídica la cual es el resultado de la traducción de la información genética contenida en la secuencia de nucleótidos del ADN. Su importancia desde el punto de vista químico, radica en la secuencia de los grupos laterales de los aminoácidos dado que es el componente variable de la molécula que proporciona la identidad a la cadena. El significado biológico de esta secuencia se basa en el control que ella ejerce en la organización de los niveles de complejidad superiores de la estructura proteica ya que esta permitirá en última estancia la determinación de su actividad biológica, es decir, la secuencia de aminoácidos tiene la información necesaria para que la molécula adopte una conformación tridimensional adecuada (Proteínas, 2012).

4.3.2 Estructura secundaria

Esta estructura consiste en el enrollamiento de la cadena peptídica sobre su propio eje para formar una hélice o alguna otra estructura tridimensional específica. La más común es la α -hélice, la cual se caracteriza por formar una estructura geométrica en espiral uniforme, en la que cada vuelta está constituida por 3,6 aminoácido, se mantiene mediante puentes de hidrógeno entre el hidrógeno del grupo amino del enlace peptídico de un aminoácido y el grupo carboxilo del enlace peptídico de otro (Proteínas, 2012). Un ejemplo de este nivel de organización es el colágeno que se puede visualizar en la FIGURA No.3 .

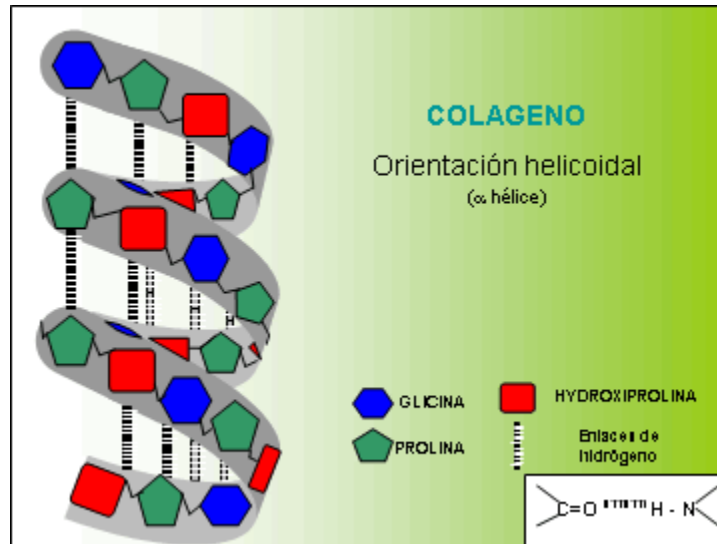


FIGURA No.3. Proteína Colágeno. Ejemplifica una orientación α -hélice (Proteínas, 2012).

Otro tipo de estructura secundaria es la hoja β -plegada, que se caracteriza por presentarse de forma aplanada y extendida, además posee un máximo de enlaces de hidrógeno entre los enlaces peptídicos, consta de varias cadenas peptídicas que permanecen enfrentadas y se mantienen juntas con enlaces de hidrógeno en un arreglo a manera de zig-zag (Ver FIGURA No.4.). La estructura laminar formada le confiere flexibilidad más no elasticidad. Debido a que toda cadena polipeptídica tiene un extremo C-terminal en una dirección y un extremo N- terminal en la otra, dos cadenas enlazadas con hidrógeno y una al lado de la otra pueden correr en la misma dirección, paralelas, o en dirección opuesta, antiparalela. Un ejemplo de estas proteínas es la fibroína de la seda (Proteínas, 2012).

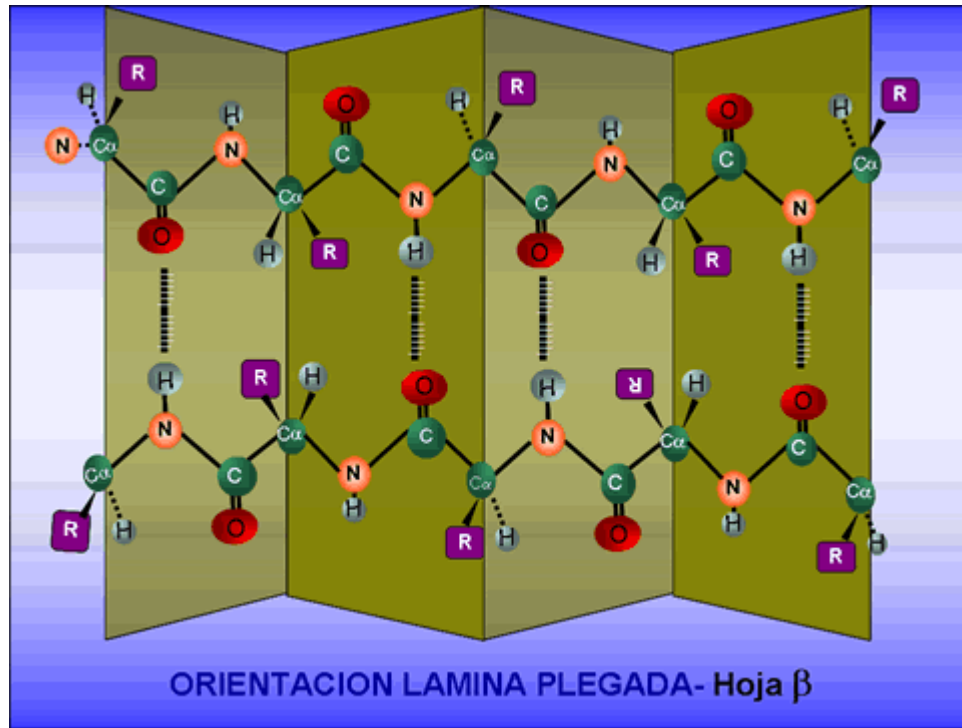


FIGURA No.4. Estructura secundaria en forma de hoja β -plegada (Proteínas, 2012).

4.3.3 Estructura terciaria

Es la organización global de un polipéptido con todas sus características de dicha cadena (Anatomía de una proteína, 2012), por lo que es una forma tridimensional compleja que describe la conformación definitiva y específica de la proteína. Durante el enrollamiento de la cadena peptídica, para dar origen a la estructura terciaria, los puentes de hidrógeno y las interacciones iónicas e hidrofóbicas entre una parte de la cadena y otra son las fuerzas que mantienen los pliegues en posición espacial correcta. Por otra parte, los puentes disulfuro (-S-S-) que se forman entre los aminoácidos de cisteína pueden acercar partes que se hayan distantes en una proteína, de hecho algunos sitios activos de enzimas están constituidos por ellos. Además, en la proteína también se forman algunos otros enlaces covalentes para mantener su estructura terciaria que por lo general es globular (Proteínas, 2012). El análisis de muchas proteínas ha permitido encontrar que dentro de la estructura terciaria existen regiones que poseen una cierta independencia en su organización, como si se plegasen ligeramente separadas una

de otra, sin que en realidad dejen de establecer contactos entre si. A menudo estas regiones poseen la capacidad de realizar una parte de la función de la proteína completa, como podría ser la habilidad de reconocer a una molécula específica o de interactuar con otra macromolécula. En muchos casos, si por medios artificiales es posible separar esta región del resto de la cadena del polipéptido, este segmento de la cadena adopta una estructura semejante a la que presenta en la proteína completa y sigue siendo capaz de interactuar con su ligando específico, estas regiones son conocidas como dominios (Anatomía de una proteína, 2012), se caracterizan por poseer una geometría casi esférica específica con un interior hidrofóbico y un exterior polar. Una proteína puede presentar más de un dominio, a menudo interconectados por un segmento polipeptídico carente de estructura secundaria regular (Ver FIGURA No.5.) y alternativamente estar separados por una hendidura o una región menos densa en la estructura terciaria de la proteína. Los diferentes dominios de una proteína pueden gozar de movimiento relativo que está asociado con una función (Proteínas, 2012).

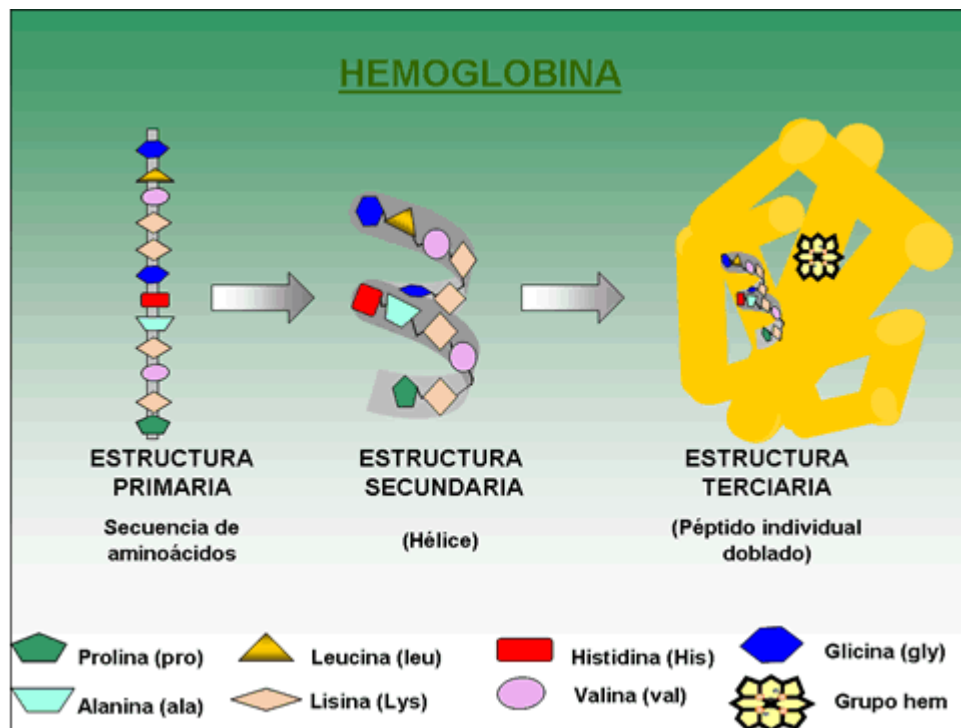


FIGURA No.5. Secuencia de conformación de la proteína hemoglobina hasta llegar a su estructura terciaria (Proteínas, 2012).

4.3.4 Estructura cuaternaria

La estructura cuaternaria de las proteínas es el nivel de estructuración más alto dentro de una proteína (Anatomía de una proteína, 2012). Muchas proteínas tienen dos o más cadenas plegadas de polipéptidos (subunidades) para formar su estructura terciaria. En la estructura cuaternaria se consideran moléculas proteicas superiores a los 50 mil daltons en donde las subunidades constitutivas pueden ser idénticas o diferentes y se asocian para formar dímeros, trímeros y tetrameros. En algunos casos las cadenas aisladas son inactivas, pero en otros pueden cumplir la misma función que el complejo, aunque con diferente cinética. El ejemplo más conocido es la hemoglobina en donde las interacciones hidrofóbicas, los enlaces de hidrógeno y los enlaces iónicos ayudan a mantener las cuatro subunidades juntas para formar una molécula funcional, así cada subunidad de hemoglobina se pliega de manera similar a la estructura terciaria de mioglobina. Dado que la hemoglobina dentro de los glóbulos rojos está constituida por dos cadenas alfa y dos cadenas beta (Ver FIGURA No.6) que permiten tomar una molécula de oxígeno, para "atrapar" moléculas adicionales de oxígeno, las cuatro subunidades cambian ligeramente su conformación y los enlaces iónicos se rompen para exponer las cadenas y facilitar esta función. Esto indica que las asociaciones estrechas de las cadenas de polipéptidos dentro de la misma proteína proporcionan un tipo de comunicación entre las unidades y se puede entender que en las cadenas de aminoácidos existen dos tipos de información: uno que genera la conformación adecuada de las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias y otro que permite la reactividad correcta de las moléculas (Proteínas, 2012).

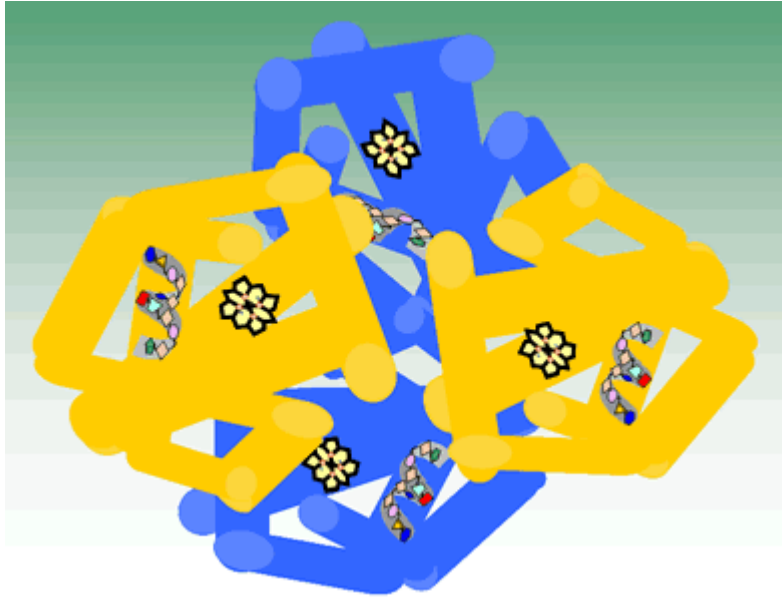


FIGURA No.6. Estructura Cuaternaria de la hemoglobina. Observe los grupos hem en cada dominio (Proteínas, 2012).

4.4 Factores que afectan la estabilidad estructural de las proteínas o desnaturalización

La actividad biológica de la proteína depende en gran medida de su estructura terciaria específica, cuando se somete a factores como el calor, sustancias químicas o cambios bruscos de pH; su estructura terciaria se desorganiza y las cadenas peptídicas adquieren una conformación al azar lo que induce a la pérdida de su actividad biológica. Las temperaturas elevadas, rompen fácilmente los puentes débiles de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas a causa del aumento en la energía cinética de las moléculas. La alteración del pH puede cambiar el patrón de ionización de los grupos carboxilo y amino en las cadenas laterales de los aminoácidos desorganizando el patrón de atracciones y repulsiones iónicas que contribuyen a la estructura terciaria normal. La pérdida de la estructura terciaria se denomina desnaturalización, y siempre se acompaña de la alteración de las funciones biológicas normales de las proteínas. La desnaturalización se puede originar por calor o concentraciones altas de sustancias polares y solventes no polares tales como la úrea que rompen los puentes de hidrógeno que mantienen la

estructura de la proteína. Generalmente la desnaturalización es irreversible, particularmente si muchas proteínas desnaturalizadas interactúan en eventos no específicos al azar, como se presenta en los cuerpos de inclusión característicos de algunas enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, en algunos casos la desnaturalización es reversible, y una vez las condiciones del ambiente vuelvan a su estado normal, la proteína puede adquirir su forma activa (ejemplo la lisosima). En este caso se habla de renaturalización (Proteínas, 2012).

Capítulo 5. Métodos de cuantificación y separación de proteínas

5.1 Importancia de las proteínas

El interés en las investigaciones sobre las plantas medicinales como posibles fuentes de obtención de principios activos, ha surgido en instituciones especializadas en cáncer, ejemplo de ello es el Instituto de Investigaciones del Cáncer de Estados Unidos, que desde 1955 desarrolló investigaciones y coordinó un programa voluntario de cooperación para la terapia contra esta enfermedad. De esta forma se han evaluado más de 400 000 sustancias sintéticas y naturales, las cuales poseen alguna actividad antitumoral.

