



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación del efecto anticancerígeno de un extracto enriquecido en lectinas de *Ruta graveolens*, mediante la regulación de las EROs, en un modelo murino de cáncer.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

RODRÍGUEZ CORTÉS CÉSAR ANTONIO

DIRECTORA: M EN C MACHUCA RODRIGUEZ CATALINA

Cd. Mx., 2016



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.

Contenido

Glosario de términos y unidades.....	1
Introducción	2
Cáncer.....	2
Clasificación del cáncer	3
Orígenes del cáncer.....	4
Progresión de un tumor	4
Características de las células cancerosas	5
Angiogénesis tumoral.....	7
Metástasis	8
Tratamientos actuales.....	9
Terapias alternativas	10
Lectinas.....	11
Ruda (<i>Ruta graveolens L</i>)	15
Justificación	15
Hipótesis.....	16
Objetivos	16
General.....	16
Particulares.....	16
Metodología	17
Extracción de proteínas tipo lectina de hojas de Ruda	17
Inducción a cáncer	18
Administración del Extracto	18
Cuantificación de proteína total por el método de Biuret.....	18
Ensayo de hemoaglutinación	19
Obtención de plasma murino.....	19
Cuantificación de óxido nítrico por el método de Griess.....	19
Cuantificación de catalasa por el método de Chance y Machley.....	20
Evaluación del efecto anticancerígeno	20
Análisis estadístico	21
Resultados	21
Obtención de un extracto y enriquecido de proteínas tipo lectina	21

Pruebas de hemoaglutinación.....	22
Cuantificación de nitritos	24
Niveles de catalasa	30
Evaluación del efecto antitumoral	37
Análisis y discusión de los resultados.....	39
Conclusiones	42
Conclusión general	44
Bibliografía	45
Apéndice de fórmulas	49
Buffer PBS pH 7.4	49
Reactivo de Biuret	49
Reactivo de Griess	49

Glosario de términos y unidades

AAL	Lectina de <i>Aleuria aurantia</i> .	VCA	Lectina de <i>Vicia Sativa</i> .
ABL	Lectina de <i>Agaricus bisporus</i> .	VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.	VFA	Aglutinina de <i>Vicia faba</i> .
Con A	Concanavalina A.	WGA	Aglutinina del germen de trigo
DSA	Lectina de <i>Datura stramonium</i> .	ε	Coeficiente de extinción molar.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.	μg	Microgramos.
EGFR	Receptor de crecimiento epidérmico.	μL	Micro litros.
EROs	Especies reactivas de oxígeno.	μM	Micro molar.
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos.	Abs	Absorbancia.
GNA	Aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i> .	FD	Factor de dilución.
GS I	Lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i> .	g	Gramos.
KML-C	Lectina de muérdago coreano.	gl	Grados de libertad.
ML-I	Lectina de muérdago.	Hrs	Horas.
PGF	Factor de crecimiento placentario.	KDa	Kilo daltones.
PHA	Fitohemaglutinina.	mg	Miligramos.
PHA-L	Leucoaglutinina.	min	Minutos.
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa.	mL	Mililitros.
RIPs I y II	Proteínas inactivadoras de ribosomas.	mm	Milímetros.
SBA	Aglutinina del frijol de soya.	mM	Mili molar.
TMA I y II	Aglutinina de <i>Taxus media</i> .	nm	Nanómetros.
Ucat	Unidad de catalasa.	rpm	Revoluciones por minuto.

Introducción

Cáncer

Cáncer, es un término genérico que designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo (Fundación para la Excelencia y la Calidad de la Oncología, 2009); se trata de una alteración a nivel genético, que provoca que la célula afectada pierda su funcionalidad y comiencen a dividirse de forma incontrolada creando tumores; también altera su estructura y las vías de señalización normales; por lo cual los órganos cuyas células se ven afectadas no pueden realizar sus funciones de forma adecuada, lo que produce fallas orgánicas y posteriormente la muerte. La existencia de un solo tumor, no se clasifica como cáncer, para que un tumor se pueda clasificar como cáncer debe presentar la habilidad de esparcirse a diferentes tejidos del organismo y generar nuevos tumores en ellos, a esto se le denomina metástasis y es la principal causa de muerte entre los individuos afectados por este padecimiento. A continuación se muestran algunas cifras sobre la mortandad de la enfermedad recopiladas por la OMS (GLOBALCAN, 2012):

- El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2012 causó 8,2 millones de defunciones confirmadas (14 millones calculadas).
- Pulmonar (1,59 millones de defunciones)
- Hepático (745 000 defunciones)
- Gástrico (723 000 defunciones)
- Colorrectal (694 000 defunciones)
- Mamario (521 000 defunciones)
- Cáncer de esófago (400 000 defunciones)
- Más del 60% de los nuevos casos anuales totales del mundo se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica
- Estas regiones representan el 70% de las muertes por cáncer en el mundo
- Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas

Como se puede observar, el cáncer afecta a las regiones más empobrecidas del planeta. La mayor mortandad por cáncer se presenta en estas regiones debido a la falta de recursos médicos así como de una cultura de la prevención que en ciertos tipos de cáncer, como el mamario y el de piel puede ser la diferencia entre la vida o la muerte del paciente. Puede afectar a múltiples órganos y sistemas sin provocar síntomas notables, lo que retrasa el diagnóstico y por tanto el tratamiento.

Clasificación del cáncer

Los diferentes tipos de cáncer, se clasifican en diversas categorías dependientes del tipo de tejido de la célula origen, estas son las variedades de cáncer más comunes (Hanahan D, 2000):

- **Carcinoma.** Se clasifica así a un cáncer derivado de las células epiteliales no solo las de la piel, ya que los sistemas digestivo y respiratorio están constituidos por este tipo de células, los carcinomas representan entre el 80% y el 90% de todos los casos de cáncer reportados.
- **Sarcoma.** Los tumores derivados de tejidos musculares, óseos o conjuntivos, incluyendo el cartílago se incluyen en esta categoría.
- **Leucemia.** Tipo de cáncer que afecta a los glóbulos blancos, o a sus precursores que se encuentran en la medula ósea.
- **Mielomas.** En este caso particular los glóbulos blancos afectados son los B, los productores de los anticuerpos.
- **Linfoma.** En la medula ósea se encuentran los tejidos precursores de muchos tipos celulares, el linfoma afecta a los linfocitos que componen el sistema linfático.

A pesar de sus diferentes orígenes, todas las células tumorales, poseen ciertas características que les permiten reproducirse de forma descontrolada, evadir la detección del sistema inmune, ignorar las señales del medio y en el caso de las células cancerosas, características que les permiten viajar a través del organismo e infectar nuevos tejidos. Para llegar a este punto, los tumores pasan por una serie de etapas en su desarrollo hasta el cáncer (Fundacion para la Excelencia y la Calidad de la Oncologia, 2009).

Orígenes del cáncer

El daño al ADN que puede originar el cáncer, puede venir de 3 fuentes; Física, química o biológica:

- El origen físico se debe a la interacción de radiación ionizante, que puede romper los enlaces químicos del ADN provocando deleciones y otras modificaciones al código genético, el más común de estos cánceres es el de piel ya que este tejido se encuentra expuesto a la radiación solar.
- Existe una gran cantidad de químicos que pueden dañar al ADN (Valkoa, 2006), un claro ejemplo son las especies reactivas de oxígeno (EROs) que interactúan con el ADN, produciendo errores de metilación (Onard, 2008) en las cadenas (Toyokuni, 1998) (Reuter, 2010), lo que provoca la alteración del proceso de transcripción del ADN, esto se conoce como estrés oxidativo; normalmente es mitigado mediante la generación de moléculas antioxidantes, que neutralizan a las EROs pero, la exposición a ciertos químicos como metales pesados, solventes orgánicos, dioxinas, etc. provoca una sobreproducción de estas especies al punto en que los antioxidantes no pueden combatirla. Aunque hay que aclarar que esta acumulación, no sobrepasa el límite de tolerancia de la célula, que en casos extremos de acumulación de EROs realiza apoptosis e incluso autofagocitosis esto convierte a las EROs en un arma de doble filo para el cáncer, por un lado ayudan a la generación de mutaciones, pero en exceso pueden matar a las células cancerosas esto ha llamado la atención de los investigadores como una novedosa táctica para combatir esta enfermedad (Pelicano, 2004).
- El daño biológico sucede cuando ciertos agentes patógenos como ciertos tipos de virus (de Martel, 2012), alteran el código genético de las células que infectan, un ejemplo claro es el virus del papiloma humano, que causa cáncer cervico-uterino.

Progresión de un tumor

Todos los tumores, cancerosos o benignos, comienzan con una sola célula cuya genética normal se ve alterada, de forma tal que obtenga ciertas características, que le permitan dividirse de forma descontrolada e incluso invadir otros tejidos. El desarrollo en etapas de la enfermedad, es casi siempre asintomático, lo que evita un diagnóstico temprano y baja mucho la posibilidad de una remisión. Las etapas se describen a continuación (Duffy, 2008) (Lahti, 2004) (Stamenkovic, 2008) (Massagué, 2009):

- Hiperplasia. Consiste en un crecimiento descontrolado de la célula afectada, las células presentan características normales, a excepción de su número.
- Displasia. Al avanzar la progresión de la enfermedad, el conjunto de células, pierde su forma y organización, su apariencia ya no es normal. Los grupos de células tumorales presentan bordes irregulares
- Carcinoma in situ. El tejido en que comenzó el desarrollo anormal, ahora contiene más células anormales que las propias del órgano, por lo que su función se ve comprometida, la masa tumoral aún se encuentra dentro de los límites del tejido origen, en esta etapa la remisión permanente es muy factible.
- Cáncer. Estos tumores son capaces de invadir tejidos cercanos o lejanos (Metástasis), son los responsables de la alta tasa de mortalidad de esta enfermedad, en esta etapa una cirugía no tiene posibilidad de remover todas las células afectadas, la remisión permanente es posible en algunos casos.

Cabe mencionar que los cánceres de células sanguíneas no pasan por estas etapas, ya que el tejido afectado no es sólido y recorre todo el organismo, lo que le provee de muchas oportunidades de invadir otros órganos. A diario nuestras células son expuestas a incontables fuentes de alteración genética, pero pocas de estas alteraciones derivan en cáncer, esto se debe a que el conjunto de características necesarias para que una célula se vuelva cancerosa, es bastante específico.

Características de las células cancerosas

Todos los tumores cancerosos o benignos crecen a partir de una célula individual, para ser capaz de ello las células sufren una serie de cambios que les otorgan nuevas características, las cuales se enlistan y describen brevemente a continuación (Mashima, 2005) (Hanahan D, 2000) (Eichhorn, 2014):

- Citoesqueleto modificado. Los cambios genéticos que generan el cáncer tienden a modificar la síntesis de los componentes del citoesqueleto (Microtúbulos y microfilamentos) esto altera la forma en que la célula interactúa con su medio, y con otras células, lo que puede evitar el acoplamiento de células del sistema inmune, evitando su captura y eliminación.
- Disminución de la adhesión celular. Esta característica puede ser resultado de un cambio en la proporción de ciertos receptores celulares. También puede ser resultado de la característica antes descrita.