De los productos de origen natural con actividad anticancerígena, los más conocidos son los alcaloides de la vinca (vinblastina y vincristina), aisladas de la Madagascar periwinkle *Catharantas roseus*, *C. roseus*, fueron usadas por varias culturas para el tratamiento de la diabetes. Fueron descubiertas durante una investigación de la planta, con fuerte potencial de agentes hipoglicémicos, sin embargo su descubrimiento fue indirectamente atribuido a la observación de un uso no relacionado (Laza, et.al; 2003).

Las proteínas han sido foco de estudio para los investigadores, ya que dentro de sus efectos se han descubierto beneficios, como la actividad anticancerígena, propiedad que poseen las lectinas. (Castillo, et.al; 2005). Las

lectinas son un grupo de proteínas que son estudiadas debido a: estudio de la estructura de las membranas, detección de transformaciones malignas, purificación de glicoconjugados, estudios citogenéticos, histoquímicos, enzimáticos y en tipificación de grupos sanguíneos (Hernández, et.al; 1999). Un ejemplo, *Phaseolus vulgaris* inhibe el crecimiento a altas concentraciones atacando al cáncer colorrectal humano (Castillo, et.al; 2005).

Estas proteínas se utilizan también para la inmunización contra virus productores de inmunodeficiencia y algunos tumores y, como medicamentos para prevenir metástasis. Las propiedades citotóxicas de algunas lectinas como la Ricina y Abrina, generan interés como potenciales armas terapéuticas en el tratamiento del cáncer humano (Hernandez, et.al; 1999).

En el 2002 se demostró que la *Viscum album* induce la apoptosis en células de hepatocarcinoma humano SK-Hep-1 y Hep3B, a través de la activación de las proteasas caspasa-3. También inhibe la actividad de la telomerasa (Castillo, et.al; 2005).

El aislamiento y cuantificación de las proteínas de las plantas, y sus propiedades, tienen suma importancia para su utilización como opción terapéutica contra el cáncer.

Las proteínas pueden ser purificadas según sus tamaños, solubilidades, cargas y afinidades de enlace. Las proteínas pueden separarse de las moléculas pequeñas por medio de una diálisis a través de una membrana semipermeable, como la membrana porosa de celulosa. Las moléculas con dimensiones significativamente mayores que el diámetro del poro quedan retenidas dentro del saco de diálisis al tiempo que las moléculas y los iones menores atraviesan los poros de la membrana y aparecen en el dializado fuera del saco de diálisis. La

solubilidad de la mayoría de las proteínas disminuye frente a elevadas concentraciones de sales. Este efecto, llamado desalado o salting -out resulta útil. La dependencia de la solubilidad respecto a la concentración salina difiere de una proteína a otra. Salting-out puede utilizarse para el fraccionamiento de las proteínas o para concentrar disoluciones diluidas de proteínas (Stryer, 1995).

Para el aislamiento de una proteína, se debe de realizar ruptura celular, posteriormente poder extraer la proteína con un tampón adecuado. El método de ruptura a elegir depende de las características mecánicas del tejido o células de donde se va a aislar la proteína, así como de su localización. Entre los distintos métodos están:

□ **Lisis celular.** Válido para células sin pared celular como las células de tejidos animales, pero no es suficiente para células vegetales o bacterias. Se suspende las células en una solución hipotónica. Debido a la diferencia osmótica el agua difunde al interior de la célula, causando su hinchamiento y ruptura.

□ **Destrucción mecánica.** La *homogenización* (hacer pasar las células entre un tubo y un pistón de vidrio que ajustan casi totalmente); triturar en *mortero* con arena o alúmina; *molino con perlas* de vidrio, la *prensa de French*, la *sonicación*.

□ **Congelación-descongelación.** La ruptura se produce al someter las células a un cambio brusco de temperatura, congelando primero a -196 °C y pasándolas rápidamente a temperatura ambiente.

Durante el proceso de ruptura, se utilizan tampones de extracción para solubilizar a las proteínas, como disoluciones acuosas de tampones específicos para proteínas solubles.

Una vez que la proteína se ha extraído de su entorno natural está expuesta a muchos agentes que pueden dañarla como cambios bruscos de pH, ácidos y bases fuertes, temperaturas extremas y la acción de las proteasas. Para minimizar estos

daños la purificación se lleva a cabo en disoluciones tamponadas, a bajas temperaturas (4°C) y se procura que el proceso sea lo más corto posible.

El resultado de estos tratamientos es un lisado u homogenizado que contiene una mezcla de enzimas, membranas y células rotas. Esta preparación se somete a centrifugación (10.000 - 15.000 rpm) para eliminar los restos celulares y separar, el sobrenadante que contiene las proteínas solubles, del precipitado que contiene restos celulares.

Para purificar una proteína es imprescindible tener un método para detectar cuantitativamente su presencia. El método debe ser específico y fácil de llevar a cabo.

5.2 Método de Biuret

Una solución diluida de sulfato cúprico en tartrato alcalino, es adicionado a una solución proteica de 1 - 6 mg/mL, formándose un complejo ión cúprico tetracoordinado, resultado de la interacción de los iones Cu^{2+} con el nitrógeno peptídico de las cadenas del péptido; esta reacción no depende de una composición amino específica, como el Cu^{2+} reacciona con la cadena peptídica en vez de reaccionar con el sitio de los grupos, obteniéndose de esta forma un complejo de color violeta - púrpura, que presenta una absorbancia máxima de 540 -560 nm (Hall, 1996). La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos), y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. La sensibilidad del método es muy baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados (Fernández y Galván, 2006).

Este método es uno de los más comunes, se basa en la interacción del ión cúprico (Cu^{2+}) con proteína en una solución alcalina y el desarrollo resultante de

absorbancia de 545 nm. Para reducir la interferencia de sustancias, la proteína puede ser precipitada (Farmacopea US, 2008).

5.3 Liofilización

Es un proceso de secado por congelación en el que el agua es sublimada directamente de un material previamente congelado; esta técnica se aplica cuando el producto en solución es químico, biológico y térmicamente inestable en las condiciones normales de almacenaje (Fernández, 1998).

Algunas ventajas son:

1. Facilidad en procesar un líquido.
2. Mejora la estabilidad de un polvo seco.
3. Aumento en la rapidez de disolución después de la reconstitución (rehidratación) de la "pastilla" liofilizada.

Algunas características de una liofilización exitosa son:

1. Actividad biológica intacta al momento de la reconstitución.
2. Disolución rápida al ser reconstituida.
3. Compacta para prevenir el agrietamiento y pulverización.
4. Color uniforme.
5. Forma y tamaño invariable comparado con la masa congelada de la cual provino.

El hielo puro se separa y la solución residual se vuelve más concentrada con respecto al soluto, hasta que se forma una composición en la cual el agua y el soluto solidifican. Se enfría de 5-10°C por debajo del punto eutéctico y se mantiene de 2-3 horas.

El solvente (vapor) es extraído directamente del material (congelado). El hielo únicamente sublima por debajo del punto triple del agua (0.01°C y 6.09 milibar). El secado inicia por la parte superior del material congelado.

Remover la humedad residual de la “pastilla” porosa, esto depende de la naturaleza del material, la temperatura del producto y la presión de vapor. Es necesario para remover el agua absorbida. Ayuda a la estabilidad (Fernández, 1998).

5.4 Electroforesis PAGE

5.4.1 Fundamento

Es una técnica que se caracteriza por el desplazamiento de una molécula con carga neta en un campo eléctrico. Es un método importante para la separación de macromoléculas como proteínas, DNA y RNA (Stryer, 1995).

Se basa o fundamenta en la migración de moléculas, coloides, proteínas u otras partículas cargadas eléctricamente cuando están disueltas o suspendidas en un electrolito con paso de corriente (Farmacopea US, 2008).

La separación de las proteínas se basa en su tamaño o peso molecular, su carga y su estructura (Devlin, 2006).

Las razones por las cuales la electroforesis se lleva a cabo en un soporte sólido como lo es el gel, son las siguientes:

- Suprime las corrientes de convección producidas por pequeños gradientes de temperatura y confiere una separación más efectiva.
- Sirve como tamices moleculares, es decir, las moléculas más pequeñas que los poros del gel se desplazan fácilmente a través

de él, mientras que las mayores que los poros del gel permanecen casi inmóviles. Los geles de poliacrilamida son químicamente inertes y se forman por la polimerización de la acrilamida; dependiendo de las concentraciones de ésta con la metilénbisacrilamida se consiguen diferentes tamaños de poro controlados (Stryer, 1995).

5.4.2 Clasificación

El método de separación de proteínas PAGE se clasifica en dos tipos:

- Electroforesis no desnaturalizante o nativa.
- Electroforesis desnaturalizante.

5.4.3 Electroforesis no desnaturalizante

También es llamada electroforesis nativa.

- Somete las proteínas a migración sin desnaturalización.
- En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma.
- Mantienen en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos.
- Los sistemas tampón empleados en estos caso son: tris-glicina (rango de pH 8.3 a 9.5), tris-borato (rango de pH 7.0 a 8.5) y tris-acetato (rango de pH 7.2 a 8.5) (Métodos en Biología Celular, 2009).

5.4.4 Electroforesis desnaturalizante

- Somete las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional).
- El agente desnaturalizante más empleado es el sodiododecilsulfato o SDS, el cual es un detergente (Métodos en Biología Celular, 2009).

- Se une una molécula de SDS por cada 2 a.a.
- Carga. En SDS-PAGE a las proteínas se les confiere una carga neta negativa que es proporcional a su masa, por lo tanto, estas migraran únicamente hacia el ánodo.

En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula, pero no a su forma (Métodos en Biología Celular, 2009).

- Peso molecular. Se puede separar moléculas de movilidad electrofóretica similar si tienen diferente peso molecular.
- Estructura tridimensional. En SDS-PAGE las proteínas son desnaturalizadas, quedándose en su estructura primaria, separándose en subunidades que corresponden a cada cadena polipeptídica.

Capítulo 6. Genotoxicidad y antigenotoxicidad

6.1 Definición

Las técnicas citogenéticas han sido utilizadas para detectar la actividad genotóxica de compuestos potencialmente peligrosos y para la predicción de potenciales problemas de salud.

Un genotóxico es un compuesto que produce alteraciones en los ácidos nucleicos, modificando las características heredables o inactivando el DNA. En la mayoría de los casos, los genotóxicos tienen propiedades físicas o químicas similares a los ácidos nucleicos que les facilitan su interacción.

Los compuestos genotóxicos tienen la capacidad de alterar el material genético en los organismos, incluido el hombre y además pueden tener efectos teratogénicos, causar mutaciones en las células germinales, inducir enfermedades cardíacas, influir en los procesos de envejecimiento y generar mutaciones en las células somáticas que pueden contribuir al desarrollo del cáncer (Gómez y Zuñiga, 2007).

En cambio, los compuestos antígenotóxicos se caracterizan por contrarrestar los efectos causados por los agentes genotóxicos, disminuir las alteraciones en el DNA, reducir las posibilidades de desarrollo cancerígeno y actuar contra los radicales libres disminuyendo el envejecimiento.

La prueba de aberraciones cromosómicas es una de las más relevantes porque evalúa la totalidad del genoma para identificación de plaguicidas, mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos. Las pruebas de ICH's y micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana han sido usadas para monitorear poblaciones expuestas a agentes mutagénicos y carcinogénicos. Una incrementada frecuencia de aberraciones cromosómicas y micronúcleos en relación con el control indica un mayor riesgo potencial de cáncer en el grupo expuesto. No se puede predecir cuál sería la consecuencia biológica específica de las aberraciones cromosómicas y micronúcleos en estudio, pero si pueden significar problemas potenciales de salud en la población. El estudio de los cromosomas puede llevarse a cabo en forma directa en células de multiplicación activa como las de la médula óseo, o en condiciones patológicas en células neoplásicas. También pueden observarse los cromosomas en meiosis obtenidos directamente de una biopsia gonadal o de una muestra del líquido seminal. Sin embargo, los procedimientos empleados frecuentemente son las técnicas de cultivo in vitro.

6.2 Mitomicina C

La Mitomicina C es una de las tres entidades íntimamente emparentadas que fueron aisladas del complejo antibiótico elaborado por la bacteria *Streptomyces caespitosus* del suelo del Japón (Remington, 1990).

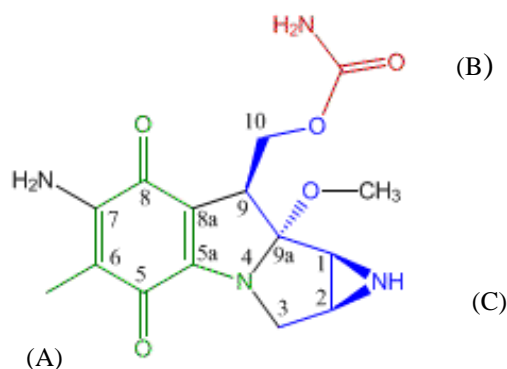


FIGURA No.7. Estructura química de la Mitomicina C. Fármaco que contiene a tres grupos activos: (A) Quinona, representada por el color verde; (B) Carbamato, representado por el color rojo y (C) Aziridina, representada por el color azul (Mitomicina, 2009).

Dentro de la quimioterapia del cáncer podemos encontrar dos tipos de fármacos: fármaco del ciclo celular específico (CCE), y fármaco del ciclo celular no específico (CCNE). El primero actúa sobre las células tumorales durante su ciclo de proliferación, y no cuando están en la fase G_0 . El segundo actúa durante su ciclo de proliferación y también durante la fase de reposo. La Mitomicina C es un fármaco CCNE metabolizado por enzimas hepáticas para formar un alquilante que causa entrecruzamientos en el DNA (Katzung, 1995). Contiene a los grupos quinona, carbamato y aziridina (ver FIGURA No.7.), que son activos; se dice que el fármaco es alquilante “biorreductor” porque sufre una activación metabólica por una reducción mediada por la reductasa del citocromo P-450 o subunidades para generar un agente alquilante (Katzung, 1987).

Actúa como alquilante bifuncional o trifuncional, produce entrecruzamiento del DNA e inhibe su síntesis estableciendo enlaces cruzados de doble cadena a través de guanina y citosina. En menor grado también inhibe la síntesis de RNA y de proteínas porque la RNA polimerasa dependiente del DNA es inhibida por la MMC y así disminuye la transcripción. Este agente puede llevar a mutaciones en el DNA (Cáncer, 2009) (Remington, 1990).

La Mitomicina C es utilizada en el tratamiento de varios tipos de cáncer:

- Cáncer gástrico
- Cáncer colorectal
- Cáncer de seno
- Cáncer de pulmón de célula no pequeña
- Cáncer de cabeza y cuello
- Papilomas pequeños de la vejiga urinaria
- Cáncer pancreático
- Cáncer del cervix

6.3 Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH)

El ICH es un evento celular normal que representa un intercambio simétrico y recíproco entre loci homólogos de productos de replicación, los cuales se producen por ruptura y reparación posterior del DNA y en los loci que se intercambian durante la fase de síntesis del ciclo celular, ocurren sin pérdida de DNA ni cambios en la morfología cromosómica y se pueden detectar en preparaciones cromosómicas en metafase, obtenidas de cultivos adicionados con un análogo de una base de DNA (Pérez, et.al; 1990).