- Membrana nuclear modificada. La estructura de la membrana nuclear se ve alterada, esta modificación estructural es muy útil en el diagnóstico de la enfermedad.
- Producción enzimática alterada. Para ser capaces de hacer metástasis las células cancerosas, deben ser capaces de disolver las barreras físicas constituidas por la matriz extracelular y otras células, logran esto mediante la secreción de enzimas capaces de lisar estas barreras.
- Divisiones celulares ilimitadas. Las células normales, poseen un número finito de divisiones celulares, esto se debe a que con cada división los telómeros (Las regiones más lejanas del centrómero) se acortan. Una característica esencial de una célula cancerosa, es la producción de telomerasa, una enzima capaz de reparar el acortamiento de los telómeros.
- Independencia de los factores de crecimiento. La división en una célula normal es un proceso regulado, por factores internos y externos, las células normales no pueden dividirse sin la correcta combinación de ambos. Las cancerosas son independientes de estas señales, son capaces de dividirse siempre que el medio les brinde suficientes recursos y nutrientes.
- Falta de respuesta a las señales de alto. Como se mencionó anteriormente, la división celular está bien regulada, los factores externos son señales de alto, que impiden la división celular sin embargo la fisiología y la membrana celular alterada de una célula cancerosa, impide que las señales lleven a cabo su función, esto le permite generar una masa tumoral, sin impedimentos. Existe otra ruta para detener la división celular llamado inhibición por contacto, cuando una membrana celular entra en contacto con otra, las células dejan de dividirse, esto evita que las células invadan otros tejidos, las membranas celulares de estas están alteradas y no responden ni siquiera a este estímulo, invadiendo tejidos vecinos, y creciendo de forma desordenada y sin detenerse.

Como se puede observar, estas características convierten a las células cancerosas en una entidad muy resistente y proliferativa lo cual explica su capacidad para formar masas tumorales, en un periodo de tiempo relativamente corto.

Angiogénesis tumoral

Se le conoce como angiogénesis al proceso de diferenciación tisular que resulta en la creación de nuevos vasos sanguíneos (Folkman, 1971), este proceso ocurre de forma natural durante el desarrollo embrionario para formar la red vascular del organismo, este proceso está finamente regulado por diferentes factores positivos y negativos. Las masas tumorales más exitosas (Capaces de sobrevivir y metastatizarse), están constituidos por células con fenotipos que les permiten modificar la concentración local de los factores reguladores de la angiogénesis, dotando así al tumor con la capacidad de generar su propia red vascular (O'Reilly, 1997). Existen unas 12 proteínas que participan en el proceso antigénico las más comúnmente identificadas en la angiogénesis tumoral son las siguientes (López, 2001):

- Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Se le considera el factor angiogenico más importante. Generalmente se expresa en tumores de origen epitelial.
- Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Existen dos variedades, acidas y básicas, ambas poseen la capacidad de incrementar la síntesis de factores angiogenicos por los macrófagos del tejido conectivo, facilitando la proliferación de las células endoteliales vasculares en las áreas más vascularizadas del tumor.
- Factor de crecimiento placentario (PGF). Las células neoplásicas pueden sintetizar una forma alterna del *PGF*, identificada como tipo 2, este complejo hace que las formas difusivas activas permanezcan por más tiempo en los tejidos, incrementando así su efecto angiogenico.

La combinación de estos efectos promueven la neo vascularización del tejido neoplásico, esto no solo permite al tumor continuar creciendo rápidamente, también es un medio para la difusión de las células tumorales hacia tejidos sanos, permitiendo eventualmente la formación de nuevas colonias de células cancerosas, que pueden convertirse en otros tumores.

Metástasis

Al proceso mediante el cual las células cancerosas migran a tejidos lejanos al punto de origen, mediante diversos medios se le conoce como metástasis (Duffy, 2008) (Fidler, 2003), la gran mayoría de muertes relacionadas con el cáncer se deben a la metástasis. Como se había mencionado, las células tumorales alteran la composición de su citoesqueleto y de sus proteínas de membrana, esto les permite desplazarse, al elongar una parte de su citoesqueleto, adherirse (Gracias a sus proteínas de membrana) y volver a su forma original, logrando así desplazarse. Existen barreras físicas que delimitan los tejidos y esto es cierto incluso para los tumores, la lámina basal es una de estas barreras, pero como se mencionó antes las células cancerosas son capaces de digerir la matriz protéica de la lámina basal, al secretar metaloproteasas de la matriz que desdoblan las proteínas que constituyen la matriz extracelular, así logran abrirse paso entre los tejidos (Steeg, 2006). A partir de ese punto existen 3 vías de migración a tejidos lejanos que suelen utilizar:

- Hematógena. Las células cancerosas se infiltran a través de la membrana basal y se introducen en los vasos sanguíneos, desde donde pueden llegar a cualquier parte del organismo y comenzar otro tumor, esta vía es la que más frecuentemente se observa en los cánceres de hueso y los de tejidos blandos (Sarcomas) (Fidler, 2003).
- Linfática. Alternativamente las células infiltrantes pueden llegar a los vasos linfáticos, esta red es similar en extensión a la del sistema circulatorio, los principales cánceres que se diseminan a través del sistema linfático son los de melanoma, mama, pulmón y los gastrointestinales (Christofori, 2006).
- Transcelómica. La diseminación transcelómica es poco frecuente y parece estar limitada a los cánceres de origen mesotelial (Una membrana que cubre a la mayoría de los órganos internos) y a los de ovario (Lahti, 2004) (Paget, 1889).

A pesar de que estos eventos suceden millones de veces, las células suelen morir en el trayecto, ya que se encuentran a factores a los que no están adaptadas, tales como la presión a la que están sujetas las células en el sistema circulatorio. Otra razón por la que las células no sobreviven se debe al hecho de estar fuera de su microambiente, fuera de este las células del sistema inmune puede reconocerlas y destruirlas. Otra razón por la que este proceso es poco eficiente (Gupta, 2006) se debe a la necesidad de las células tumorales de un ambiente donde se puedan reproducir, lo que el proceso carece en eficiencia lo compensa con el número de ocurrencias diarias. Una vez que una sola célula logra una

colonización exitosa un nuevo tumor puede comenzar a formarse y eventualmente forma un nuevo tumor, comprometiendo su funcionamiento, esta es la razón por la cual aumenta la tasa de mortalidad una vez que el proceso canceroso ha llegado a esta etapa.

Tratamientos actuales

El tipo de tratamiento a utilizar se determina en cada caso, dependiendo de diversos factores, como el tipo de tumor, su ubicación y etapa de desarrollo, usualmente se administran diferentes tipos de tratamiento para aumentar la probabilidad de remisión. Los tratamientos actuales más frecuentemente empleados son la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía.

- La quimioterapia utiliza medicación química diseñada para interferir con la reproducción celular (Earnshaw, 2000) (Jhonstone, 2002) esto afecta a cualquier tejido con una tasa alta de reproducción celular causando efectos secundarios poco deseados, como la pérdida de cabello, afecta a varios órganos internos como el hígado. Se utiliza para eliminar las células residuales a una cirugía de remoción.
- La radioterapia utiliza radiación ionizante concentrada en áreas específicas de los tejidos, la radiación ionizante daña el ADN de forma tal que las células irradiadas mueren, se aplica con el fin de eliminar partes específicas de los tejidos alrededor de los tumores, que han sido removidos quirúrgicamente para elevar la probabilidad de eliminar todas las células cancerosas. En este caso existen efectos negativos como el envenenamiento por radiación leve (Fundacion para la Excelencia y la Calidad de la Oncología, 2009).
- La cirugía apunta a la remoción total del tejido afectado, es muy eficiente en las etapas tempranas de un tumor lamentablemente las etapas tempranas de la enfermedad suelen ser asintomáticas, lo que previene una detección temprana del proceso neoplásico. La cirugía suele complementarse con quimioterapia y/o radioterapia para aumentar la probabilidad de remisión (Fundacion para la Excelencia y la Calidad de la Oncología, 2009).

Terapias alternativas

Existen varios compuestos de origen vegetal que han demostrado poseer efectos antineoplásicos (Fu B. I.-j.-k., 2009) (Trachootham, 2006) (Abdullaev, 2005) (Li, 2011) (Büssing, 1998) (da Rocha, 2001) (Zoltan, 1993), como el alcaloide Vincristina, este alcaloide es aislado de *Catharanthus roseus*, se ha demostrado que al utilizarse como adyuvante en el tratamiento contra el linfoma de Hodgkins aumenta las probabilidades de resección, otro ejemplo de un ingrediente activo aislado de una planta es el etoposido, también conocido como PV-16 es un derivado de la epidophylotoxina, es un inhibidor de la topoisomerasa II, y ha mostrado resultados positivos al utilizarse en carcinomas pulmonares. A continuación se muestra la tabla 1 con varios tratamientos alternativos obtenidos de plantas así como el estado de investigación en que se encuentran.

Compuestos anticancerígenos obtenido de plantas		
Compuesto.	Uso terapéutico.	Fase de ensayos clínicos.
Vincristina.	Leucemia, linfoma, cáncer de mama, pulmonar.	Fase III/IV
Vinblastina.	Cáncer de mama, linfoma, renal.	Fase III/IV
Paclitaxol.	Cáncer de ovario, de mama, pulmonar, de vejiga.	Fase III/IV
Docetaxol.	Cáncer pulmonar y de mama.	Fase III
Topotecan.	Cáncer de ovario y pulmonar.	Fase II/III

Tomado y modificado de (da Rocha, 2001)

Tabla 1

En recientes años, un grupo de proteínas conocidas como lectinas, que poseen la característica de unirse de forma específica y reversible a carbohidratos libres, o integrados a la membrana celular. Esta característica les provee de cierta afinidad por las células cancerosas debido a la condición aberrante de sus membranas celulares que como se mencionó antes, expresan muchas más proteínas de membrana y carbohidratos, diferencia que permite a las lectinas unirse específicamente a las células cancerosas.

Lectinas

Las lectinas son un grupo de proteínas que se encuentran presentes de manera homogénea dentro de todos los grupos de seres vivos, su característica única es que poseen uno o más sitios de reconocimiento de carbohidratos (Fu l.-l. C.-c.-y.-k., 2011), a los que se unen de forma específica y reversible, algunas de estas proteínas poseen más de un sitio de unión a azúcares por lo que tienen la capacidad de aglutinar células en suspensión, otro tipo de lectinas poseen dominios con actividad enzimática, es decir pueden regular procesos celulares, ya sea interactuando con receptores de membrana o introduciéndose en la célula dentro de vesículas e interactuando con los orgánulos de forma directa, como en el caso de las lectinas inhibidoras de ribosomas (RIPs por sus siglas en inglés). Las lectinas se clasifican por su arreglo estructural (Nagano C. , 2007).