La técnica de ICH se ha utilizado para monitorear poblaciones expuestas a agentes mutagénicos y carcinogénicos, es usada para evaluar exposición pero no predice potenciales riesgos de salud, puesto que las consecuencias biológicas de los ICH son desconocidos. Esta prueba ha provisto un método de gran valor para determinar si un químico es potencialmente mutagénico.

En el último siglo, Hugo de Vries describió las mutaciones en las plantas *Oenothera* este estudio fue publicado debido a la segregación de los cromosomas. El estudio de los cromosomas se volvió fácil debido a la introducción del choque

hipotónico para propagar a los cromosomas en células mamíferas y la técnica para la cosecha de linfocitos humanos usando Fitohemaglutinina (PHA) como mitógeno. De esta forma, la mayor parte de los fundamentos en citología de los cromosomas fueron establecidos.

Tjio y Levan reportaron que el número diploide de los cromosomas en el humano es de 46. La importancia de ambos, la estructura y el número de cromosomas, cambiaron el rumbo de la salud humana. Varias enfermedades y síndromes, como el síndrome de Down (trisomía 21), síndrome de Edward (trisomía 18), síndrome de Patau (trisomía 13), síndrome de Turner (XO) y el síndrome de Klinefelter (trisomía X) fueron asociados a las aberraciones cromosómicas. El análisis cromosómico de los abortos espontáneos indican que cerca del 50% de éstos son por aberraciones cromosómicas.

Muchos tipos de cáncer humano están asociados con aberraciones cromosómicas específicas y no específicas. Varias enfermedades recesivas en humanos como ataxia telangiectasia, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom están asociadas con frecuencias elevadas de aberraciones cromosómicas.

En los años 30's, Karl Sax estableció los conceptos básicos sobre las aberraciones cromosómicas inducidas por radiación con su hipótesis "primer ruptura", implicando el evento inicial de la inducción de la radiación siendo una ruptura cromosómica y este puede permanecer abierto, reuniéndose con otro fragmento o sustituyéndolo. Esto puede ser apreciado en las ideas básicas que fueron generadas cuando la estructura del DNA fue estudiada (Natarajan, 2005)

El prueba de ICH consiste en la evaluación de un agente químico mediante el establecimiento de una curva dosis-frecuencia de ICH en células que pueden ser linfocitos T, células de médula ósea u otras (Cuperio, 1996).

Los ICH se pueden clasificar dependiendo del número de intercambios dentro de cada cromosoma:

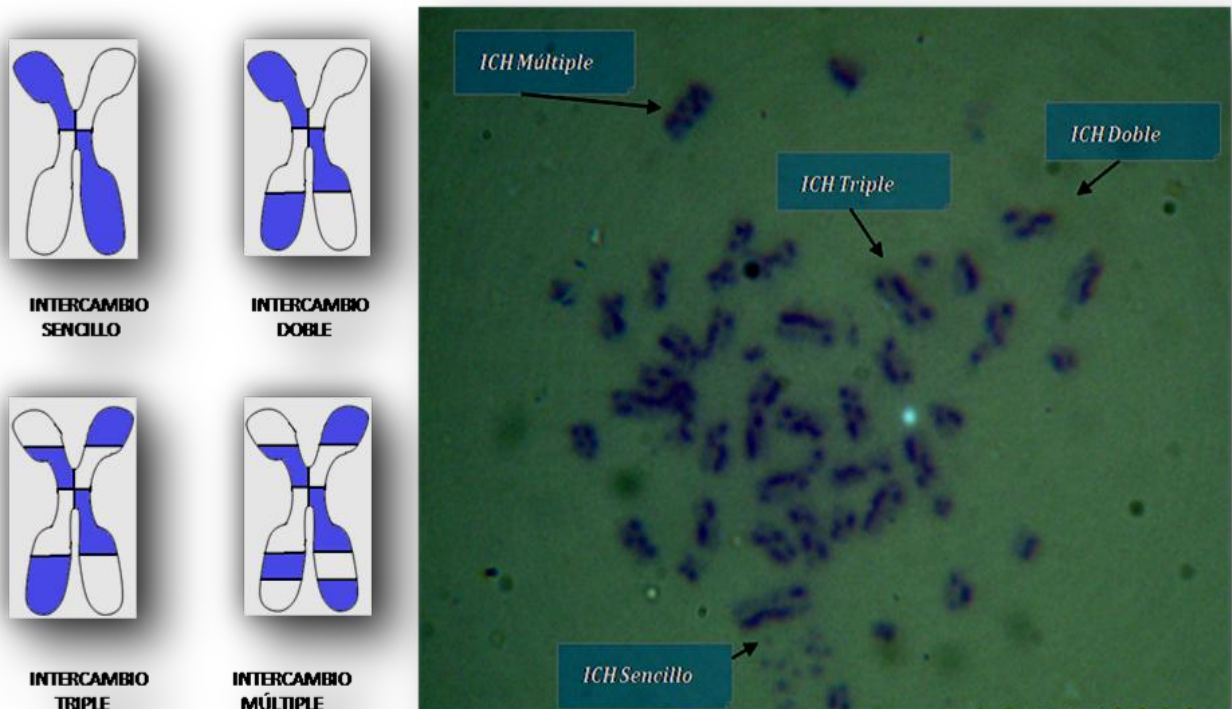


FIGURA No. 8. Tipos de intercambios. Fotografía de metafase de segunda división observada en microscopio óptico con el objetivo de 100X, donde se puede ver los diversos intercambios, como sus nombres lo indican: sencillo, donde sólo un fragmento es intercambiado, doble, involucra a dos fragmentos intercambiados, triple, tres fragmentos son intercambiados y múltiple donde cuatro a más fragmentos se intercambian (Realizado por Arreguín Yesenia, 2010).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad que afecta a miles de personas alrededor del mundo anualmente y la quimioterapia juega un gran valor para contrarrestar al padecimiento. Los costos de este tipo de tratamiento son elevados, tanto en el aspecto económico como en salud, por lo que se han realizado varias investigaciones para encontrar otras alternativas que puedan disminuir las desventajas de los tratamientos actuales y sobre todo para que el paciente tenga una mejor calidad de vida.

Dentro de estas alternativas podemos encontrar aquellas que utilizan plantas. La familia de las leguminosas es muy extensa, por tal motivo han sido foco de investigación, ya que sus proteínas son diversas y se ha comprobado que tienen un efecto antitumoral y anticancerígeno. La importancia de esta investigación radica en la utilización de extractos vegetales de *Pisum sativum*, con el fin de utilizarla como una opción terapéutica contra el cáncer. Esta planta posee acción específica contra numerosas dermatosis, pero la razón de este proyecto, es la acción anticancerígena que poseen sus proteínas.

La intención de este trabajo es dar un panorama más amplio sobre la importancia de la utilización de recursos vegetales como una opción contra el cáncer. Para esto, se extrajeron proteínas de *Pisum sativum* mediante un método sencillo, con la finalidad de evaluar *in vitro* un posible efecto antigenotóxico. Para tal fin, se realizó una técnica útil dentro de la Genética Toxicológica, que es el Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH). Así, se pretende abrir paso a una posible línea de investigación enfocada en una alternativa contra el cáncer con un producto al alcance de todos y, además, cosechado en México.

OBJETIVOS

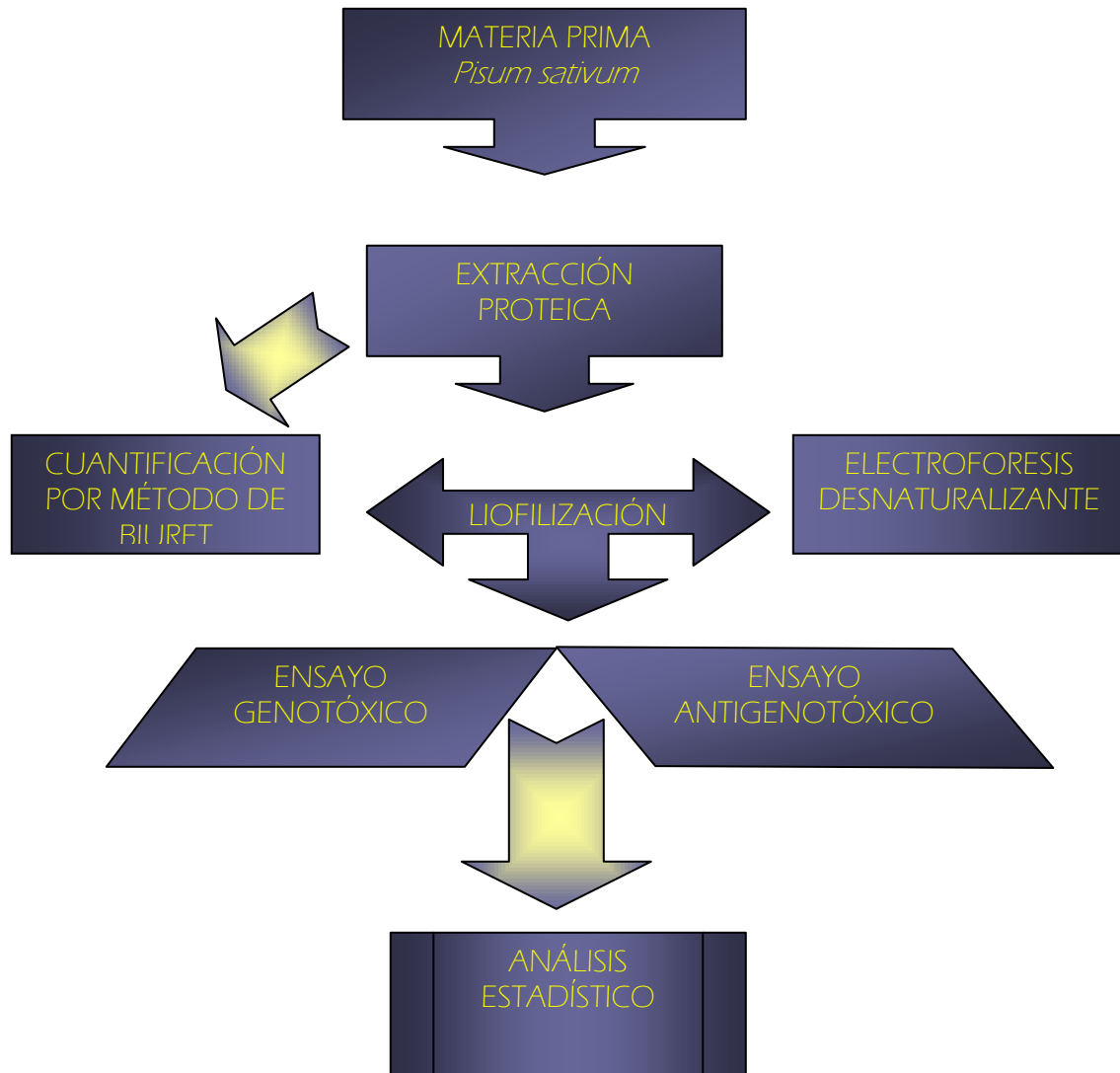
GENERAL

Extraer de *Pisum sativum* una solución proteica y caracterizar electroforéticamente sus proteínas, para evaluar su antigenotoxicidad mediante la técnica de Intercambios de Cromátides Hermanas *in vitro* (en cultivo de linfocitos humanos) frente al daño ocasionado por la Mitomicina C.

PARTICULARES

- Obtener un extracto proteico a partir de semillas de *Pisum sativum* mediante un método de extracción salina.
- Determinar la concentración de proteínas mediante la técnica de Biuret, elaborando una curva patrón de albúmina para trabajar a diferentes dosis.
- Realizar la liofilización del Extracto proteico de *Pisum sativum* (EpPs) para su concentración, obtención cristalina y conservación.
- Caracterizar las subunidades de dichas proteínas realizando un corrimiento electroforético por el método de PAGE.
- Evaluar mediante la prueba de ICH, la antigenotoxicidad del Extracto proteico de *Pisum sativum* (EpPs) a diferentes dosis (1 mg/mL, 2 mg/mL, 2.5 mg/mL y 3 mg/mL), retándolo contra el mutágeno Mitomicina C (MMC).

DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL



METODOLOGÍA

EXTRACCIÓN PROTEICA DE *Pisum sativum*.

Se remojan 20 g de semillas de chícharo durante 48 horas con agua destilada, al término de este tiempo se macera la materia prima, después se licua en aproximadamente 30 mL SSF al 0.9% y se lleva a 100 mL con esta misma solución. Durante 24 horas se refrigera agitando ocasionalmente durante ese lapso de tiempo y protegiéndolo de la luz cubriendo el contenedor con aluminio. Para finalizar, se filtra con una gasa; el filtrado debe ultracentrifugarse a 14000 rpm durante 15 minutos; se separa el sobrenadante para poder ensayar con él.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE BIURET.

Elaboración de curva patrón.

Para realizar la curva se utiliza Albúmina Bovina Fracción V, ésta se disuelve en NaCl al 0.9 % para obtener una solución con una concentración de 1 mg/mL, la cual servirá como patrón; se prosigue a construir el siguiente sistema, respetando el orden de adición:

TABLA No.3. Montaje de la curva patrón de Albúmina Bovina Fracción V.

TUBO	ALBÚMINA (mL)	NaCl 0.9% (mL)	React. Biuret (mL)
Blanco	0	3.5	1.5
1	0.1	3.4	1.5
2	0.5	3.0	1.5
3	1.0	2.5	1.5
4	1.5	2.0	1.5
5	2.0	1.5	1.5
6	2.5	1.0	1.5
7	3.0	0.5	1.5

Simultáneamente se prepara por duplicado un tubo problema que contiene la solución proteica de *Pisum sativum* (0.1 mL EpPs + 3.4 mL NaCl al 0.9 % + 1.5 mL

React. Biuret), los tubos se incuban en baño María a 50 °C durante 10 minutos, para desarrollar color desde azul hasta morado (dependiendo de la concentración).

Se lee en el espectrofotómetro a 540 nm, obteniendo sus respectivas absorbancias; se grafica la curva patrón (Densidad óptica vs. mg proteína de Albúmina) y se calcula la ecuación de la recta, para sustituir en ésta la absorbancia de la solución de *Pisum sativum*; y así obtener su concentración.

LIOFILIZACIÓN.

El EpPs se guarda en alícuotas de 12 mL por vial, para llevar a cabo un buen rendimiento en la liofilización se deben congelar las muestras a - 20 °C, esto ayuda a que al inicio de la liofilización, no se derrame la muestra y en la liofilizadora, mientras baja la temperatura las muestras se adaptan, ya que si no estaban congeladas adecuadamente, en este paso alcanzan la temperatura óptima para el inicio del proceso.

El proceso de liofilización consta de 3 segmentos, los cuales tienen las siguientes condiciones:

SEGMENTO 1 Tiempo: 3.7 h. Temperatura: - 34 °C.

SEGMENTO 2 Tiempo: 10 h. Temperatura: - 10 °C.

SEGMENTO 3 Tiempo: 7.2 h. Temperatura: 30 °C.

Se programa la liofilizadora bajo estas condiciones y transcurrido el tiempo, se tapan los viales y se conservan en congelación hasta su utilización.