- Merolectinas. Estas lectinas poseen un solo sitio de unión a carbohidratos, por lo tanto no pueden aglutinar células de ningún tipo.
- Hololectinas. Estas lectinas poseen al menos dos sitios de unión a carbohidratos por lo tanto pueden unirse a más de una célula al mismo tiempo, causando su aglutinación.
- Quimerolectinas. Poseen por lo menos un sitio de unión a carbohidratos y un sitio con actividad enzimática.

Se han empleado lectinas para detectar células tumorales y diagnosticar la etapa de desarrollo de la enfermedad desde la década de los 60s (Halina, 2003). Con estos antecedentes recientemente se comenzó a investigar la posibilidad de aplicarlas con fines terapéuticos, debido a sus interacciones específicas y reversibles con las células cancerosas que les dota de una afinidad natural por las mismas, habiendo sido observado que poseen varios efectos en las células tumorales, tanto en sistemas in vivo como en sistemas in vitro. A continuación se muestra una tabla que resume algunos de los resultados de estas investigaciones (Abdullaev, 2005).

In vivo.		
Lectina	Efecto de las lectinas.	Tipo celular.
PHA	Inhibición del crecimiento tumoral.	Linfoma murino.
SBA	Fortalecimiento del sistema inmune.	Linfoma murino.
TMA I y II	Inhibición del tumor y prolongación de la vida del organismo.	Sarcoma 180.
GS-I	Inhibición del crecimiento tumoral.	Células asoticas Ehrlich.
VCA	Inhibición del crecimiento tumoral, metástasis por el incremento en la apoptosis, y la inhibición de la angiogénesis.	Melanoma B16-BL-6
KML-C	Aumento de la actividad inmunoreguladora, aumento de la apoptosis.	Melanoma murino, Carcinoma de colon y linfoma.
ML-I	Efecto antitumoral y reducción del crecimiento del tumor.	Linfoma de Hodgkins.

Tabla 2

In vitro.		
Lectina	Efecto de la lectina.	Línea celular.
PHA-L	Inhibir el crecimiento celular en altas concentraciones.	LoVo. HCT-15,SW837
Con A	Inhibir el crecimiento celular en altas concentraciones.	LoVo. HCT-15,SW837
WGA	Inhibir el crecimiento celular en altas concentraciones.	LoVo. HCT-15,SW837
DSA	Inhibición de la proliferación celular.	C6 glioma, U251, SNB-75, SNB-78
ML-I	Inducción de apoptosis.	Jurkat T-cell, BJAB B-cell
ABL	Inhibición de la proliferación celular, sin citotoxicidad.	HT29
VFA	Inhibición de la proliferación celular, sin citotoxicidad.	LS174T, SW1222 y HT29
AAL	Inducción de apoptosis, con actividad de ADNasa.	HeLa, SW480, SCG, 7901, MGC80-3, BGC-823, HL-60, S-180

Tomado y modificado de (Abdullaev, 2005)

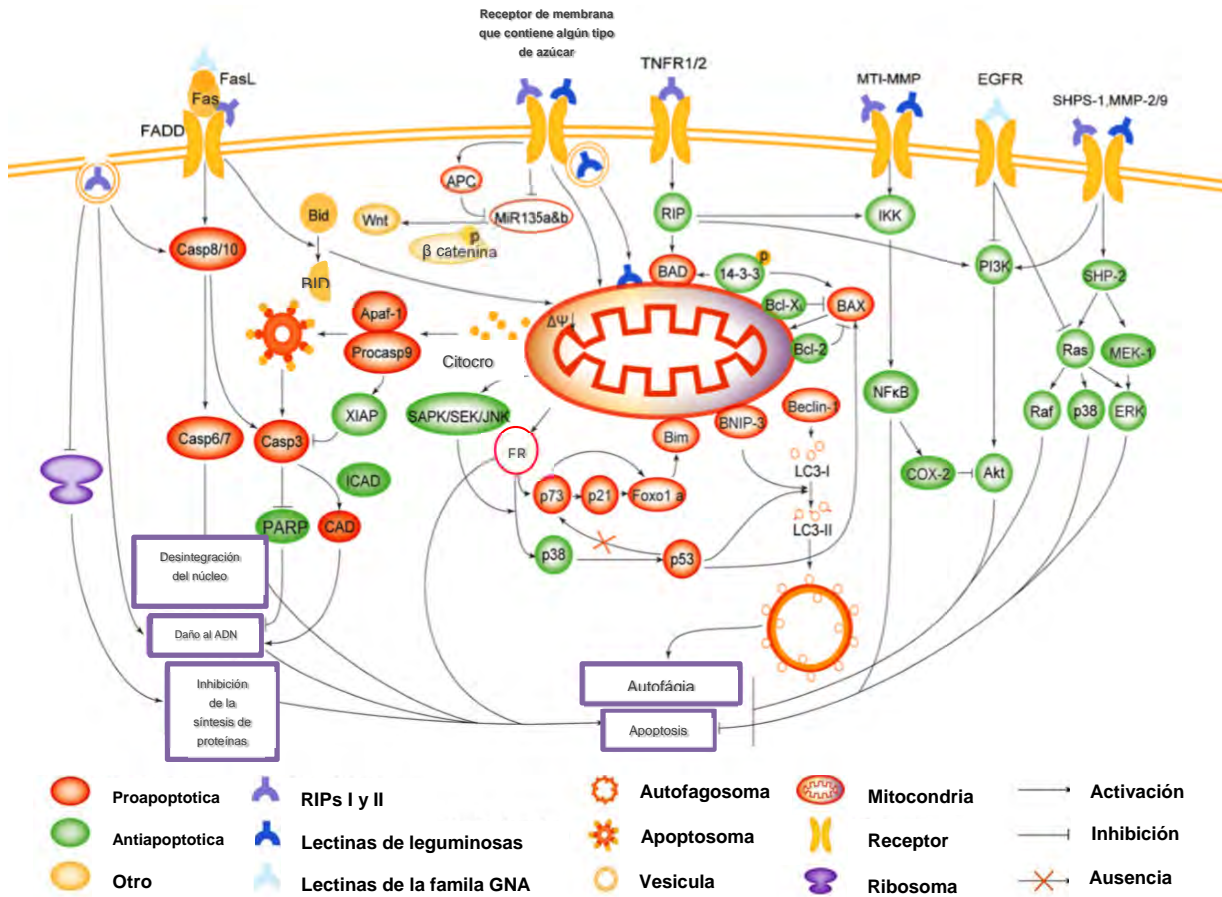
Tabla 3

Como se puede observar diferentes familias de lectinas poseen métodos de acción similares entre sí, que por su mecanismo de acción se pueden dividir en 3 familias principales (Lei-lei Fu, 2011) (Hengartner, 2000).

- RIPs I y II, se trata de proteínas inactivadoras de ribosomas que suelen ejercer su efecto al interactuar con los dominios de muerte Fas, la activación de este receptor desencadena una cascada de señales proapoptóticas llamadas caspasas, este sistema está altamente conservada evolutivamente por lo que difícilmente se altera, aun funciona en la mayoría de tipos de cáncer. También pueden internalizarse dentro de la célula e interactuar con los ribosomas deteniendo la síntesis de proteínas, lo que causa la muerte celular de forma independiente a las rutas proapoptóticas normales que se encuentran alteradas por la enfermedad, además pueden interactuar con algunos receptores de membrana desconocidos, provocando un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que provoca la liberación de EROs al citosol, al acumularse estas moléculas altamente reactivas el proceso de autofagia se activa.
- Lectinas de leguminosas, este tipo de lectinas no se limita a la familia taxonómica de las leguminosas pero generalmente es así, estas lectinas ejercen sus efectos antineoplásicos al unirse a receptores de membrana desde donde se internalizan e interactúan con las mitocondrias alterando la permeabilidad de la membrana, liberando grandes cantidades de EROs y de citocromo c. Estas dos moléculas activan diferentes cascadas de señalización, el citocromo c activa al apoptosoma, una estructura celular cuyo propósito es la muerte celular programada. Mientras tanto la acumulación de EROs activa la autofagia de la célula, un proceso alternativo de muerte celular en la cual los organelos son desmantelados por enzimas y la célula se desintegra en autofagosomas que contienen los organelos catabolizados.
- Lectinas de la familia GNA, esta familia de lectinas interactúan con los receptores de muerte Fas, desencadenando la vía proapoptótica de las caspasas de forma similar a las RIPs, de forma paralela trunca a BID esta proteína proapoptótica modifica la permeabilidad de la membrana mitocondrial, liberando EROs al citosol y provocando autofagia celular. A diferencia de ellas las lectinas GNA pueden interactuar con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR por sus siglas en inglés) la interacción con este receptor inhibe varias señales antiapoptóticas como PI3K que regula el factor antiapoptótico Akt. Estas lectinas también pueden inhibir Ras, que al inhibirse desregula una cascada de señalización antiapoptotica causando así la muerte de la célula.

Estas descripciones son un resumen de todos los elementos de las cascadas de señalización (Hengartner, 2000), ya que describirlas por completo sería complicado y poco claro. Sin embargo es importante señalar que todas las rutas tienen un método común capaz de matar a las células cancerosas, la autofagia por acumulación de EROs. A continuación se incluye un esquema simplificado de los diferentes mecanismos que activan las diferentes familias de lectinas para su mejor comprensión.

Mecanismos de acción de diferentes familias de lectinas



Tomado y modificado de (Fu I.-I. C.-c.-y.-k., 2011)

Figura 1

Como se puede observar la liberación de EROs al citosol, no solo provoca la autofagia de la célula, también inicia una señal de retroalimentación positiva al activar rutas que aumentan la liberación de más EROs como las proteínas Bim y BAX que continúan alterando la permeabilidad mitocondrial (Hengartner, 2000) (Trachootham, 2006) (Pelicano, 2004).

Ruda (*Ruta graveolens* L)

Planta perene, arbustiva, las hojas son alternas, de color verde azulado, bi o tri pinadas; los segmentos laterales son alargados y el terminal ovalado. Están provistas de glándulas que despiden un olor fuerte, en ocasiones desagradable, pero característico de la especie. Las flores son de color amarillo o amarillo verdoso, miden de 8 a 10 mm de diámetro y están agrupadas en ramilletes terminales. La flor central tiene 5 pétalos y 5 sépalos, mientras que las restantes tienen 4 pétalos y 4 sépalos. Originaria del sur de Europa y del Mediterráneo Oriental. Naturalizada en América, se la encuentra en Canadá, Estados Unidos, México, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú, y Chile. La Ruda como se le conoce generalmente, pertenece a la familia de las Rutáceas, pertenece al género *Ruta* que incluye siete especies de arbustos muy aromáticos (Naveda-Gonzalez, 2010).

Esta familia agrupa gran cantidad de plantas útiles en medicina, puesto que son ricas en aceites esenciales, alcaloides y glucósidos. La ruda posee diferentes principios activos, pero el glucósido flavonoide rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$) es su principal componente, localizado principalmente en las hojas. Los demás componentes son:

- Ácidos (anísico, caprílico, plagónico y salicílico)
- Cetonas (metilnonilcetona, $C_{11}H_{22}O$ y metilheptilcetona, CH_3COC_7H)
- Terpenos (limoneno, pineno, metilnonil-carbinol y cineol); alcaloides (arborinina, graveolina, graveolinina, skiamina, soforina, cocusaginina, etc.)
- Taninos
- furanocumarinas, como el bergapteno, psolareno y xantotoxina

Como se observa, casi todos los componentes químicos de la ruda están bien definidos, pero existen pocos trabajos sobre sus lectinas y sus características antineoplásicas in vitro (Flores, 2012) es por eso que es importante realizar estudios en esta área particular.

Justificación

Actualmente los tratamientos utilizados en la terapia contra el cáncer son poco selectivos y presentan efectos colaterales adversos, dentro de las nuevas alternativas se ha propuesto que biomoléculas con la capacidad de reconocer células transformadas puedan ser utilizadas como adyuvantes en el tratamiento de la enfermedad, por tal motivo en este proyecto se evaluará la capacidad de lectinas de ruda (*Ruta graveolens* variedad domesticada) para ejercer efectos regulatorios en el desarrollo tumoral a través de la modificación de los niveles de EROs.

Hipótesis

Las lectinas contenidas en las hojas de ruda poseen actividad reguladora hacia la concentración de EROs en un sistema murino de cáncer, desencadenando algún proceso de muerte celular como apoptosis o autofagia.

Objetivos

General

Evaluar el efecto anticancerígeno, de un extracto enriquecido en proteínas tipo lectina de *Ruta graveolens* mediante su efecto en los niveles de la concentración de EROs y antioxidantes en un sistema murino.

Particulares

Obtener un extracto enriquecido en proteínas tipo lectinas de hojas de *Ruta graveolens*.

Cuantificar la cantidad total de proteína en el extracto mediante el método de Biuret.

Evaluar la actividad hemoaglutinante del extracto en el sistema ABO Rh+ humano para comprobar la actividad biológica de las lectinas durante el proceso de extracción y enriquecimiento.

Establecer una curva dosis respuesta de la actividad biológica de los extractos con los resultados de la hemoaglutinación con el fin de establecer dosis experimentales para evaluar.

Inducir un proceso canceroso (Sarcoma y carcinoma principalmente (Diaz, 1995)) en ratones de la cepa cd-1 mediante la inoculación con óxido de níquel (un inductor no específico de cáncer).

Cuantificar la concentración de óxido nítrico en hígado y sangre utilizando el método de Griess.

Medir la actividad de la catalasa en muestras hepáticas y de sangre con el método de Chance y Machley.

Observar la presencia/ausencia de lesiones cancerosas, obtener los diámetros de los mismos, para evaluar el efecto anticancerígeno del tratamiento.

Realizar un análisis estadístico de los resultados para determinar si existen cambios significativos entre los individuos tratados, no tratados y entre las diferentes dosis administradas.

Metodología

Extracción de proteínas tipo lectina de hojas de Ruda

Se pesaron y lavaron las hojas de las plantas de *Ruta graveolens* para desechar macrocontaminantes, después de secarse se pesaron 30 g de las hojas, estas se maceraron en un buffer PBS pH7.4 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006) a una proporción 1:3.3p/v, el extracto se filtró utilizando papel filtro de alto volumen, se tomó una muestra de 2 mL de cada fracción del extracto, esta fase se denomina "Extracto total" (Halina, 2003).

El extracto total se centrifugo a 3900 rpm por espacio de 20 min en una centrifuga marca Thermo Scientific modelo Sorvall Legend X1, para precipitar los componentes celulares más pesados. Se obtuvo el sobrenadante al cual se le denomina "Extracto crudo".

El sobrenadante se sometió a un proceso de precipitación salina, este proceso se basa en la perdida de interacción del agua con las proteínas suspendidas en ella, al saturar las moléculas de agua con sulfato de amonio (Baker S.A. de C.V.) al 80% p/v la solución se dejó precipitar durante 12 Hrs a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se centrifugó la solución a 3900 rpm durante 20 min, el sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en un volumen total de 15 mL de Buffer PBS, a esta fase se le denomina "Extracto precipitado", para disminuir la alta concentración de sales el extracto fue dializado utilizando una membrana semipermeable Vivaspin 20 (SIGMA-ALDRITCH) de 3 Kda durante 48 Hrs contra el buffer PBS original, con un cambio de buffer cada 24 Hrs, este extracto es el extracto final y se le denomina "Extracto dializado".

Concluido el proceso de extracción se realizó la cuantificación total de proteínas de las muestras de las diferentes fases del extracto y la prueba de hemoaglutinación se realizó solo con el "Extracto dializado" con el fin de observar la conservación de actividad biológica a través del proceso de extracción y enriquecimiento, los contaminantes presentes en los demás extractos causan interferencia en la prueba.

Inducción a cáncer

A los ratones CD-1 hembras de 4 meses, se les indujo un proceso canceroso mediante la inoculación de una alta concentración (20 mg) de óxido de níquel (Baker S.A. de C.V.) (Diaz, 1995). Que es inofensivo para los humanos, a menos que se aspire en altas dosis y por largos periodos de tiempo (VALE, 2010), en una dosis única; la vía de administración fue hipodérmica, el inductor no es específico y suele generar sarcomas, carcinomas, linfomas y adenomas, la tasa de supervivencia varía mucho entre cepas de ratón (Diaz, 1995), El inductor se encuentra diluido en aceite de oliva estéril ya que es liposoluble. Se establecieron 9 lotes con 5 individuos:

- Control no inducido, control vehículo, control inducido.
- Dosis 1 inducido, dosis 2 inducido, Dosis 3 Inducido.
- Dosis 1 no inducido, dosis 2 no inducido, dosis 3 no inducido.

Administración del Extracto

La administración de lectinas se llevó a cabo utilizando 3 dosis diferentes que se definieron mediante el ensayo de hemoaglutinación. La administración fue por vía oral para tener en cuenta las posibles transformaciones metabólicas de las lectinas.

Cuantificación de proteína total por el método de Biuret

Los métodos colorimétricos se basan en la característica de las moléculas en suspensión de absorber la luz de determinadas longitudes de onda (Sapan, 1999) (Ellman, 1982) (Parvin, 1965) (Putnam, 1971), en el caso particular del método de Biuret se forma un cromóforo azul-violeta resultado de la interacción de iones de cobre con los grupos peptídicos de las proteínas en un medio alcalino. El primer paso para poder cuantificar proteínas es establecer una curva patrón, esta se elaboró utilizando una solución patrón de albumina liofilizada, del proveedor SIGMA ALDRITCH, diluida en el mismo buffer PBS del extracto, el patrón se diluyo de forma seriada yendo de 0 mg/mL a 1 mg/mL a intervalos de 0.2 mg/mL. El blanco de calibración contiene el buffer, el reactivo de Biuret y agua destilada para completar el volumen. Después se agregó el reactivo de Biuret a cada tubo y se incubaron por 10 minutos. Se introdujeron uno a uno al espectrofotómetro para luz visible Genesys 20 (Thermo Scientific) para obtener un valor de absorbancia, estos datos se emplearan para elaborar una curva patrón de la cual se obtendrá la ecuación de la recta, esta muestra la relación entre el valor de la concentración y la absorbancia, una vez obtenidos los valores de absorbancia de todas las muestras de extracto, se sustituyeron en la ecuación despejada y se calcularon los valores de concentración de las muestras.

Ensayo de hemoaglutinación

Para evaluar la presencia de proteína tipo lectina en las diferentes etapas del proceso de extracción y concentración, se realizó un ensayo de hemoaglutinación con el extracto dializado, el ensayo se llevó a cabo empleando muestras de grupos sanguíneos del sistema ABO Rh+ obtenidas de individuos humanos sanos vía intravenosa colectadas en vacutainer con heparina (Vargas, 2009). Se utilizaron placas de 9 pozos con 25 μ L de buffer PBS y 25 μ L de la fracción del extracto a evaluar en dilución seriada para establecer una curva de dosis respuesta, el volumen se completó a 100 μ L con 50 μ L de sangre humana del sistema ABO. El ensayo contó con un control positivo (Concanavalina A (V SIGMA ALDRITCH) 1 mg/mL) y un control negativo sin ninguna fuente de hemoaglutinación. Los resultados del ensayo se expresan en unidades de hemoaglutinación que se determinaron mediante un examen visual utilizando un microscopio óptico de la marca Carl Zeiss modelo Primo Star. La escala tiene cuatro valores:

- 0: Sin aglutinación
- 1: Pocos cúmulos y/o muy pequeños
- 2: Mediana presencia de cúmulos y/o cúmulos de tamaño medio
- 3: Alta Presencia de cúmulos y/o cúmulos de gran tamaño

Obtención de plasma murino

Los ratones se sacrificaron mediante decapitación para evitar la interferencia en los niveles de óxido nítrico y en los niveles de catalasa que pueden resultar de otros métodos de sacrificio, la muestra de sangre se colectó en tubos con EDTA, que se centrifugaron a 3500 rpm en una durante 15 min, posteriormente se almacenaron en hielo hasta el momento de su análisis.

Cuantificación de óxido nítrico por el método de Griess

La reacción de Griess forma un cromóforo magenta que se lee a 540 nm en el espectrofotómetro modelo genesys 20 de la marca Thermo Scientific, este cromóforo es resultado de la reacción de sulfanilamida con nitrito en medio ácido (Guevara, 1998), seguido de un acoplamiento con aminas bicíclicas como N-(1-naftil) etilendiamina. Para su cuantificación se tomaron 25 μ L de plasma de ratón, al mismo tiempo se preparó una curva patrón de NaNO_2 , en concentración de 0 a 100 μ M a intervalos de 0.25 μ M, de la disolución stock de NaNO_2 . Se adiciono de manera secuencial 1 mL de Sulfanilamida 2% (p/v) en H_3PO_4 al 5% (v/v) y 1 ml de diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina al 2% (p/v), las sustancias utilizadas para la reacción fueron de la marca Baker S. A. de C. V. esta solución se incubo a temperatura ambiente durante 45 minutos antes de leer el valor de

absorbancia. La razón por la cual la curva patrón se debe realizar al mismo tiempo que el reactivo de Griess es porque los reactivos para la prueba pierden su estabilidad rápidamente.

Cuantificación de catalasa por el método de Chance y Machley

La cantidad de catalasa se midió utilizando el método de Chance y Machley (Machley, 1955). Se basa en la capacidad de la catalasa de reducir al peróxido de hidrógeno en una molécula de agua y $\frac{1}{2}$ de oxígeno molecular. Para determinar la descomposición del H_2O_2 se mezcló en una cubeta de cuarzo lo siguiente.

- 1450 μ L de sustrato (H_2O_2 30 mM en solución PBS, pH 7.0)
- 50 μ L de plasma

Se registró la absorbancia a 240 nm (A_{240}) utilizando un espectrofotómetro de luz UV modelo genesys 10, cada 20 s durante 3 min. Posteriormente se calculó el cambio en la absorbancia a 240 nm por minuto (ΔA_{240}) como la pendiente de la parte lineal de la gráfica de A_{240} contra el tiempo.