El liofilizado se cuantifica nuevamente por el procedimiento antes descrito.

ELECTROFORESIS SDS - PAGE

Preparación de geles de Poliacrilamida.

Se prepara el gel separador al 10 % y el gel concentrador al 5 %, como se muestra en las siguientes tablas, después de la polimerización se procede a realizar el corrimiento electroforético.

✦ Gel separador:

TABLA No.4. Reactivos y sus proporciones para la realización del gel separador al 10%.

REACTIVO	VOLUMEN (μL)
Soln. de monómeros	2650
4xTris1.5 M pH8.8	1000
SDS 10 %	80
Agua desionizada	3500
Persulfato de amonio 10 %	80
TEMED	8

✦ Gel concentrador:

TABLA No.5. Reactivos y sus proporciones para la realización del gel concentrador al 5%.

REACTIVO	VOLUMEN (μL)
Soln. de monómeros	650
4xTris0.5 M pH6.8	1250
SDS 10 %	50
Agua desionizada	3000
Persulfato de amonio 10 %	50
TEMED	10

Corrimiento electroforético.

Se colocan los geles en la cámara, y se llenan los tanques exterior e interior con buffer de corrida 5x (Tris - Glicina). La solución proteica de *Pisum sativum*, al igual que la Albúmina Bovina Fracción V, se diluyen 1:1 con buffer de carga 2x; en seguida se ponen a ebullición durante 5 min, después se centrifuga a 5000 rpm/1 min. Cargar 30 μg del sobrenadante proteico por carril, se utiliza marcador de bajo

peso molecular BIORAD®, siendo la proteína de referencia la Albúmina Bovina Fracción V. Se conecta a la fuente poder y se deja correr a voltaje de inicio de 80 Volts., al pasar las muestras al gel separador aumentar a 100 Volts. Al final, los geles se sacan de la cámara electroforética y se prosigue con su revelado.

Detección de proteínas con tinción de Azul de Coomasie R - 250.

En esta etapa se deben lavar los geles con agua desionizada por 15 min, al término de esto, se sumergen en aprox. 200 mL de colorante de trabajo azul de Coomasie, se incuban en baño María durante 1 hora a 60 °C. Nuevamente se lavan los geles con agua desionizada y se sumergen en aprox. 200 mL de soln. decolorante. Se vuelven a incubar en baño María durante 1 hora a 60 °C.

Inmediatamente se lavan con agua desionizada para eliminar impurezas. A continuación se conservan en una cubierta plástica. Con la ayuda de una regla se mide la distancia recorrida por el frente del gel y por cada una de las proteínas estándar (marcador de peso molecular). Se calcula el correspondiente Rf (Distancia recorrida de la proteína/ Distancia total recorrida) para cada una de ellas. Después se calcula el logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar. Se prosigue a graficar los valores del logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar frente su movilidad relativa y, finalmente, se calcula la ecuación de la recta, y así, calcular el peso molecular de las proteínas muestra; teniendo en cuenta que el peso molecular de la Albúmina Bovina Fracción V es de 66 kDa, lo que hace referencia si nuestra electroforesis corrió adecuadamente al compararlo con el valor obtenido.

PROCEDIMIENTO DE LA SIEMBRA Y COSECHA DE LINFOCITOS HUMANOS.

Obtención de la muestra sanguínea

Se lava cuidadosamente con agua y jabón la zona de la punción, cerca de un mechero y en una zona estéril se obtienen de 8 - 10 mL de sangre mediante una jeringa previamente heparinizada, se mezcla en forma suave para evitar hemólisis.

Siembra de linfocitos

Se esteriliza el área de trabajo, y se adiciona a cada frasco de cultivo: 8 mL del medio de cultivo (RPMI), el cual ya tiene incluida la PHA (2.5 mL PHA en 150 mL RPMI), colocar 12 gotas de sangre. A las 24 h, se debe adicionar la solución proteica de *Pisum sativum* y la 5-Bromo-2'-Desoxiuridina (5-BrdU) (en el caso de antigenotoxicidad adicionar también la MMC); se mezclan y se incuban a 37 °C durante 72 h. A las 70.5 h se adiciona 1 gota de colchicina al 0.01 %, también se mezclan y se dejan en incubación hasta completar las 72 h. La proporción para cada lote se muestra en las siguientes tablas:

TABLA No.6. Distribución de los cultivos para la determinación de la capacidad mitogénica.

CAPACIDAD MITOGÉNICA		
CULTIVO	EpPs 1 mg/mL (100 µL)	PHA 1 mg/mL (100 µL)
1 Y 2	NO	SI
3 Y 4	SI	NO
5 Y 6	SI	SI

TABLA No.7. Distribución de los tratamientos para la evaluación genotóxica.

ENSAYO GENOTÓXICO			
CULTIVO	EpPs (100 µL)	PHA 1 mg/mL (100 µL)	5 - Brd U 1 mg/mL (45 µL)
1 Y 2	NO	SI	SI
3 Y 4	D1	SI	SI
5 Y 6	D2	SI	SI
7 Y 8	D6	SI	SI

DONDE:

D1 - Dosis 1 (1 mg/mL)

D2 - Dosis 2 (2 mg/mL)

D6- Dosis 6 (6 mg/mL)

TABLA No.8. Distribución de los tratamientos para la evaluación antigenotóxica.

DONDE:

D1 - Dosis 1 (1 mg/mL)

D2 - Dosis 2 (2 mg/mL)

D2.5 - Dosis 2.5
(2.5mg/mL)

D3 - Dosis 3 (3 mg/mL)

ENSAYO ANTIGENOTÓXICO				
CULTIVO	EpPs (100 µL)	PHA 1 mg/mL (100 µL)	MITOMICINA C 0.071 µg/µL (45 µL)	5 - Brd U 1 mg/mL (45 µL)
9 Y 10	NO	SI	SI	SI
11 Y 12	D1	SI	SI	SI
13 Y 14	D2	SI	SI	SI
15 Y 16	D2.5	SI	SI	SI
17 Y 18	D3	SI	SI	SI

Cosecha de linfocitos

Al inicio, se preparan la solución de KCl (0.075 M), se incuba a 37 °C; y la solución fijadora (metanol - ácido acético, 3:1), y ésta se mantiene en refrigeración.

Para cosechar los linfocitos se debe vaciar el contenido en tubos punta V, se centrifuga a 3000 rpm/ 10 min, se retira el sobrenadante y se adicionan 8 mL KCl (0.075 M), y se incuba durante 30 min a 37 °C.

Se centrifuga a 3000 rpm/ 5 min, se retira el sobrenadante y se adiciona 8 mL de solución fijadora y se conserva 30 min en refrigeración a 5°C (se realiza este paso 2 veces más; y se deja 15 min en refrigeración).

Nuevamente se centrifuga a 3000 rpm/ 5 min, en esta ocasión se desecha la mayoría del sobrenadante, solo se deja aproximadamente 10 gotas para resuspender el paquete celular, y de esta manera gotear sobre portaobjetos limpios y fríos. Se dejan secar a temperatura ambiente y se tiñen.

PROCEDIMIENTO PARA LA TINCIÓN DIFERENCIAL.

En esta técnica se dejan madurar las laminillas por 24 h, se utiliza una solución de trabajo de Bisbenzimidá Hoeschst 33258, se colocan de 5-6 gotas de

esta solución en la laminilla, posteriormente, se pone el cubreobjeto para expandir en toda la preparación. Se mantiene en oscuridad durante 30 min, transcurrido ese lapso de tiempo se adicionan alrededor del portaobjetos gotas del buffer de diferenciación. Las laminillas se exponen a UV por 1 h a una distancia no mayor a 1 cm de la lámpara. En seguida se retiran los cubreobjetos mediante inmersión en vaso de precipitados con agua destilada, se secan por gravedad colocándolas en una gradilla. A continuación se sumergen las laminillas por 15 min en solución doble de salina - citrato que se encuentra a una temperatura de 60 °C. Entonces, se enjuagan con agua caliente y luego fría por inmersión. Por último, las laminillas se tiñen con Giemsa al 5 % en buffer de fosfatos pH 6.8 durante 13 min, se enjuagan y se observan al microscopio.

PARÁMETROS A EVALUAR EN LA TÉCNICA DE ICH

Los parámetros que se evalúan son tres: frecuencia de ICH, índice mitótico e índice de replicación.

La genotoxicidad, es el daño producido en el material genético y se puede contabilizar por medio de la **frecuencia de ICH**, es decir, se cuenta el número de ICH por metafase en un total de 25 metafases de segunda división, en seguida, se obtiene el promedio por metafase. En condiciones normales las células humanas presentan una frecuencia relativamente constante de intercambios por metafase, la cual se estima entre 6 a 9 intercambios. Si el promedio excede el límite superior de este rango se habla de un agente genotóxico.

La citotoxicidad es el daño en el metabolismo celular, éste se cuantifica de la siguiente manera:

El **índice mitótico** es indicativo de la capacidad de división celular, en la cual una célula madre origina dos células hijas, las fases del ciclo celular se

pueden alterar ante la presencia de agentes citotóxicos que puedan disminuir el IM a causa de muerte celular, se contabilizan el número de metafases encontradas en 1000 células.

El **índice de replicación** muestra si existen modificaciones o alteraciones en la cinética de proliferación celular, retrasando de esta forma la velocidad de la división celular, lo cual se manifiesta en un acumulo de células en alguna división celular en relación a los valores normales, su relación es la siguiente:

$$\text{Índice de replicación} = \frac{(M1)1 + (M2)2 + (M3)3}{100}$$

DONDE:

M1-Metafases de primera división

M2-Metafases de segunda división

M3-Metafases de tercera división

RESULTADOS

Para determinar la concentración de proteínas del Extracto proteico de *Pisum sativum* (EpPs) se realizó una curva patrón de Albúmina Bovina, se utilizó un stock de esta misma a una concentración de 1 mg/mL, obteniéndose los siguientes resultados:

TABLA No.9. Valores de la curva patrón de Albúmina Bovina Fracción V.

TUBO	ALBÚMINA (mg/mL)	ABSORBANCIA
Blanco	0	0
1	0.1	0.006
2	0.5	0.030
3	1.0	0.060
4	1.5	0.092
5	2.0	0.118
6	2.5	0.150
7	3.0	0.176

Después se graficaron los valores para apreciar su comportamiento, también se calculó la ecuación de la recta.

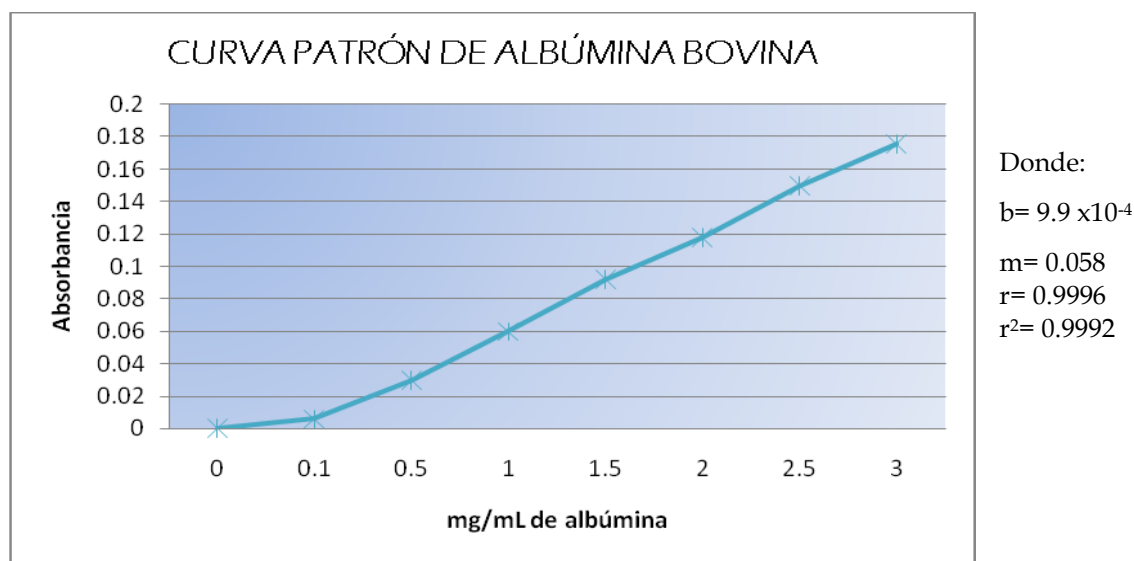


FIGURA No.9. Curva patrón de Albúmina Bovina Fracción V.

Para la cuantificación de proteínas se obtuvo las siguientes absorbancias: 0.041 y 0.038; cuyo promedio fue de **0.040**.

También se construyó una curva patrón de los pesos moleculares y se calcularon los pesos moleculares de las subunidades que constituyen al EpPs, mediante la interpolación de los valores de sus movilidades relativas (Rf) correspondientes.

TABLA No.10. Valores para la construcción de la curva patrón de los marcadores de peso molecular.

Distancia total recorrida: 5.7 cm.

MARCADOR	DISTANCIA RECORRIDA (cm)	Rf	PM (kDa)	Log PM
Fosforilasa B	0.20	0.03	104.365	2.0
Albúmina sérica bovina	0.65	0.1	97.273	1.9
Ovoalbúmina	1.7	0.3	50.419	1.7
Anhidrasa carbónica	2.65	0.4	37.191	1.5
Inhibidor de tripsina de soja	3.4	0.6	29.184	1.4
Lisozima	4.3	0.7	20.163	1.3
También se utilizó una proteína como indicador de que el corrimiento sea adecuado, ésta no entra dentro de la curva patrón				
Albúmina Bovina Fracción V	1.25	0.227	68.301	1.834

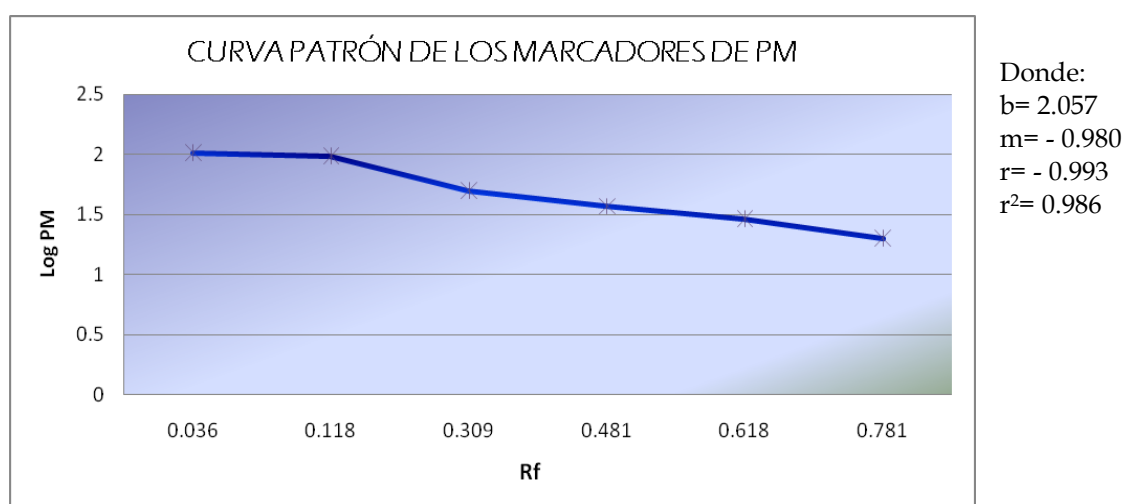


FIGURA No.11. Gráfico de los valores del logaritmo del Peso Molecular (PM) de las proteínas estándar frente a su movilidad relativa (Rf).