Para calcular la actividad de catalasa se requiere la siguiente ecuación:

$$UCAT/mL = (\Delta A_{240}/\epsilon) \text{ (FD de la reacción)}$$

Donde ϵ es el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 a 240 nm ($37.36 \mu\text{mol}^{-1} \text{ mL Abs}$); y FD es el factor de dilución ($1500/50 = 30$).

Se debe corregir por la concentración de proteína correspondiente a cada muestra (determinada por el método de Biuret), utilizando la siguiente fórmula:

$$UCAT/mg = ((\Delta A_{240}/\epsilon) \text{ (FD de la reacción)})/mg/mL \text{ de proteína}$$

Tenemos entonces que una unidad de catalasa se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir un μmol de H_2O_2 /minuto.

Evaluación del efecto anticancerígeno

Al realizar las necropsias se registró la presencia/ausencia de tumores macroscópicos, se removieron las masas tumorales presentes y se registraron sus diámetros, estos datos también se sometieron al análisis estadístico.

Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis estadístico ANOVA con una prueba de Tukey que evaluara la Diferencia Honestamente Significativa (HSD por sus siglas en inglés) entre cada grupo experimental.

Resultados

Obtención de un extracto y enriquecido de proteínas tipo lectina

El material vegetal se maceró en buffer PBS pH7.4, el material se dividió en lotes de 10g c/u para poder manejarlos adecuadamente, la pérdida en el volumen total en la segunda fase se debe a la gran capacidad de absorción de las fibras vegetales, a pesar de utilizar un sistema de filtrado asistido con vacío la fibra vegetal retuvo 39 mL de buffer, durante este proceso se perdieron 8.58 mg de proteínas, esto constituye la pérdida más grande durante todo el proceso de purificación y enriquecimiento, el aumento en la concentración de mg/mL que se observa durante el proceso, se debe a la disminución del volumen total del extracto.

Fase de extracción	mg/mL	mL totales	mg de proteína totales
Extracto total	1.42	99	140.58
Extracto crudo	2.2	60	132
Extracto precipitado	8.76	15	131.4
Extracto dializado	11.93	11	131.23

Tabla 4

Concentración proteica

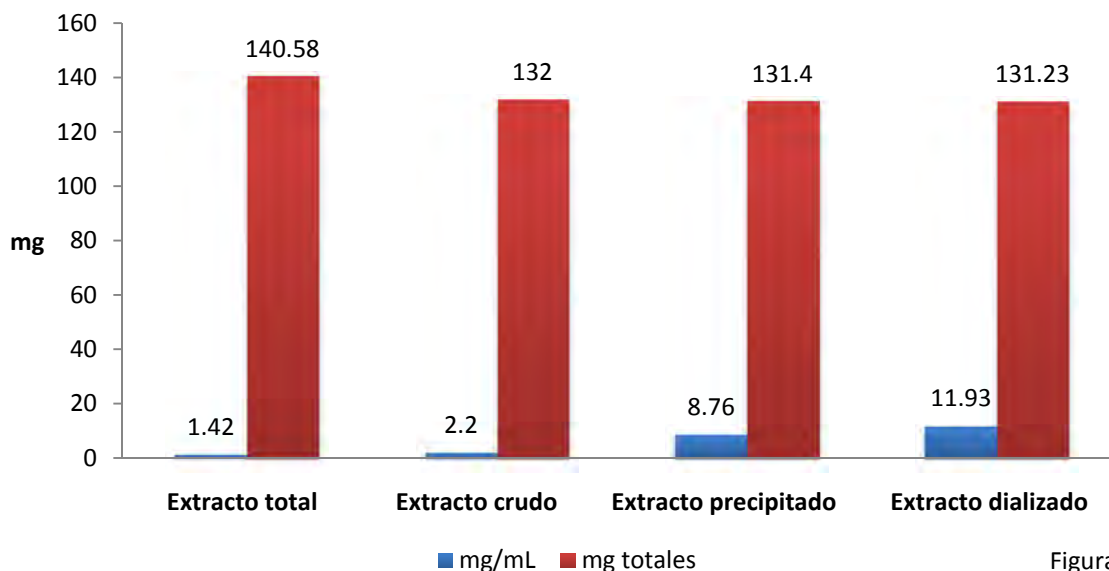


Figura 2

La figura 2 muestra la cantidad de proteínas en el extracto, las barras rojas muestran la pérdida de proteínas en el extracto total, las barras azules muestran el proceso de enriquecimiento del extracto.

Pruebas de hemoaglutinación

Se obtuvieron muestras de individuos humanos, sanos de cada tipo sanguíneo del sistema ABO con factor Rh+ mediante punción intravenosa, las muestras se almacenaron en tubos vacutainer con heparina, los tubos se centrifugaron a 3900 rpm durante 20 min para separar el plasma de la fracción celular la cual se resuspendió en buffer PBS pH7.4 y se volvieron a centrifugar una vez más, para eliminar todo el plasma posible. Las placas de 9 pozos se prepararon de acuerdo al siguiente esquema:

Tipo sanguíneo	Control positivo	Control negativo	Extracto dializado						
A Rh+	Concanavalina 1mg	PBS	1mg	2mg	3mg	4mg	5mg	6mg	7mg
B Rh+	Concanavalina 1mg	PBS	1mg	2mg	3mg	4mg	5mg	6mg	7mg
O Rh+	Concanavalina 1mg	PBS	1mg	2mg	3mg	4mg	5mg	6mg	7mg

Tabla 5

Los resultados que se obtuvieron se presentan en la tabla 6, se observa una respuesta casi idéntica entre los tres tipos sanguíneos. Las diferencias observables son atribuibles a los distintos tipos de azúcares que recubren las membranas celulares de los eritrocitos, las cuales son también la base de su clasificación ABO, Los resultados se dan en grados de aglutinación (GA), del 0 al 3 dependiendo del número y del tamaño de las aglutinaciones.

Tipo sanguíneo	Control +	Control -	Extracto dializado						
	Con A 1mg	PBS	1mg	2mg	3mg	4mg	5mg	6mg	7mg
A Rh+	3	0	0	1	1	1	2	3	3
B Rh+	3	0	1	1	1	2	2	2	3
O Rh+	3	0	0	1	1	2	2	3	3

Tabla 6

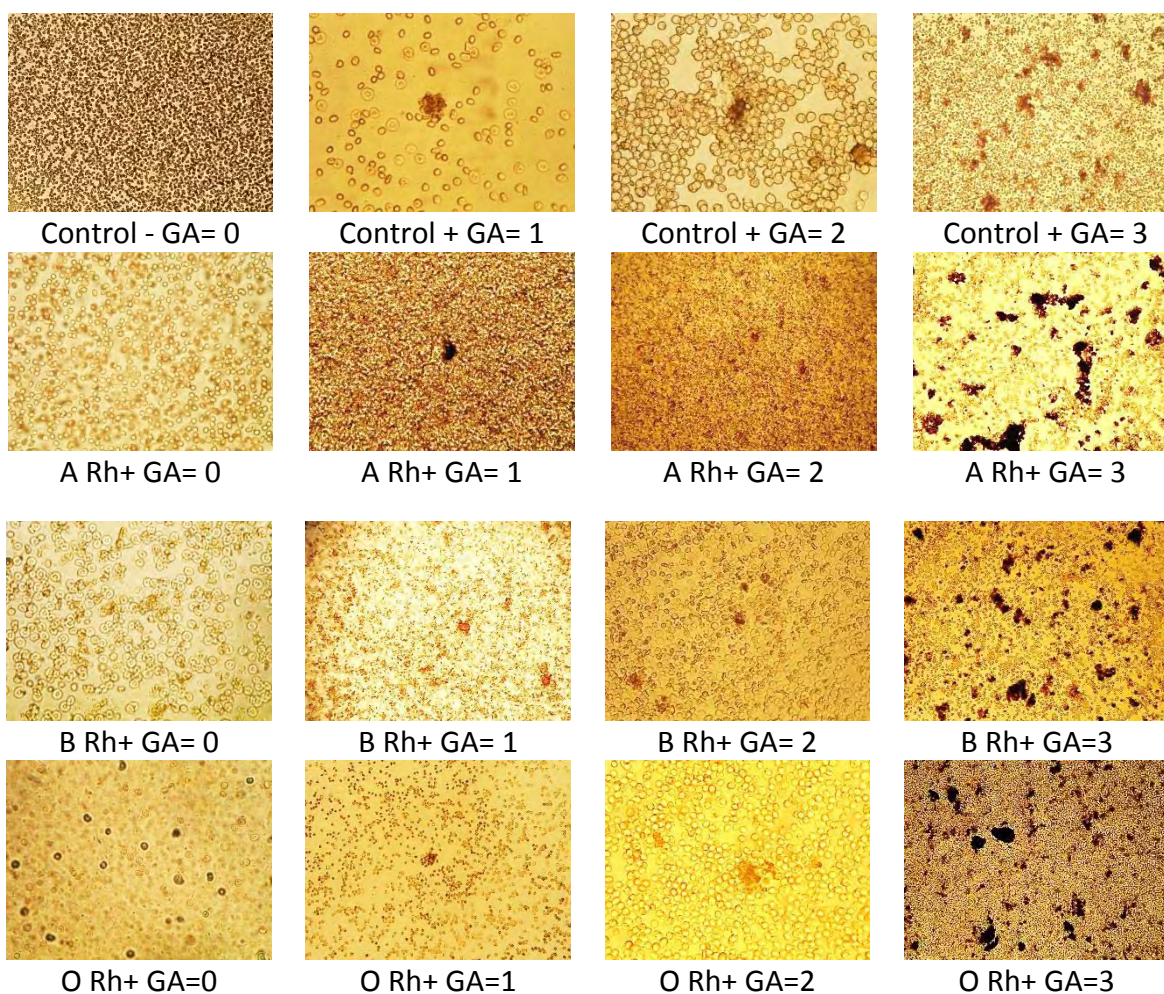


Tabla 7

La tabla 7 contiene fotografías que muestran la respuesta de los eritrocitos a diferentes concentraciones del extracto dializado, se observa un claro aumento en la cantidad y en la densidad de las aglutinaciones conforme al aumento en la concentración del extracto, La primera fila pertenece a la muestra control, que contiene Con A. De estos resultados decidimos probar 3 dosis distintas, 1.75mg “Dosis baja”, 3.5mg “Dosis media” y 7mg “Dosis alta”. Se eligieron estos rangos por ser las cantidades que ejercieron efectos biológicos, claramente diferentes en los grupos sanguíneos.

Cuantificación de nitritos

Las tablas 8 y 9 muestran la concentración de nitritos en hígado y sangre de cada ratón. Se mide la concentración de nitritos para evaluar la cantidad de estrés oxidativo presente en el organismo, es una medida indirecta de la cantidad de óxido nítrico (NO, una ERO), el NO es altamente inestable, y es rápidamente transformada en nitritos, un compuesto más estable, que puede cuantificarse mediante el método de Griess.

Concentración de nitritos en hígado en mM/mL									
Ratón	Control	Vehículo	Inductor	Inductor + Extracto dosis de 1.75 mg/mL	Inductor + Extracto dosis de 3.5 mg/mL	Inductor + Extracto dosis de 7 mg/mL	Extracto dosis de 1.75mg	Extracto dosis de 3.5mg	Extracto dosis de 7mg
1	241.01	220.97	249.37	223.29	253.67	224.56	238.48	249.87	326.35
2	251.39	237.57	244.05	230.38	247.72	266.33	213.16	276.46	324.56
3	202.78	245.06	238.35	256.2	235.57	244.81	215.7	211.9	291.27
4	218.23	228.23	255.7	245.19	213.16	239.75	182.78	237.97	301.77
5	243.8	223.67	205.44	239.62	256.2	243.54	289.11	246.71	322.03

Tabla 8

Concentración de nitritos en sangre en mM/mL									
R a t ó n	Control	Vehículo	Inductor	Inductor + Extracto dosis de 1.75 mg/mL	Inductor + Extracto dosis de 3.5 mg/mL	Inductor + Extracto dosis de 7 mg/mL	Extracto dosis de 1.75mg	Extracto dosis de 3.5mg	Extracto dosis de 7mg
1	233.04	249.11	223.8	298.48	265.57	218.73	248.73	235.42	253.92
2	214.18	218.73	294.68	243.8	263.92	320	228.73	239.11	248.86
3	229.11	284.56	269.37	284.56	289.62	264.3	226.86	223.54	238.35
4	219.49	244.05	264.3	244.05	269.37	284.56	234.3	236.86	240.73
5	214.05	274.43	283.29	248.99	320	183.29	208.61	238.35	235.48

Tabla 9

Como parte del análisis de los datos, se calculó y grafico la media aritmética de los valores, para poder observar su comportamiento y buscar patrones que indiquen el efecto del tratamiento en la concentración de nitritos en el organismo.

En la siguiente gráfica, se observa una elevación importante en los niveles de nitritos en el tejido hepático de los ratones del grupo “Extracto dosis de 7mg/mL”. Los valores de nitritos en sangre presentan un comportamiento errático, esto puede deberse a un proceso patológico no identificado, es bien sabido que las diferentes tipos de infecciones causan una elevación en los niveles de nitritos de los ratones (Stuehr, 1987).

Medias de la concentración de nitritos en hígado por grupo

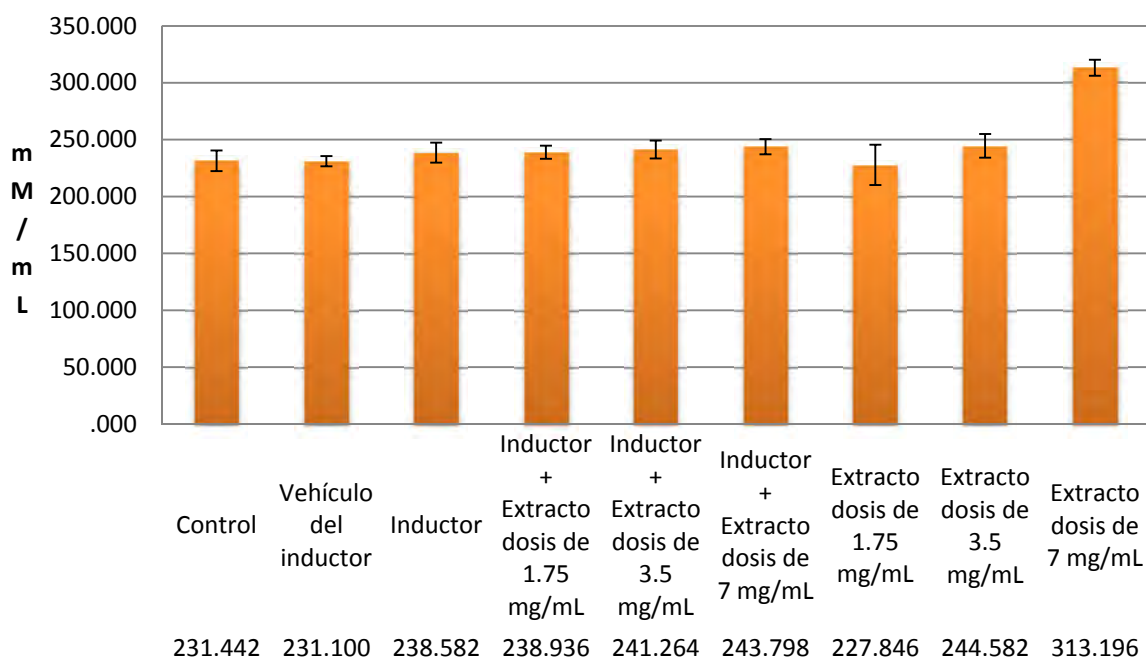


Figura 3

Medias de la concentración de nitritos en sangre por grupo

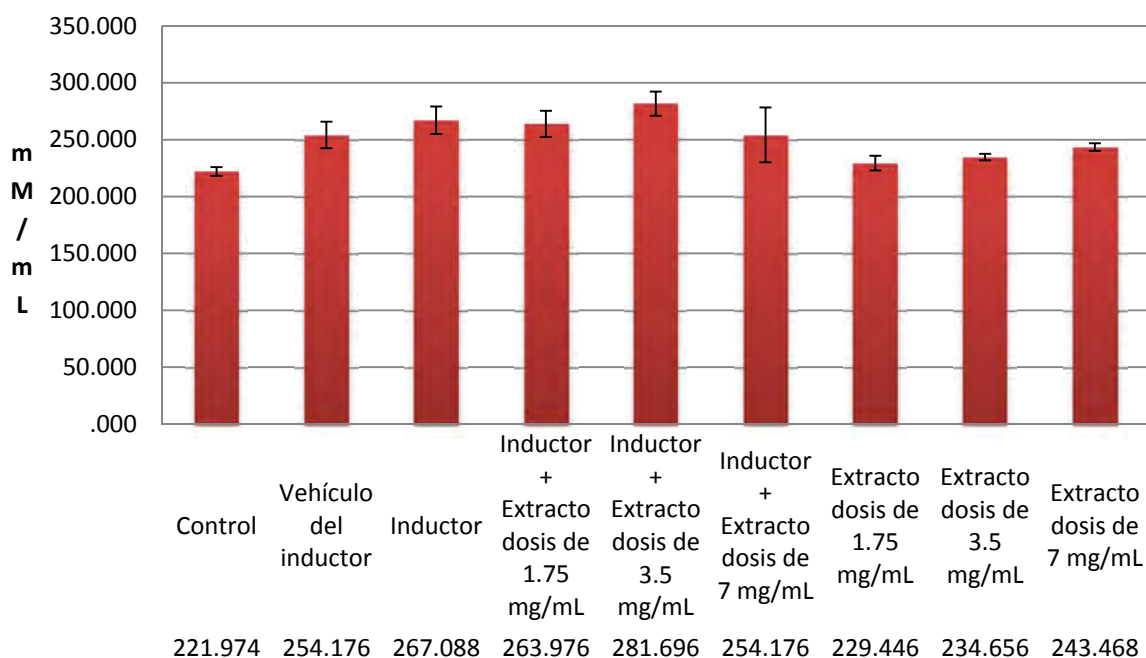


Figura 4

En las tablas 9 y 10 se muestran los valores de las pruebas de ANOVA así como los descriptivos estadísticos de los valores y las tablas comparativas resultantes de la prueba de Tukey.

ANOVA de Nitritos en hígado					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	27059.275	8	3382.41	7.715	0.00
Intra-grupos	15783.185	36	438.42		
Total	42842.460	44			

Tabla 9

ANOVA de Nitritos en sangre					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	15064.119	8	1883.015	2.859	0.01
Intra-grupos	23707.451	36	658.540		
Total	38771.570	44			

Tabla 10

Como se puede observar el valor de significancia de las ANOVA en ambos grupos es menor al 0.05 lo que nos permite rechazar la hipótesis de igualdad de medias y aceptar la hipótesis alterna que dicta que existe una diferencia significativa entre al menos dos medias dentro de los grupos comparados, para encontrar esta diferencia se realizó la prueba de Tukey una prueba de diferencia de medias. Se trata de una prueba estadística no paramétrica, se eligió esta prueba por sobre las otras debido a que el número de muestras por grupo hacia poco viables los cálculos para el ajuste de homocedasticidad necesaria para las pruebas paramétricas, además, la prueba de Tukey solo requiere que los grupos tengan el mismo número de datos.

La prueba de Tukey para los grupos de las muestras de hígado obtuvieron un valor de Diferencia Significativamente Honesta de 37.831, posteriormente, se realizó una tabla, donde se calculan, las diferencias entre las medias de los grupos, si esta diferencia es mayor o igual al valor de HSD (Honest Significant Difference), la diferencia entre los valores se considera estadísticamente significativa, la tabla 10 en la página 28 contiene los resultados para las muestras hepáticas, los pares de grupos que presentan una diferencia estadísticamente significativa entre sí, se muestran resaltados en amarillo. Los resultados de la mitad inferior de la tabla se omitirán, ya que son los mismos valores obtenidos en la mitad superior y dado que los resultados se expresan en valores absolutos no existe ninguna diferencia entre ellos.

La prueba de Tukey para los grupos de las muestras de sanguíneas obtuvo un HSD de 46.365 las tablas de comparación entre los grupos se presentan en la página 29, se señalan en amarillo los pares de grupos que presentan una diferencia estadísticamente significativa entre sus valores

Tabla de resultados de la prueba de Tukey para los niveles de nitritos en tejido hepático.

Grupos	Control	Vehículo del inductor	Inductor	Inductor + extracto dosis de 1.75 mg/mL	Inductor + extracto dosis de 3.5 mg/mL	Inductor + extracto dosis de 7 mg/mL	Extracto dosis de 1.75 mg/mL	Extracto dosis de 3.5 mg/mL	Extracto dosis de 7 mg/mL
Control	0	0.342	7.140	7.494	9.822	12.356	3.596	13.140	81.754
Vehículo del inductor		0	7.482	7.836	10.164	12.698	3.254	13.482	82.096
Inductor			0	-0.354	2.682	5.216	10.736	6.000	74.614
Inductor + extracto dosis de 1.75 mg/mL				0	2.328	4.862	11.09	5.646	74.260
Inductor + extracto dosis de 3.5 mg/mL					0	2.534	13.418	3.318	71.932
Inductor + extracto dosis de 7 mg/mL						0	15.952	0.784	69.398
Extracto dosis de 1.75 mg/mL							0	16.736	85.350
Extracto dosis de 3.5 mg/mL								0	68.614
Extracto dosis de 7 mg/mL									0

Tabla 11

Tabla de resultados de la prueba de Tukey para los niveles de nitritos en sangre.