Se sustituyó cada uno de los valores de Rf de las subunidades proteicas de *Pisum sativum* en la ecuación de la recta, obteniéndose los valores de Log PM, inmediatamente se hicieron los cálculos para obtener los PM mediante anti Log.

TABLA No.11. Valores de Movilidad relativa (Rf), logaritmo de Peso Molecular (log PM) y Peso molecular (PM) de cada una de las 16 subunidades obtenidas del Extracto proteico de *Pisum sativum* (EpPs).

DISTANCIA RECORRIDA (cm)	Rf	Log PM	PM (kDa)
0.85	0.154	1.906	81
1.10	0.200	1.861	73
1.40	0.254	1.808	64
1.55	0.281	1.781	60
1.80	0.327	1.736	55
1.95	0.354	1.710	51
2.10	0.381	1.683	48
2.30	0.418	1.647	44
2.55	0.463	1.603	40
2.90	0.527	1.540	35
3.35	0.609	1.460	29
3.55	0.645	1.424	27
4.35	0.790	1.282	19
4.55	0.827	1.246	18
4.70	0.854	1.219	17
5.00	0.909	1.165	15

Para llevar a cabo las evaluaciones genotóxicas y antigenotóxicas se obtuvieron metafases en sus diversas etapas, se anexan fotografías obtenidas de las diversas divisiones en la siguiente página.

Metafases obtenidas de primera división de los tratamientos con el Extracto proteico de *Pisum sativum* (EpPs):

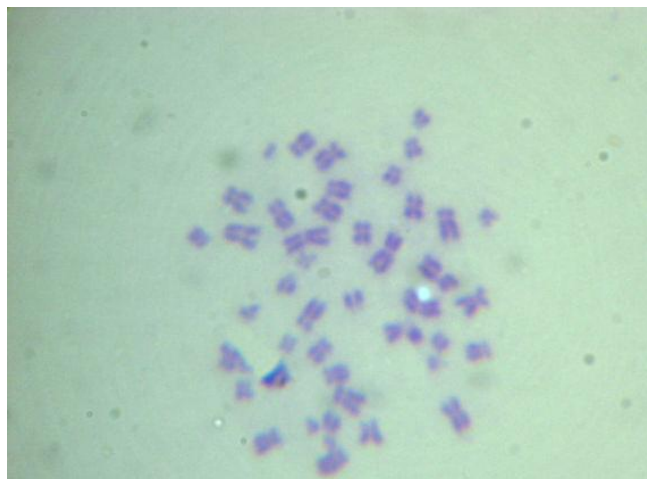


FIGURA No.12. Fotografía de metafases de primera división tomada en el objetivo de 100X de microscopio óptico.

Metafases obtenidas de segunda división de los tratamientos con el Extracto proteico de *Pisum sativum* (EpPs):

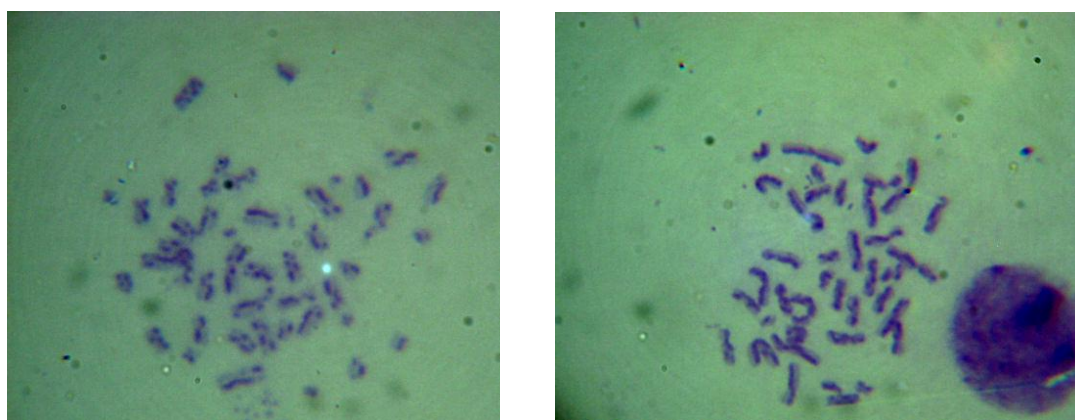


FIGURA No.13. Fotografías de metafases de segunda división tomadas en el objetivo de 100X de microscopio óptico del cultivo tratado con Mitomicina C (MMC).

Metafases obtenidas de tercera división de los tratamientos con el Extracto proteico de *Pisum sativum*:

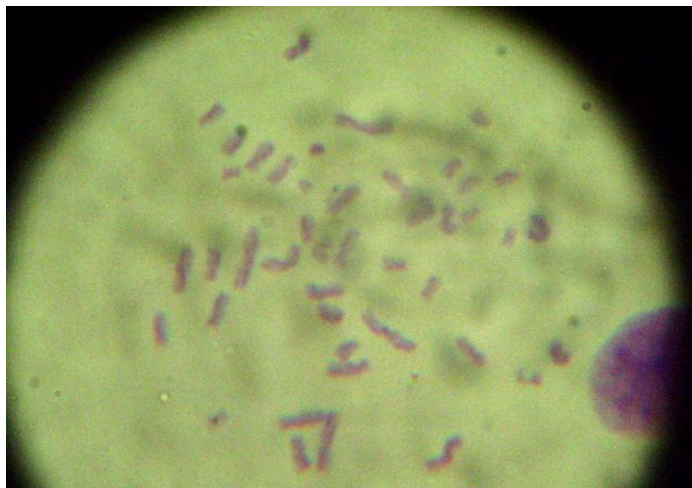


FIGURA No.14. Fotografía de metafases de tercera división tomada en el objetivo de 100X de microscopio óptico.

Debido a que el método de extracción que se utilizó es para obtener lectinas, se realizó un ensayo para determinar si el EpPs tiene la capacidad mitogénica, comparado con la Fitohemaglutinina (PHA) y en combinación, se obtuvo lo siguiente:

TABLA No.12. Capacidad mitogénica del EpPs.

TRATAMIENTO	MITÓGENO	ÍNDICE MITÓTICO	SD
CONTROL	PHA 1mg/mL	30.5/1000	0.7
EXTRACTO <i>Pisum sativum</i>	EpPs 1mg/mL	0.5/1000***	0.7
EXTRACTO <i>Pisum sativum</i> + PHA	EpPs1mg/mL PHA 1mg/mL	43.75/1000**	0.3

Donde: $P < 0.001$ (***) Diferencia extremadamente significativa, $P < 0.01$ (**) Diferencia muy significativa con respecto al control

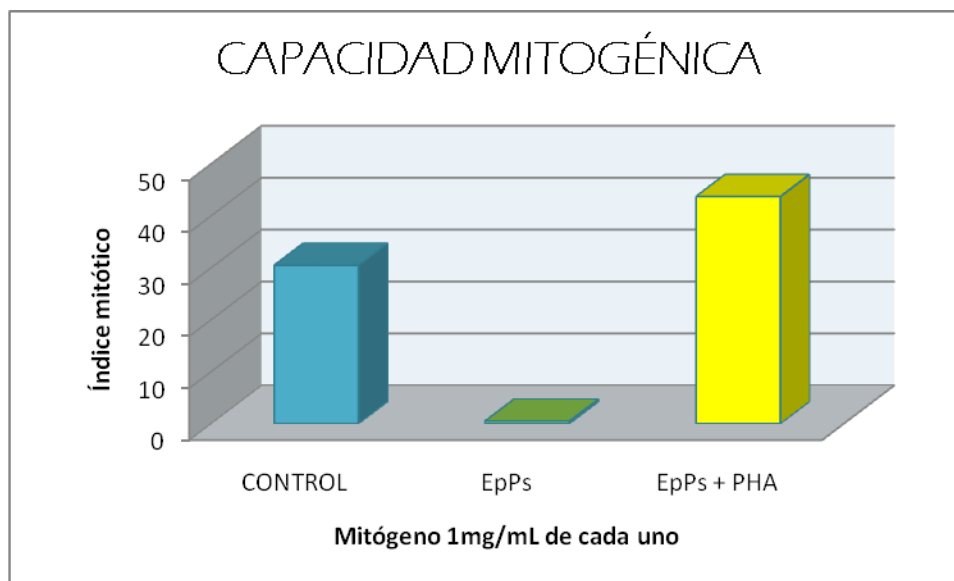


FIGURA No.15. Gráfico que muestra la capacidad mitogénica del EpPs frente a la PHA. Se encontró entre el EpPs y el control una diferencia extremadamente significativa ($P < 0.001$), y entre EpPs + PHA existe una diferencia muy significativa ($P < 0.01$), donde $n=1000$, cada ensayo se realizó por duplicado.

Por otra parte, se llevo a cabo un ensayo genotóxico empleando tres concentraciones: 1 mg/mL, 2 mg/mL y 6 mg/mL. Se calcularon los parámetros del índice mitótico, del índice de replicación, y de la frecuencia de ICH.

TABLA No.13. Ensayo genotóxico *in vitro* del EpPs. Índice mitótico.

TRATAMIENTO (mg/mL)	ÍNDICE MITOTICO	SD
CONTROL	28.5	0.7
EpPs 1	24	1.4
EpPs 2	28.5	0.07
EpPs 6	26.5	2.1

No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

TABLA No.14. Ensayo genotóxico *in vitro* del EpPs. Índice de Replicación.

TRATAMIENTO (mg/mL)	ÍNDICE DE REPLICACIÓN	SD
CONTROL	2.13	0.05
EpPs 1	1.835	0.007
EpPs 2	1.635**	0.1
EpPs 6	1.985	0.1

Donde: P<0.01 (**) Diferencia muy significativa.

TABLA No.15. Ensayo genotóxico *in vitro* del EpPs. Frecuencia de Intercambios de Cromátides Hermanas.

TRATAMIENTO (mg/mL)	FRECUENCIA DE ICH	SD
CONTROL	5.18	2.3
EpPs 1	4.72	2.3
EpPs 2	5.38	3.0
EpPs 6	5.38	2.5

No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

TABLA No.16. Ensayo genotóxico *in vitro* del EpPs. Cinética de Proliferación Celular (CPC).

TRATAMIENTO (mg/ML)	M1	SD	M2	SD	M3	SD
CONTROL	27.5	0.7	32	4.2	40.5	4.9
EpPs 1	32	2.8	52.5	4.9	15.5	2.1
EpPs 2	39.5	6.3	42.5	9.1	18	2.8
EpPs 6	27.5	0.7	46.5	12.0	26	11.3

No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Asimismo, se evaluó la antigenotoxicidad a diferentes concentraciones 1 mg/mL, 2 mg/mL, 2.5 mg/mL y 3 mg/mL; retándolos frente a la Mitomicina C.

TABLA No.17. Ensayo antígenotóxico *in vitro* del EpPs. Índice mitótico.

TRATAMIENTO (mg/mL)	ÍNDICE MITOTICO	SD
MMC	19	1.4
EpPs 1 + MMC	32.0**	1.4
EpPs 2 +MMC	20	2.8
EpPs 2.5 + MMC	25.5	3.5
EpPs 3 +MMC	26	2.8

Donde: $P < 0.01$ (**) Diferencia muy significativa.

TABLA No.18. Ensayo antígenotóxico *in vitro* del EpPs. Índice de Replicación.

TRATAMIENTO (mg/mL)	ÍNDICE DE REPLICACIÓN	SD
MMC	1.825	0.02
EpPs 1 + MMC	1.9	0.07
EpPs 2 +MMC	1.86	0.01
EpPs 2.5 + MMC	1.755	0.007
EpPs 3 +MMC	1.855	0.05

No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

TABLA No.19. Ensayo antígenotóxico *in vitro* del EpPs. Frecuencia de Intercambios de Cromátides Hermanas.

TRATAMIENTO (mg/mL)	FRECUENCIA DE ICH	SD
MMC	49.48	10.8
EpPs 1 + MMC	45.1*	11.7
EpPs 2 +MMC	26.94***	7.9
EpPs 2.5 + MMC	25.66***	6.3
EpPs 3 +MMC	23.84***	5.5

Donde: $P < 0.001$ (***) Diferencia extremadamente significativa, $P < 0.05$ (*) Diferencia significativa.

TABLA No.20. Ensayo antigenotóxico *in vitro* del EpPs. Cinética de Proliferación Celular (CPC).

TRATAMIENTO (mg/mL)	M1	SD	M2	SD	M3	SD
MMC	38	1.4	41.5	0.7	20.5	0.7
EpPs 1+MMC	32.5	4.9	45	2.8	22.5	2.1
EpPs 2+MMC	26*	1.4	62***	1.4	12	0
EpPs 2.5+MMC	33	2.8	58.5***	4.9	8.5*	2.1
EpPs 3+MMC	25**	2.8	64.5***	0.7	1.5*	2.1

Donde: $P < 0.001$ (***) Diferencia extremadamente significativa, $P < 0.01$ (**) Diferencia muy significativa y $P < 0.05$ (*) Diferencia significativa.

Para la comparación los datos obtenidos de la evaluación genotóxica y antigenotóxica se graficaron para observar su tendencia y poder definir si el EpPs posee características que pueden afectar a las células dañando su funcionamiento o por el contrario si éste es capaz de prevenir o contrarrestar el daño producido por un agente mutagénico.

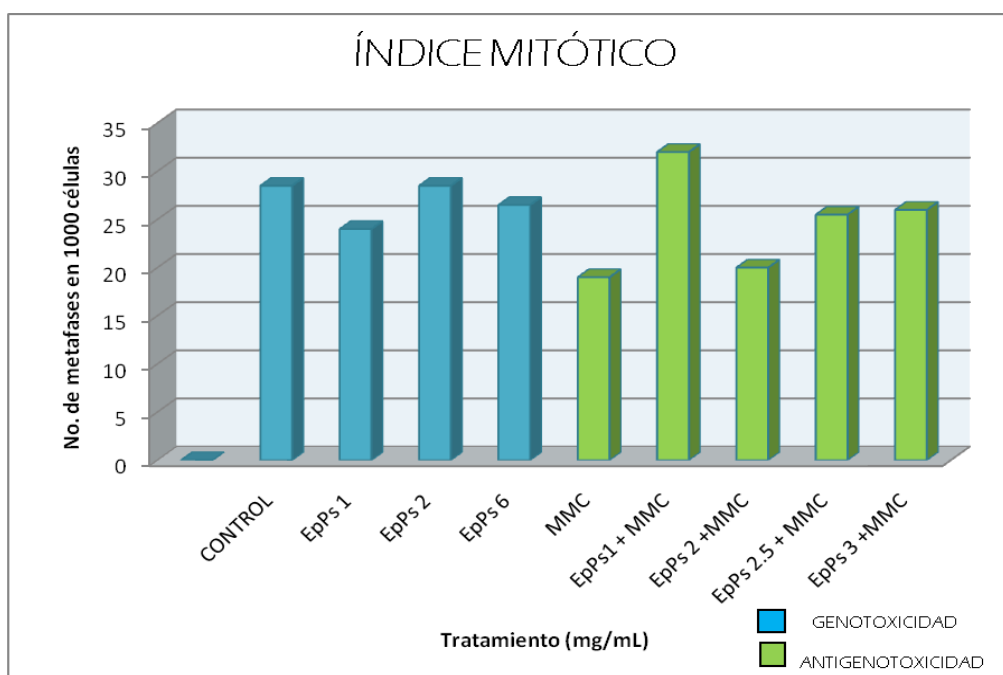


FIGURA No.16. Promedio del Índice mitótico (IM) obtenido en los diferentes tratamientos. No se encontraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos EpPs 1,2,6 mg/mL (análisis de varianza ANOVA y $P \geq 0.05$), en cambio entre la MMC y EpPs 1 + MMC se encontró diferencias muy significativas ($P < 0.01$), donde $n=1000$, cada ensayo se realizó por duplicado.

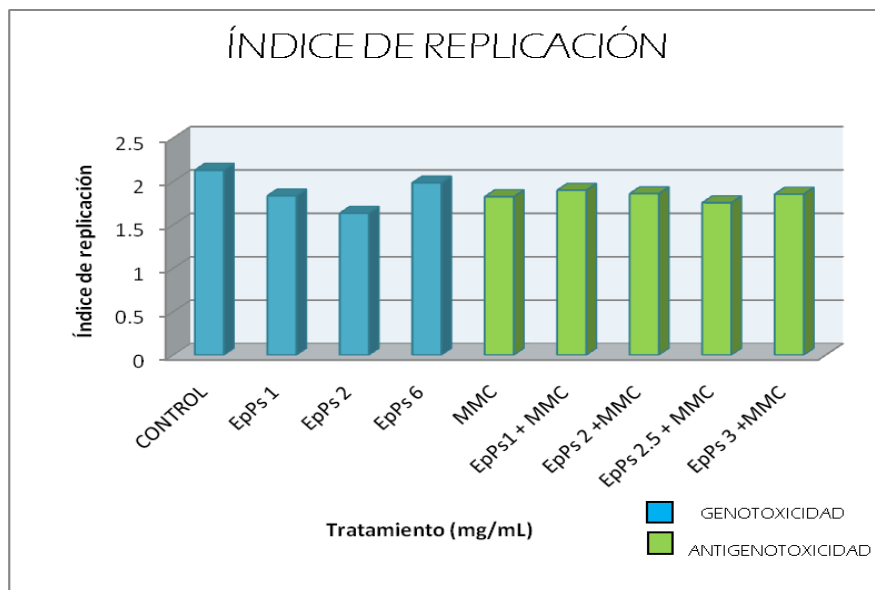


FIGURA No.17. Promedio del Índice de Replicación (IR) obtenido en los diferentes tratamientos. En el ensayo antígenotóxico no se encontró diferencias significativas entre la MMC y los tratamientos de EpPs en combinación con la MMC ($P \geq 0.05$). En el ensayo genotóxico se encontró diferencias muy significativas entre el Control y el tratamiento con EpPs 2 ($P < 0.01$), donde $n=100$, cada ensayo se realizó por duplicado.

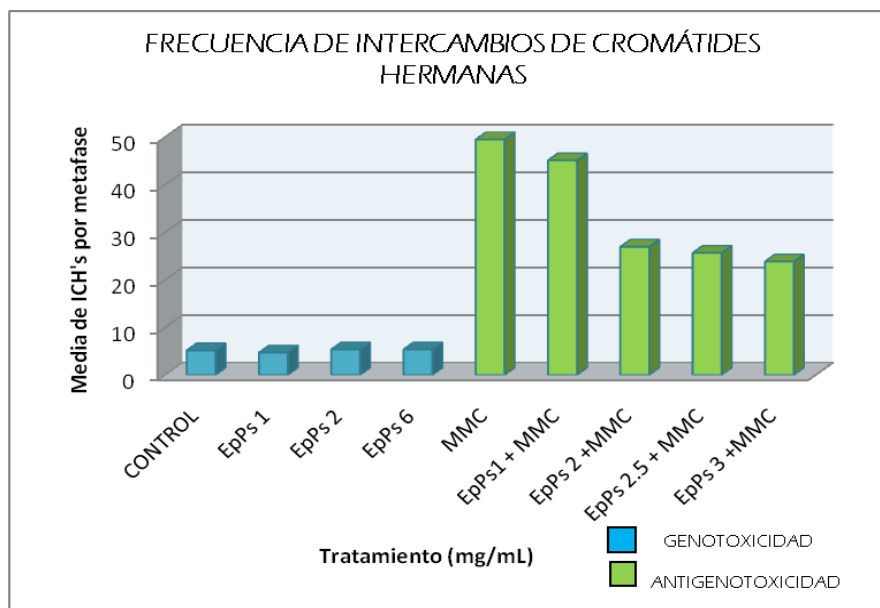


FIGURA No.18. Promedio de la frecuencia de Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) obtenido en los diferentes tratamientos. En el ensayo genotóxico no se encontró diferencias significativas ($P \geq 0.05$), en el ensayo antígenotóxico se encontró una diferencia significativa entre la MMC y el tratamiento con EpPs 1 + MMC ($P < 0.05$) y entre la MMC y los tratamientos con EpPs 2, 2.5, 3 en combinación con la MMC se encontraron diferencias extremadamente significativas ($P < 0.001$), donde $n=25$, cada ensayo se realizó por duplicado.

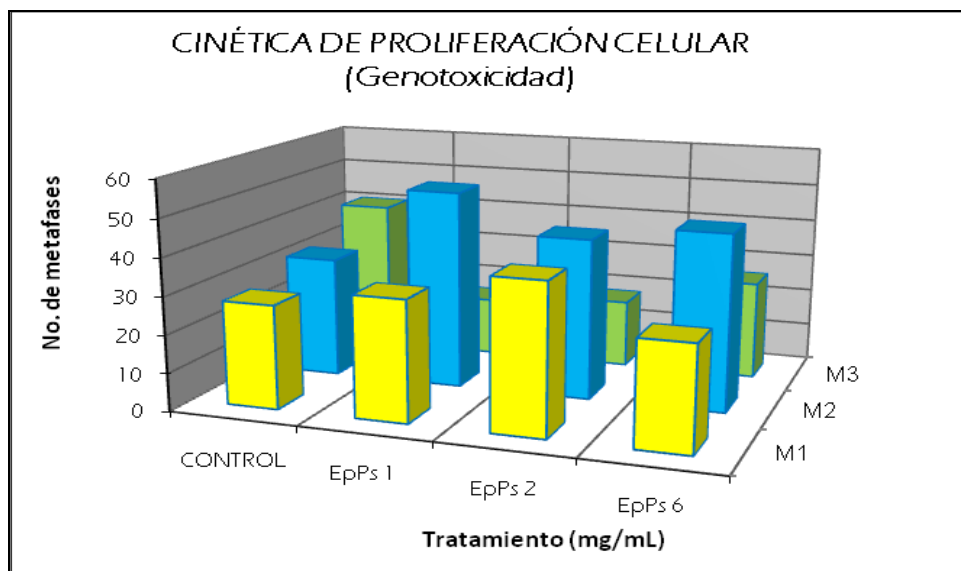


FIGURA No.19. Generación de metafases de 1ª (M1), 2ª (M2) y 3ª división (M3) en los diferentes tratamientos en la evaluación genotóxica. No se encontró diferencias significativas entre el Control y los diversos tratamientos con EpPs ($P \geq 0.05$), donde $n=100$, cada ensayo se realizó por duplicado.

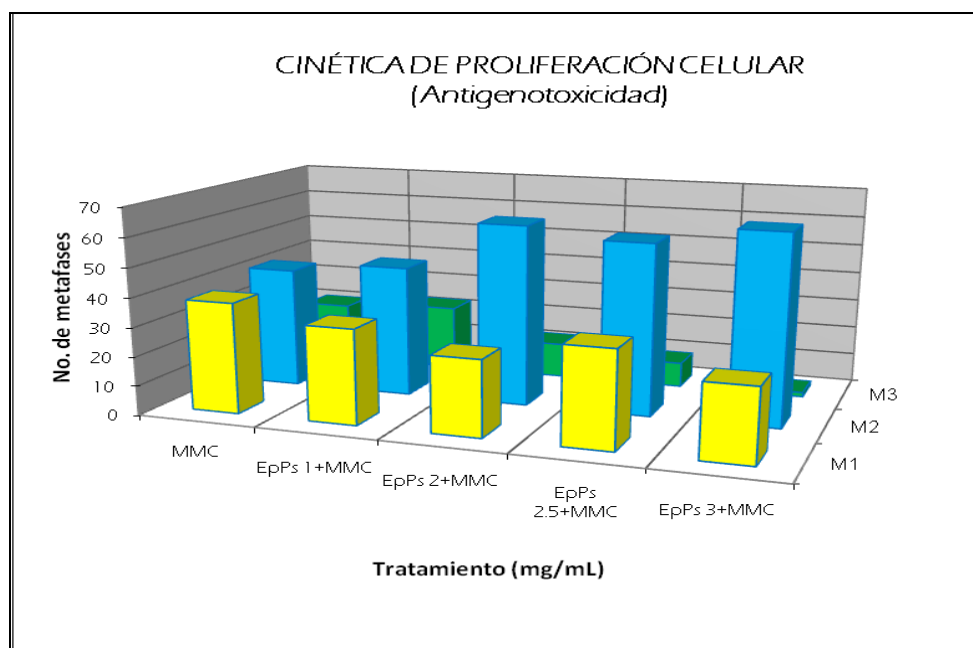


FIGURA No.20. Generación de metafases de 1ª (M1), 2ª (M2) y 3ª división (M3) en los diferentes tratamientos en la evaluación antigenotóxica. Se encontró diferencias significativas entre la MMC (M1) y el tratamiento con EpPs 2+MMC (M1), al igual entre MMC (M3) y los tratamientos con EpPs 2.5, 3 +MMC (M3) ($P < 0.05$); también se encontró diferencias muy significativas entre la MMC (M1) y el tratamiento con EpPs 3+MMC (M1) ($P < 0.01$). Por último, entre la MMC (M2) y los tratamientos con EpPs 2, 2.5, 3 +MMC (M2) se encontraron diferencias extremadamente significativas ($P < 0.001$), donde $n=100$, cada ensayo se realizó por duplicado.

DISCUSIÓN

Extracción y cuantificación de proteínas de *Pisum sativum*.

Las proteínas que predominan en *Pisum sativum* son globulinas solubles en agua, por lo que presentan una extracción óptima a pH entre 9 y 10, valor al cual aproximadamente el 96 % de los compuestos nitrogenados se extraen (Güemes, 2007) Aprovechando esta propiedad química de las proteínas de *Pisum sativum*, el método de extracción salina fue útil ya que la cantidad de proteínas obtenida fue alto y sobre todo cuando el EpPs fue liofilizado. Para la extracción de proteínas, tras la ruptura celular se utilizan tampones de extracción para solubilizar las proteínas. En este caso se utilizó solución hipotónica (NaCl 0.9%). Una vez que la proteína se extrajo de su entorno natural, estuvo expuesta a muchos agentes que pueden dañarla como los cambios bruscos de pH, ácidos y bases fuertes, temperaturas extremas y la acción de las proteasas; para evitar o minimizar estos factores la manipulación de las proteínas durante el proceso de purificación, se realizó a bajas temperaturas (5°C) y se procuró que el proceso fuera lo más corto posible, por lo que se liofilizó el EpPs para su conservación y concentración.

Después del proceso de liofilización, el extracto tuvo un mayor rendimiento y una mejor estabilidad debido a que la proteína se obtuvo en forma cristalizada, se determinó que por cada 20g de semilla se obtuvo una concentración de 29.6 mg/mL de proteína. El método que se utilizó para esta determinación fue Biuret (ver TABLA No.9), debido a que es un método específico para proteínas, es económicamente barato a comparación de otros métodos (Lowry, Bradford, BCA, o-ftalaldehído) y además muestra poca interferencia con otros compuestos. (Fernández y Galván, 2006).

La semilla de *Pisum sativum* tiene una composición media de un 55% de almidón, 22% de proteína y 2% de lípidos, la materia seca restante es principalmente fibra. El valor literario del contenido de proteínas en *Pisum sativum* indica que por cada 100g de semillas hay 6.3g de proteínas (Ver TABLA No.2), experimentalmente se encontró que por cada 100g de semillas de *Pisum sativum* hay 14.8g de proteína, esta diferencia puede ser debido a que el contenido de proteína es muy variable según el fenotipo, además a factores como la temporada de cosecha. Se han encontrado concentraciones entre el 16% y el 33% sobre materia seca (González, 2001).

SDS-PAGE del EpPs.

En la búsqueda de la información por medios electrónicos sobre la proteínas de *Pisum sativum* nos dimos cuenta que es muy escasa y por lo tanto se utilizó una metodología de SDS-PAGE empleada en 1975 para la purificación de la lectina de *Vicia faba* donde se comparó con lectinas con propiedades similares, entre las cuales citaron a la lectina de *Pisum sativum* (Allen, et.al; 1976), donde se empleó un gel (tamiz molecular que potencializa la separación) con poro del 10% lo que permitió que las partículas más grandes pudieran pasar con la ayuda de la corriente eléctrica, esto nos ayudó debido al desconocimiento del rango de PM de las subunidades del EpPs. También, nos proporcionó una vía para su estudio; el detergente aniónico que se emplea en esta metodología nos sirvió para proveer de una carga negativa a la proteína y el uso ó aplicación de la corriente eléctrica nos permitió la separación de las subunidades que componen al EpPs de acuerdo a sus correspondientes pesos moleculares.

Al término de la electroforesis se pudo observar, como lo muestra la FIGURA No.10, que el EpPs está compuesto por 16 subunidades, además como el desplazamiento de las cadenas polipeptídicas es linealmente proporcional al

logaritmo de su masas (Ver TABLA No. 11) y se pudo calcular el peso molecular de estas 16 subunidades obteniéndose un rango que va desde los 14kDa hasta los 80kDa, por lo que el gel empleado fue un eficaz separador de proteínas. Un estudio realizado por Crévieu y colaboradores en 1997 sobre la resistencia de proteínas de *Pisum sativum* L. en el tracto digestivo de aves (pollos), identificaron por SDS-PAGE a las subunidades que contenidas en esta especie de guisante, como la lipoxigenasa (PM 91,000), convicilina (PM 70,000), vicilina (PM 46,000), legumina α y β (PM 55,000), albúmina PA2 (PM 28,000), lectina y polipéptidos (PM rango entre 19,500 - 25,000), proteína endógena (PM 57,000). Experimentalmente, se encontraron 3 bandas que tienen PM que oscila entre 19 y 29 kDa, probablemente estas representen las lectinas presentes en *Pisum sativum*, estas pueden modular procesos biológicos en las células tales como el crecimiento, la adhesión, transformación maligna, metástasis y apoptosis, proponiendo que las lectinas pueden ser una herramienta útil en las investigaciones sobre el cáncer, para su diagnóstico y terapia en la medicina moderna (Castillo, et.al; 2005), aspectos que fueron base para la realización de esta experimentación.