Grupos	Control	Vehículo del inductor	Inductor	Inductor + extracto dosis de 1.75 mg/mL	Inductor + extracto dosis de 1.75 mg/mL	Inductor + extracto dosis de 1.75 mg/mL	Inductor + extracto dosis de 1.75 mg/mL	Inductor + extracto dosis de 1.75 mg/mL	Inductor + extracto dosis de 1.75 mg/mL
Control	0	32.202	45.114	42.002	59.722	32.202	7.472	12.682	21.494
Vehículo del inductor		0	12.912	9.800	27.520	0.000	24.730	19.520	10.708
Inductor			0	3.112	14.608	12.912	37.642	32.432	23.620
Inductor + extracto dosis de 1.75 mg/mL				0	17.720	9.800	34.530	29.320	20.508
Inductor + extracto dosis de 3.5 mg/mL					0	27.520	52.250	47.040	38.228
Inductor + extracto dosis de 7 mg/mL						0	24.730	19.520	10.708
Extracto dosis de 1.75 mg/mL							0	5.210	14.022
Extracto dosis de 3.5 mg/mL								0	8.812
Extracto dosis de 7 mg/mL									0

Tabla 12

Niveles de catalasa

Los niveles de catalasa son un indicador indirecto de la capacidad de un sistema vivo de controlar los niveles de la ERO Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Para poder calcular la cantidad de unidades de catalasa necesitamos medir la curva de extinción para cada grupo. Las figuras de la 5 a la 7 muestran la curva de extinción de la catalasa de los diferentes grupos de muestras de sangre. En cada grafica se presenta la ecuación de la recta que predice el comportamiento de la concentración de catalasa de forma lineal, con esta información podemos obtener el ΔA_{240} para sustituir en la ecuación final.

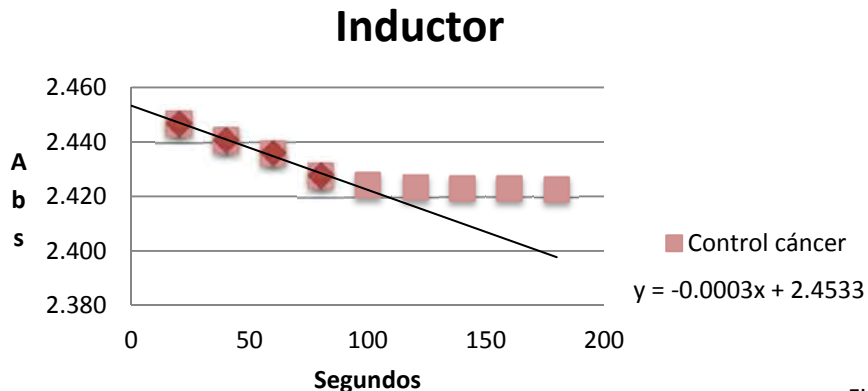
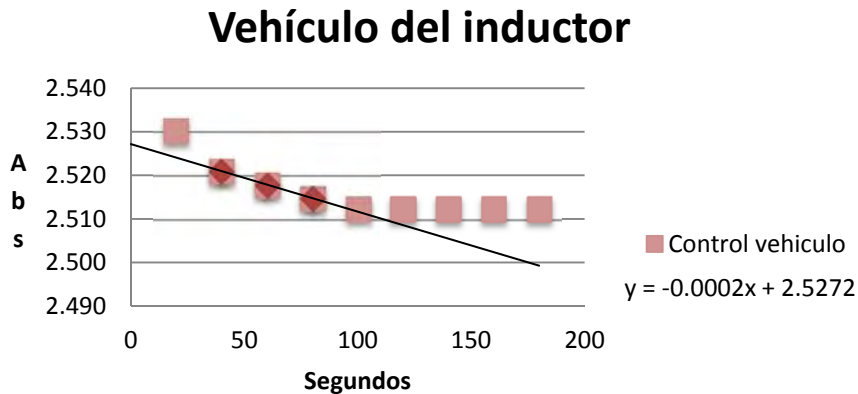
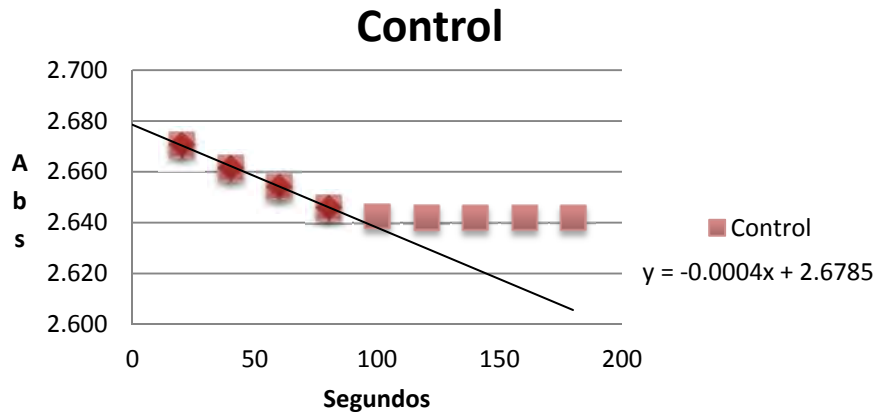
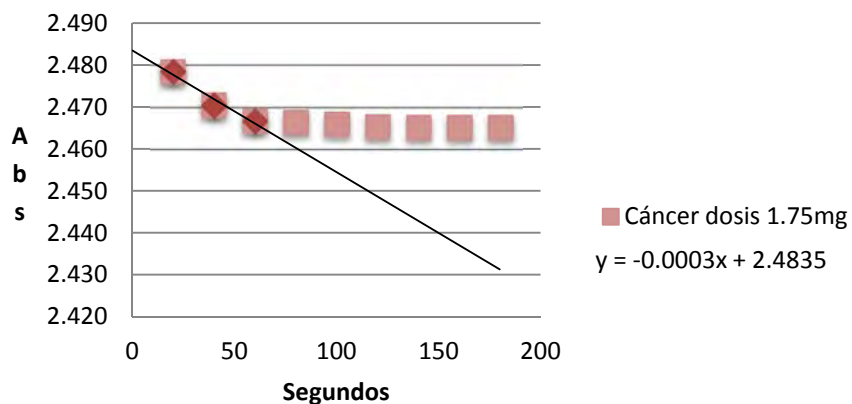
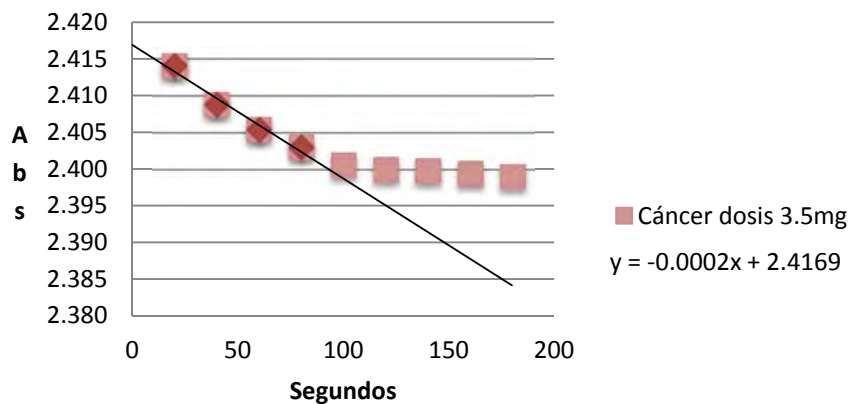


Figura 5

Inductor + exacto dosis de 1.75mg



Inductor + exacto dosis de 3.5mg



Inductor + exacto dosis de 7mg

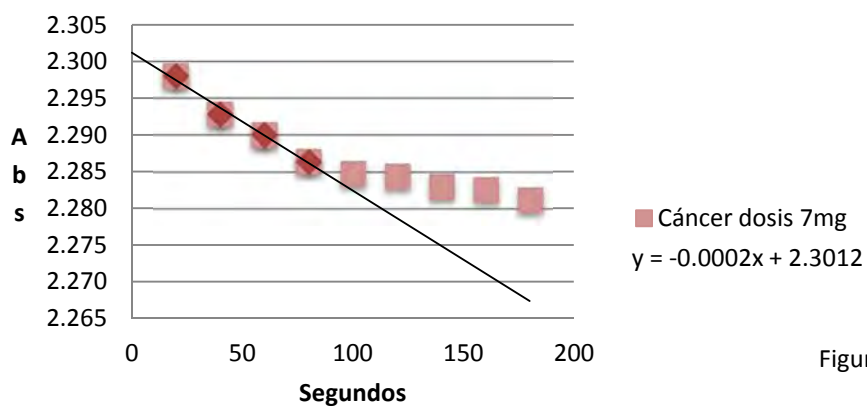
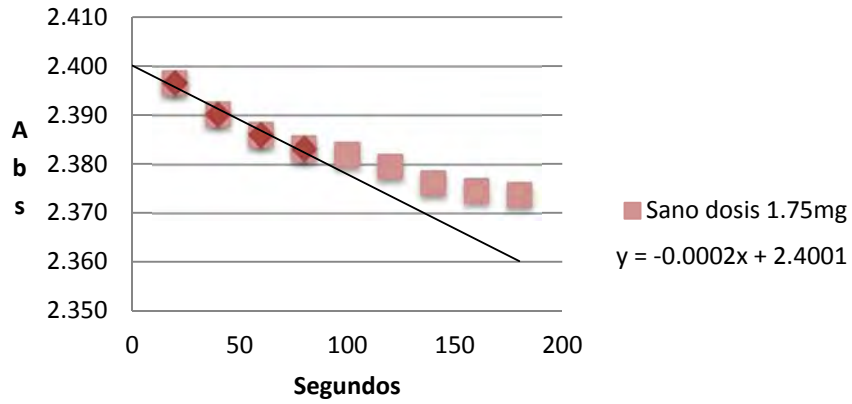
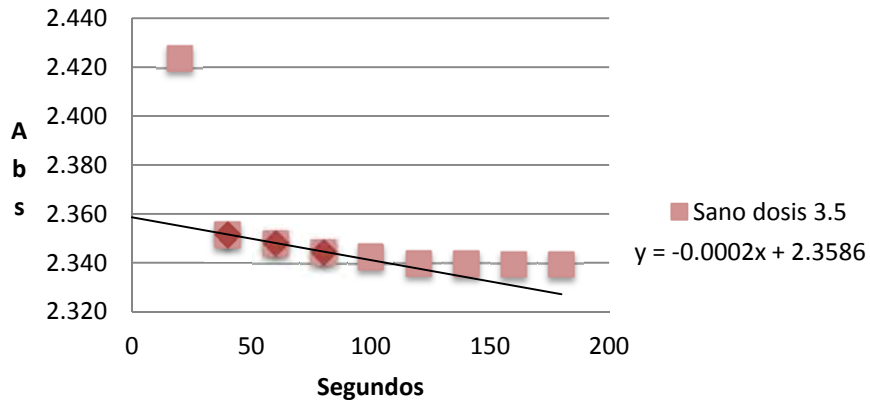


Figura 6

Extacto dosis de 1.75mg



Extacto dosis de 3.5mg



Extacto dosis de 7mg

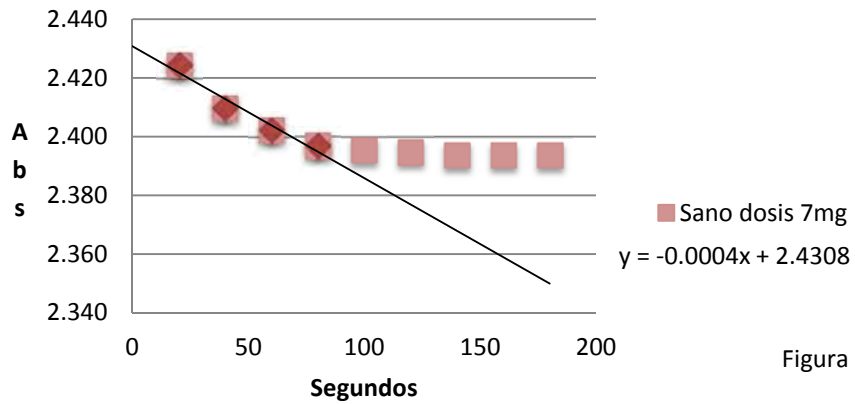


Figura 7

Las figuras 8, 9 y 10 muestran las curvas de extinción de catalasa para las muestras hepáticas.