Actualmente se han estudiado en detalle lectinas con efecto mitogénico sobre los linfocitos, entre las que se destacan las provenientes de *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Pisum sativum* (PSA). Estos mitógenos pueden activar de forma diferente los linfocitos T y B, por ejemplo la PHA inducen mitogenicidad en células T (Hernández, et.al; 1999). Basándonos en esta información en el presente trabajo se llevó a cabo la determinación de la capacidad mitogénica que pudiera tener el EpPs. En este ensayo se reto al EpPs frente a la PHA en las mismas condiciones (1mg/mL), se empleó esta lectina porque en el ámbito clínico se utiliza en la aglutinación de eritrocitos y otras células como linfocitos, espermatozoides, plaquetas y bacterias, inducción de mitosis en linfocitos, efectos citotóxicos sobre linfocitos y aglutinación de virus (Hernández, et.al; 1999).

De acuerdo a los resultados obtenidos del ensayo de la capacidad mitogénica que se citan en la TABLA No.12 el EpPs por si solo no presenta esta capacidad ya que el índice mitótico mostrado fue de 0.5; en cambio la PHA a la misma concentración (1mg/mL) y por si sola muestra un valor de 30.5, por lo que hay diferencias extremadamente significativas ($P < 0.001$). Pero al adicionar ambos compuestos a cultivos celulares observamos que hay un aumento del índice mitótico siendo de 43.75, así que podemos decir que el extracto obtenido de *Pisum sativum* por sí solo no posee una actividad mitogénica, pero al momento de adicionarlo con la PHA, tiene un sinergismo y potencializa la capacidad mitogénica en un 13.34 %, valor que está por encima del tratamiento de la PHA por sí sola (Ver FIGURA No. 15). Este último dato es de suma importancia ya que ambos compuestos pueden ser utilizados en diversos estudios que tienen como base la proliferación de linfocitos en cultivos (Hernández, et.al; 1999). Lo que sería interesante al seguir en esta línea de investigación, utilizar diversas concentraciones para observar el comportamiento del EpPs.

Ensayo genotóxico del EpPs.

Un ensayo genotóxico se lleva a cabo para determinar el daño producido por un compuesto al material genético. Mientras que un ensayo citotóxico se lleva a cabo para determinar el daño producido a la función de la célula. Afortunadamente el ensayo de la frecuencia de ICH permite evaluar ambos parámetros.

Uno de los parámetros que se evaluó en este proyecto es el índice mitótico (IM), que representa la capacidad de división celular. Si existe la presencia de un mutágeno disminuye la cantidad de metafases en los cultivos celulares frente a un control negativo. En los resultados obtenidos podemos observar claramente que no hay diferencias significativas entre las tres concentraciones que se manejaron

del EpPs (1mg/mL, 2mg/mL y 6mg/mL), ya que tuvieron un rango de 24.0 a 28.5 de índice mitótico, que comparado con el índice mitótico del control negativo de 28.5, esto muestra que no existe un descenso pronunciado, por lo que corrobora que el EpPs no interfiere en la disminución de división celular (Ver TABLA No.13 y FIGURA No.16), lo que indica que permite que las células entren en la fase de mitosis.

Otro parámetro importante que se evalúa en la técnica de intercambio de cromátides hermanas (ICH) *in vitro*, es el índice de replicación que representa el comportamiento de la cinética de proliferación celular, una alteración en ella constituye un retraso en la velocidad de la división celular, acumulándose las células en un estadio de la división celular. En nuestro experimento a las concentraciones de 1mg/mL y de 6mg/mL del EpPs frente al control (PHA) encontramos una ligera disminución en este índice; en cambio en la concentración de 2mg/mL se tiene una mayor desviación estándar (0.177) Ver TABLA No.14, mostrando diferencias muy significativas ($P < 0.01$) frente al control negativo que obtuvo un valor de 2.13, mientras el valor del EpPs fue de 1.635, lo cual demuestra que a esta concentración existe una modificación en la velocidad de la división celular, en la siguiente etapa del estudio, podremos verificar en que división (1^a, 2^a ó 3^a) se acumuló más (Ver FIGURA No.17).

La cinética de proliferación celular (CPC) es un indicador de los efectos citotóxicos, la modificación del ciclo celular se manifiesta como un cambio en el porcentaje de células en las diferentes etapas de duplicación (Sánchez, 2005). Como podemos observar en la FIGURA No.19 no hay diferencias significativas entre el control y los diversos tratamientos con el EpPs, estos datos relacionados con lo mencionado anteriormente comprueba que no hay un cambio en la proporción celular en las diferentes etapas de la división.

Mientras se incrementa el número de fragmentos que se intercambian, aumenta el riesgo de daño al genoma. Sin embargo; en condiciones normales, las células humanas presentan una frecuencia relativamente constante de intercambios por metafase, en la cual se estiman entre 6 a 9. La frecuencia se eleva en forma notable cuando las células son sometidas a la acción de un agente clastógeno (Salamanca, 1990).

La frecuencia de intercambios de cromátides hermanas (ICH) en el ensayo genotóxico (Ver TABLA No.15), se observó que no existen diferencias significativas entre las diferentes condiciones experimentales del EpPs empleadas (EpPs 1, EpPs 2, EpPs 6) frente al control (PHA) ya que el promedio de intercambios oscila entre 4 a 5 ICH por metafase (Ver FIGURA No.18), valor que está por debajo de lo citado en el párrafo anterior. Esto demuestra que el EpPs a las concentraciones utilizadas no produce daño aparente al DNA.

Ensayo Antigenotóxico del EpPs.

Por otra parte, en el ensayo antigenotóxico se utilizó un fármaco como control positivo que fue la Mitomicina C (MMC), ésta actúa a nivel del DNA (Ver FIGURA No.7), afecta la integridad de las cadenas de ácidos nucleicos (Pradillo, 2003), impidiendo la replicación celular normal, ya que inhibe a la topoisomerasa I y II (Guereña, et.al; 2006). Tiene la característica de producir depresión de la médula ósea. También pertenece al subgrupo de los antibióticos citostáticos, productos del hongo del suelo *Streptomyces caespitosus* que establecen enlaces cruzados en DNA de doble cadena a través de la guanina y citosina (Remington, 1990). Las principales razones por las cuales se trabajó en este proyecto con la MMC son:

- a. Es un fármaco ampliamente utilizado contra el cáncer, sobre todo en cáncer gástrico, donde se ha visto una mayor actividad de las lectinas de leguminosas (Jordinson, et.al; 1999).
- b. Su costo es accesible a comparación de los otros fármacos.
- c. Se ha observado que produce una considerable cantidad de intercambios (Latt, et.al; 1974), por lo que fue un modelo utilizado como un control positivo y determinó si el EpPs posee actividad antigenotóxica.

Si comparamos la Mitomicina C (MMC) con los resultados de los cultivos celulares del control negativo donde se utilizó únicamente PHA, podemos decir que existió un aumento en la frecuencia de ICH de 5.18 a 49.48. Sin embargo, al realizar una comparación estadística del EpPs en combinación con la MMC (a sus diferentes concentraciones: 1, 2, 2.5, y 3 mg/mL) con el control positivo (MMC), tenemos que a la menor concentración la diferencia es mínima obteniéndose un valor de 45.1. Pero mientras aumenta la concentración de *Pisum sativum* la diferencia significativa es mayor, disminuyendo los valores: 26.94, 25.66 y 23.84 respectivamente; se observa una disminución casi al 50% de los valores de índice de ICH con respecto a la MMC (Ver FIGURA No.18). Por lo que se puede afirmar que mientras aumenta la concentración de EpPs en los cultivos de linfocitos se contrarresta el daño causado por la MMC, disminuyendo el índice de ICH.

Observando el índice mitótico, en la FIGURA No.16 visualizamos una disminución del valor al adicionar MMC a los cultivos celulares. Donde se enfatiza esta disminución es en la comparación del ensayo de PHA y PHA+MMC, debido al mecanismo de acción de la MMC, donde se intercala en el DNA evitando su replicación y, como consecuencia, evita la división celular disminuyendo el índice mitótico. En el tratamiento de EpPs 1 + MMC hay un aumento, es decir,

contrarresta el efecto de la MMC en la célula, pero el valor disminuye al adicionar el EpPs a los cultivos en concentraciones mayores.

La evaluación del índice de replicación del ensayo antigenotóxico mostró un comportamiento similar a los datos del ensayo genotóxico. No indica diferencias significativas con relación a la MMC e indica que no hay una alteración de la velocidad de la división celular. Pero al analizar los resultados de la cinética de proliferación celular tenemos que hay un acumulo de células en metafases de 2^a división, mostrando un valor mayor en los tratamientos de EpPs 2+ MMC, EpPs 2.5 + MMC y EpPs 3 + MMC, presentando una $p < 0.001$. Existiendo un comportamiento similar en estos tratamientos por lo que disminuye la proliferación de células dañadas, es decir, disminuye su replicación.

Mientras aumenta la concentración de *Pisum sativum* en los cultivos celulares fue menor la cantidad de células que se encontraron en tercera división, reforzando la información antes mencionada.

Las propiedades de la planta de *Pisum sativum* son diversas, en este trabajo se llevo a cabo la investigación de la capacidad que tienen las lectinas presentes en esta leguminosa para contrarrestar los daños causados por un agente clástogeno y de esta forma abrir paso a una alternativa como producto natural eficaz como tratamiento contra el cáncer.

Lo que sería interesante es trabajar en la investigación de las demás propiedades que posee esta planta, tales como el beneficio del consumo de semillas de *Pisum sativum* que previene las enfermedades cardiovasculares por su capacidad vasodilatadora y su propiedad hipercolesterolémica. Además, mantiene los niveles de glucosa, por lo que su ingesta en personas con diabetes disminuye la dependencia de la insulina. La función revitalizante, ayuda al desarrollo y

renovación celular. Provee protección al sistema nervioso, ya que lo nutre de glucosa en forma adecuada y beneficia el buen estado de ánimo por la cantidad abundante de folato y que en el organismo se convierte en Ácido Fólico, evita la aparición de la depresión. Estas dos últimas propiedades pueden ser foco de estudio por el ritmo acelerado de vida que lleva el ser humano actualmente.

CONCLUSIONES

En base al análisis de los resultados realizados en la presente investigación, se concluye lo siguiente:

- El método de extracción de lectinas por extracción salina empleado en este trabajo, ha demostrado ser eficaz para la obtención del EpPs, obteniéndose 3.75mg/mL de proteínas de 20g de semilla de *Pisum sativum*.
- La liofilización resultó ser un método efectivo para la concentración y conservación del EpPs en forma cristalina, y ayudar en su manipulación durante la experimentación. Se obtuvieron 29.6mg/mL después de la liofilización, lo que indica que este proceso concentró 8 veces más al EpPs.
- La purificación del EpPs, se realizó mediante la técnica de SDS-PAGE, visualizando 16 subunidades con un rango de peso de 14kDa a 80kDa. La técnica de SDS-PAGE es rápida, sensible y capaz de un alto grado de resolución.
- El EpPs a la concentración de 1mg/mL no mostró un efecto mitogénico, en comparación con la PHA a la misma concentración. Pero en la combinación del EpPs y la PHA mostró un aumento de la capacidad mitogénica en los linfocitos humanos, por lo que se puede ver una potencialización de la concentración de lectinas de ambos compuestos.
- El ensayo genotóxico mostró que el EpPs no produce genotoxicidad en las diferentes concentraciones empleadas, 1mg/mL, 2mg/mL y 6mg/mL, ya que el extracto no induce la generación de ICH's.

- El ensayo antigenotóxico mostró que el EpPs contrarresta el efecto genotóxico de la MMC en los linfocitos humanos, debido a que disminuye la cantidad de ICH's que ésta produce, la tendencia indica una relación con la concentración del EpPs, es decir, que conforme aumenta la concentración del EpPs es menor la frecuencia de ICH's.
- El IM a las diferentes concentraciones utilizadas del EpPs en combinación con la MMC manifiestan un aumento del IM con respecto al control positivo.
- En el IR del ensayo antigenotóxico mostró un comportamiento similar al del ensayo genotóxico, no indica diferencias significativas con relación al control positivo, por lo que no existe alteración de la velocidad de la división celular. Hay un acúmulo de células en metafases de 2ª división, es decir, disminuye la replicación de las células dañadas por la MMC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, Anthony K., Desai, Nila N. y Neuberger, Albert, 1976. The Purification of the Glycoprotein Lectin from the Broad Bean (*Vicia faba*) and a Comparison of its Properties with Lectins of Similar Specificity Department of Biochemistry, Charing Cross Hospital Medical School, Fulham Palace Road, Hammersmith, London W6 8R1, U.K. *Biochem. J.*, 155, 127-135pp.
- Anatomía de una proteína, <http://depa.pquim.unam.mx/proteinas/estructura/Prottem.html>, Universidad Nacional Autónoma de México, Edo. de México (Revisado el 13 de Abril del 2012).
- Barquín, M., 1984, Historia de la medicina. Su problemática actual, Francisco Méndez Oteo, Editor, México, 400pp.
- Barret R.P. 1990. Legume species as leaf vegetables Inv. Janick and JE Simon (eds) Portland, OR. www.hortpurdue.edu/, 391-396pp.
- Barret, 1998. Lecture Note, Undergraduate Program in Plants Biology University of Maryland, Lecture 26, Legume and starchy staples. www.life.umd.edu/classroom/bscil24/lec26.html
- Brandan, Nora, Juaristi, Julián, Aguirre, Victoria, Romero Benítez, Margarita, 2002. Oncogenes y genes supresores de tumores. Cátedra de Bioquímica, Universidad Nacional del Nordeste Facultad de Medicina, 1-12pp.
- Cáncer. Disponible en: www.cancerquest.org/indexcfm?lang=spanish&page=505 (Revisado el 7 de Julio de 2009).
- Castillo-Villanueva Adriana, Abdullaev, Fikrat, 2005. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Rev Invest Clin*, volumen 57 núm.1, 55-64pp.
- Cultivo de plantas medicinales y alimentarias, 2004. www.iqb.es/cultivos/plantas/guisante.htm. (Revisado el 27 de Mayo de 2009).
- Cupeiro, Angeles, 1996. Resumos de Teses de Deutoramento, Variaciones Cronobiológicas de Intercambios de Cromátides Hermanas (SCEs) en linfocitos humanos, 18pp.
- Dayami Laza Loaces, Damayi, Rodríguez Luis, Iraida y Sardiña Cabrera, Guillermo, 2003. Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales, *Rev Cubana de Plantas Medicinales*, vol.8, núm.3, Ciudad de la Habana, 12pp.
- Devlin, Thomas M. 2006. *Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas*, Reverte, Barcelona; Mexico, 1216 p.
- Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer, 2009. Datos nacionales INEGI. www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2009/cancer0.doc, (Revisado el 7 de Marzo del 2009).
- Farmacopea de los Estados Unidos de América: USP 32: formulario nacional: NF 27 USP 32 : formulario nacional: NF 27. 2008. Rockville, Maryland: United States Pharmacopeial Convention, Vol. 1, 487-488 pp.

- Ferbeyre, Luis y Salinas, Juan Carlos, 2005. Bases genéticas y moleculares del cáncer 1ª Parte, Gamo Vol. 4 Núm. 2, 42-47pp.
- Fernandez Fernandez, Benjamin A, 1998. Liofilización de productos farmacéuticos, Limusa, México, 53pp.
- Fernández, Emilio y Galván, Aurora, 2006. Métodos para la cuantificación de proteínas, Depto. De Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, Cordoba, 1-7pp.
- Fitoterapia. Disponible en <http://www.mundobelleza.com/herbario/Historia.htm> (Revisado el 8 de Junio de 2008).
- Gómez Meda, Belinda C. y Zúñiga González, Guillermo M. 2007. Genotoxicidad y potencial teratogénico. La ciencia y el hombre, Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana. Vol. 20, No. 3. 5pp. <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol20num3/articulos/genotoxicidad/index.html>.
- González, Ma. Rosa, 2001. Interacción genotipo x ambiente en guisante proteaginoso (*Pisum sativum*), Universidad Valladolid, Biblioteca virtual Miguel de Cervantes, 307pp.
- Güemes Vera, Norma, 2007. Utilización de los derivados de cereales y leguminosas en la elaboración de productos cárnicos, Nacameh, Centro de Investigación en Ciencia Tecnología de Alimentos, Instituto de Ciencias Agropecuarias Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, http://www.geocities.com/nacameh_carnes/index.html, vol. 1, no. 2, 110 - 117pp.
- Guereña Tomás, M. José, Muñoz González, Francisco y Molero García, José M. 2006. Tratamientos contra el cáncer, AMF, vol. 2, núm.4, 9pp.
- Guisante. Disponible en: <http://www.infoagro.com>, (Revisado el 28 de Marzo del 2012).
- Hall, G. M., 1996. Methods of testing Protein Functionality, Blackie Academic & Professional, N.Y., 42 - 49pp.
- Hernández Díaz, Patricia, Martín González, Odalys, Rodríguez dePablos Vélez, Yoryelín y Ganem Báez, Félix A. 1999. Aplicaciones de las lectinas, Revista Cubana Hematología Inmunología, Laboratorio BETERA, Habana Cuba. Vol. 15 Núm. 2, 91-95pp.
- Índices dietéticos de los alimentos, 2007. www.dietasmaticas.es/fichas/guisantes/ficha-guisantes.htm (Revisado el 27 de Mayo de 2009).
- Infante V, Alexis A., 2000. Clasificación agroeconómica de las tierras aprovechables. C.r.y., Sistema hidráulico Yacambú - Quibor, C.A., 96 - 99pp. Disponible en <http://www.yacambuquibor.infoagro.info.ve/documentos/cuencatomoii.pdf> (Revisado el 8 de Junio de 2008).
- Ire`ne Cre´vieu, Bernard Carre´, Anne-Marie Chagneau, Laurence Quillien, Jacques Gue´guen, and Serge Be´rot, 1997. Identification of Resistant Pea (*Pisum sativum* L.) Proteins in the

- Digestive Tract of Chickens, Station de Recherches Avicoles, Centre INRA de Nouzilly, 37380 Monnaie, France, and Laboratoire de Biochimie et Technologie des Prote´ines, Centre INRA de Nantes, Rue de la Ge´raudie`re, 44072 Nantes Cedex, France, J. Agric. Food Chem., 45, 1295 - 1300pp.
- Jordinson, M, El-Hariry, I, Calnan, D, Calam, J y Pignatelli, M, 1999. Vicia faba agglutinin, the lectin present in broad beans, stimulates differentiation of undifferentiated colon cancer cells gut.bmjournals.com, Gut, 44; 709-714pp.
- Katzung, Bertram G. 1987. Farmacologia basica y cl´nica, Manual Moderno, M´xico, 951 pp.
- Katzung, Bertram G. 1995. Farmacologia : autoevaluacion y repaso, Manual Moderno, M´xico, 789 pp.
- Klug, William S, Michael R. Cummings, Charlotte A. Spencer, 2006. Conceptos de gen´tica, Pearson/Prentice Hall, Madrid, M´xico, 884 pp.
- Latt, Samuel A., Scherck, Rhona R., D'Andrea, Alan, Kaiser, Tim N., Schlesinger, Fred, Lester, Susan y Sakai, Kazuo. 1974. Detection, significance, and mechanism of sisterchromatid exchange formation: past experiments, current concept, future challenges, Genetics Division and Mental Retardation Center Children's Hospital and the Departments Pediatrics and Genetics, Harvard Medical School, Boston Massachusetts, 11-29 pp.
- Mart´nez O, Augustin y Mart´nez de Victoria Mu˜oz, E, 2006. Prote´inas y p´ptidos en nutrici3n enteral, Departamento de Bioqu´mica y Biolog´a Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Instituto de Nutrici3n y Tecnolog´a de los Alimentos. Universidad de Granada. Nutr. Hosp. 21 (Supl. 2) 1-14pp.
- Mendoza P., Nicandro, 2008. Actividades farmacol3gicas. Herbolaria. Departamento de Farmacolog´a, Facultad de Medicina, UNAM (Revisado el 1 de Abril de 2008).
- M´todos en Biolog´a Celular. 2009. Electroforesis de prote´inas en geles de poliacrilamida. <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/page.htm> (Revisado el 7 de Julio de 2009).
- Mitomicina. <http://ar.geocities.com/indicededrogas/mitomicina.htm> (Revisado el 7 de Julio de 2009).
- Natarajan, A.T. 2005. Chromosome aberrations: Plants to human and Feulgen to FISH, current Science, Vol. 89, No. 2, 335-340pp.
- P´rez-Herrera, Norma, Ceballos-Quintal, Jos´ M., Pinto-Escalante, Doris, 1990. Prevalencia de intercambios de crom´tides hermanas en una poblaci3n libre de exposici3n a agentes clast3genicos, Vol. 15 N´m. 2, 91-95pp. www.uady.mx/biomed/rb991021.html
- Plantas medicinales. Guisante. *Pisum sativum*, 2009. <http://www.iqb.es/cbasicas/farma06/plantas/pg16b.htm>, (Revisado el 27 de Mayo del 2009).
- Pradillo, Piedad. 2003. Farmacolog´a antineopl´sica. 40. Farmacolog´a en enfermer´a. Enfermer´a 21. Siglo 21. 499-509pp.

- Proteínas. http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000024/lecciones/cap01/01_01_15.htm, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, Carrera 45 No 26-85 - Edificio Uriel Gutiérrez, Bogotá D.C. - Colombia, (Revisado el 13 de abril de 2012).
- Qué es el cáncer, 2004. The cancer council Victoria disponible en: <http://www.cancervic.org.au/about-cancer/whatis-cancer>, London.
- Remington, Joseph Price. 1990. Remington farmacia, Médica Panamericana, Buenos Aires; México.
- Rodríguez C., Juan Manuel y Gómez C., Armando. 2008. La herbolaria en los mercados tradicionales. Disponible en <http://www.mexicodesconocido.com/espanol/naturaleza/flora/detalle.cfm?idcat=2yidsec=10yidsub=29yidpag=760>, (Revisado el 8 de Junio de 2008).
- Salamanca Gómez, Fabio. 1990. Citogenética humana: fundamentos y aplicaciones clínicas. México, D.F., Academia Nacional de Medicina, Médica Panamericana, 1990, 60p.
- Sánchez Alarcón, Juana, 2005. Análisis de la proliferación celular y frecuencia de intercambios de cromátides hermanas en linfocitos humanos en cultivo expuestos efluentes industriales, Departamento de Biología celular de la UAM-Iztapalapa y laboratorio de Citogenética del Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, 170pp.
- Shulterbrandt, Sahnya. 2008. Disponible en http://www.revistainterforum.com/espanol/articulos/artvegano_021401.html, (Revisado el 8 de junio de 2008).
- Stryer, Lubert. 1995. Bioquímica, vers. española de la 4a. ed., Jose M. Macarulla, Reverte, Barcelona.
- Vicario, Sergio. 2008. Herbolaria milenaria. Disponible en <http://www.natura.com.mx/articulos/herbolariamile/herbomile.html> (Revisado el 8 de Junio de 2008).
- Waizer B, José. 2006. Las plantas y las ciencias. Una visión multidisciplinaria. México, D.F., Instituto Politécnico Nacional, 587pp.
- Yokota, Jun y Sugimura, Takashi, 1993. Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes, FASEB Journal, vol. 7, Japan, 920-925pp.

APÉNDICE A

MATERIAL Y REACTIVOS

✦ MATERIAL

Vasos de precipitado de 50 mL, 250 mL, 500 mL

Vasos Coplin de vidrio

Vasos Coplin de plástico

Matraces Erlenmeyer de 250 mL, 500 mL

Matraces volumétricos de 10 mL, 25 mL, 1000 mL

Pipetas graduadas de 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL

Pipetas Pasteur

Probeta de 50 mL, 250 mL

Frascos para cultivo estériles

Tubos de punta V para centrifuga

Tubos de ensaye

Celdas para espectrofotómetro

Portaobjetos

Cubreobjetos largos

Pinzas

Gradilla

Piseta

Termómetro

Barra magnética

Bolsas de plástico con cierre

Aparatos

Centrífuga

Ultracentrífuga

Microcentrífuga

Potenciómetro

Espectrofotómetro

Cámara de electroforesis vertical

Liofilizadora

Campana de extracción

Campana de flujo laminar

Microscopio óptico

Baño María

Lámpara de UV

Incubadora

Parrilla eléctrica con agitador magnético

Fuente de poder

✦ **REACTIVOS**

Extracción:

Solución salina fisiológica 0.9 % (SSF)

Cuantificación:

Albúmina Bovina Fracción V
(1mg/mL)

Reactivo de Biuret

Soluciones para la siembra de

linfocitos humanos:

Heparina

Fitohemaglutinina (PHA)

Colchicina 0.01 %

Medio RPMI

Sangre periférica humana

KCl 0.075 M

Soln. fijadora (metanol - ácido acético,
3:1)

Soln. de proteínas de chícharo

Tinción diferencial:

Soln. doble de salina - citrato (Citrato
de Sodio/Cloruro de Sodio)

Buffer de diferenciación (Citrato
trisódico dihidratado/Fosfato de
Sodio monobásico)

Bisbenzimidida Hoechst 33258 (Soln. de
trabajo; soln. concentrada de
Bisbenzimidida Hoechst 33258/Buffer
de diferenciación)

Electroforesis:

Soln. de monómeros

(Acrilamida/Bisacrilamida)

Buffer Tris 1.5 M pH 8.8 4x (Tris
base/SDS)

Buffer Tris 0.5 M pH 6.8 4x (Tris
base/SDS)

Regulador de corrimiento 5x (Tris
base/Glicina/SDS)

Regulador de muestra 2X (Buffer Tris
0.5 M pH 6.8/Glicerol/Azul de
Bromofenol/SDS/ β -mercaptoetanol)

Persulfato de Amonio al 10 %, marca
BIORAD®

TEMED

Azul de Coomasie R - 250, marca
BIORAD®

Soln. decolorante (Metanol/Ác.
Acético)

APÉNDICE B

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

✦ Para la cuantificación de proteínas

- Reactivo de Biuret. Pesar:

1.5 g de Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)

6.0 g de Tartrato de Sodio y Potasio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

1.0 g de Yoduro de Potasio (KI)

El $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ y $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se disuelven en 500 mL de agua destilada. Se adicionan con agitación constante 300 mL de NaOH al 10 %, y 1.0 g de KI. Se afora a un 1 litro con agua destilada y se guarda en un frasco ámbar.

✦ Para la electroforesis SDS - PAGE

- Monómeros (Acrilamida/Bis-Acrilamida).

14.6 g de Acrilamida

0.4 g de N'-N'-bis-metilen-acrilamida

Mezclar los dos monómeros y aforar a 50 mL con agua destilada.

Filtrar y almacenar a 4°C , se puede utilizar durante 30 días máximo .

- Buffer pH= 8.8 (Tris-HCl 1.5 M)

18.15 g de Tris-base

Adicionar 80mL de agua desionizada estéril.

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 6 N.

Aforar con agua desionizada estéril a 100 mL.

Almacenar a 4°C.

-Buffer pH= 6.8(Tris-HCl 0.5 M).

6 g de de Tris-base

Adicionar 60 mL de agua desionizada estéril.

Ajustar el pH a 6.8 con HCl 6 N.

Aforar con agua desionizada estéril a 100 mL.

Almacenar a 4°C.

-Solución SDS al 10%.

10 g de SDS.

Disolver en 90 mL de agua desionizada estéril.

Mezclar lentamente sin generar espuma.

Aforar c.b.p. con agua desionizada estéril hasta llegar a 100mL.

-Solución de Persulfato de Sodio al 10%.

0.1 g de Persulfato de Sodio

Disolver en 1mL de agua desionizada estéril.

-Buffer de muestra o de la carga.

3.4 mL de agua desionizada estéril

0.6 mL de Buffer pH= 6.8

2.0 mL de solución de SDS al 10% (w/v).

1.0 mL de Azul de Bromofenol al 1% (w/v).

2.5 mL de Glicerol.

0.5 mL de 2-mercaptoetanol.

- Azul de Bromofenol al 1%.

100 mg de Azul de Bromofenol.

Aforar a 10 ml con agua destilada.

Mezclar hasta disolver.

- Colorante de Azul de Coomasie.

40 mL de agua destilada o desionizada.

50 mL de Metanol.

10 mL de Ácido Acético glacial.

0.05 g de Azul de Coomasie.

Mezclar con precaución ya que los algunos de las soluciones son corrosivas, y utilizar una campana de extracción.

- Solución desteñidora.

10 mL de Ácido Acético glacial.

25 mL de Metanol.

65 mL de agua destilada o desionizada.

Mezclar las soluciones y filtrar.

- Buffer de corrida (Glicina).

14.5 g de Glicina.

3.0 g de Tris-base.

1.0 g de SDS

Disolver en 1000 mL de agua desionizada.

NOTA: No ajustar el pH.

✦ Para la siembra de linfocitos humanos.

Solución proteica de *Pisum sativum*: Preparar 2 mL a una concentración de 1 mg/mL.

$$(29.6 \text{ mg/mL}) V_1 = \frac{(1 \text{ mg/mL}) (2 \text{ mL})}{29.6 \text{ mg/mL}} = 0.06756 \text{ mL} = 67.56 \mu\text{L}$$

✦ Para la cosecha de linfocitos humanos.

- KCl 0.075 M

Pesar 1.3979 g KCl y disolver en 250 mL agua destilada.

- Soln. fijadora (metanol - ácido acético, 3:1)

Metanol absoluto 150 mL

Ácido acético glacial 50 mL

✦ Para la tinción diferencial de las laminillas de cada tratamiento.

- Soln. doble de salina - citrato (2xssc)

Pesar 17.53 g NaCl, 8.82 g Citrato de Sodio y disolver primero una sal y luego la otra en 1 L de agua destilada.

- Buffer de diferenciación

Soln A) 1.8 g Citrato trisódico dihidratado en 50 mL de agua destilada.

Soln. B) 1.221 g Fosfato de Sodio monobásico en 10 mL de agua destilada.

Agregar lentamente la "soln. B" a la "soln. A" hasta alcanzar un pH=7.0

Diluir 1:1 con agua destilada.

- Bisbenzimidida Hoechst 33258

Preparar una solución concentrada pesando 0.025g Bisbenzimidida Hoechst 33258 y disolver en 10 mL de agua destilada.

La solución de trabajo consiste en: 1 mL soln. concentrada

9 mL agua destilada

10 mL buffer de diferenciación