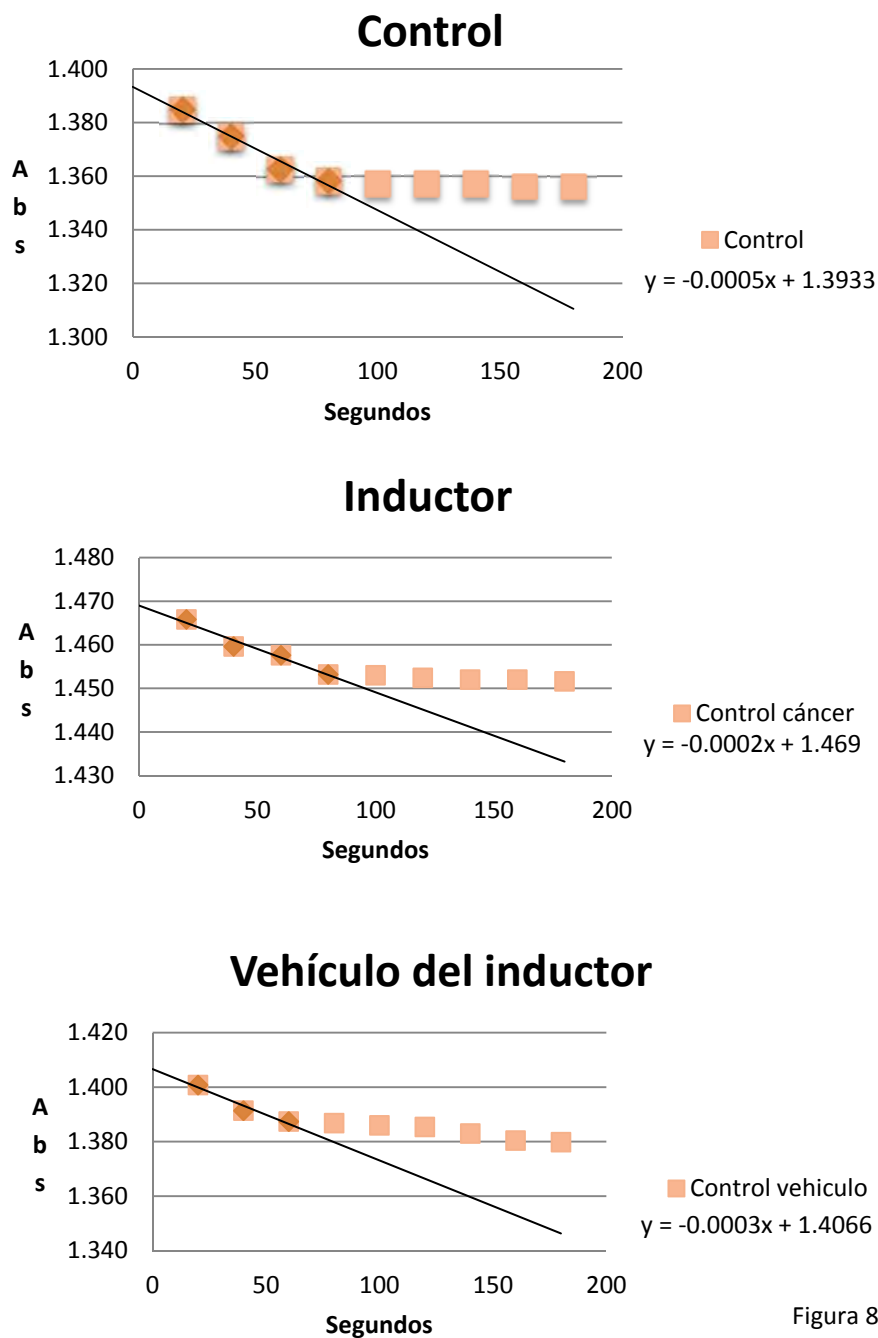
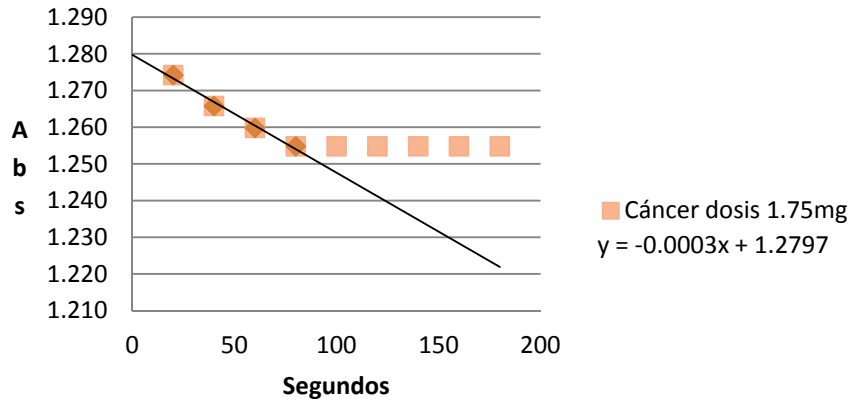
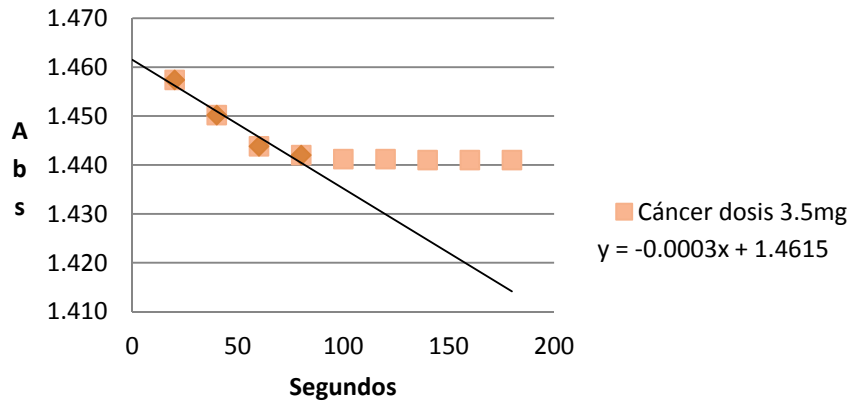


Figura 8

Inductor + extracto dosis de 1.75mg



Inductor + extracto dosis de 3.5mg



Inductor + extracto dosis de 7mg

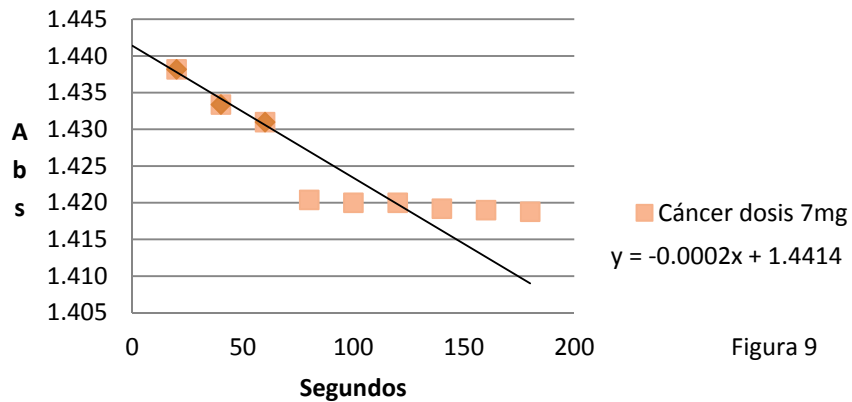
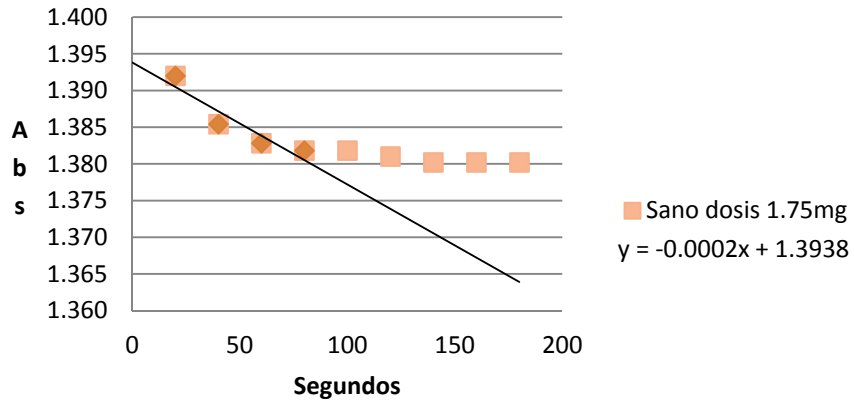
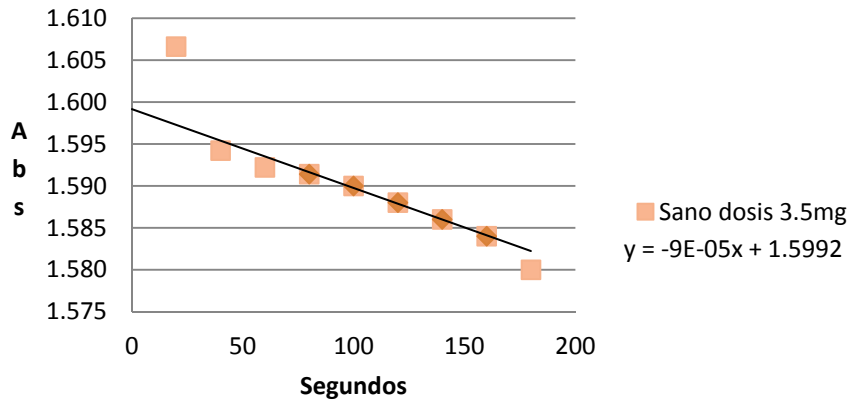


Figura 9

Extacto dosis de 1.75mg



Extacto dosis de 3.5mg



Extacto dosis de 7mg

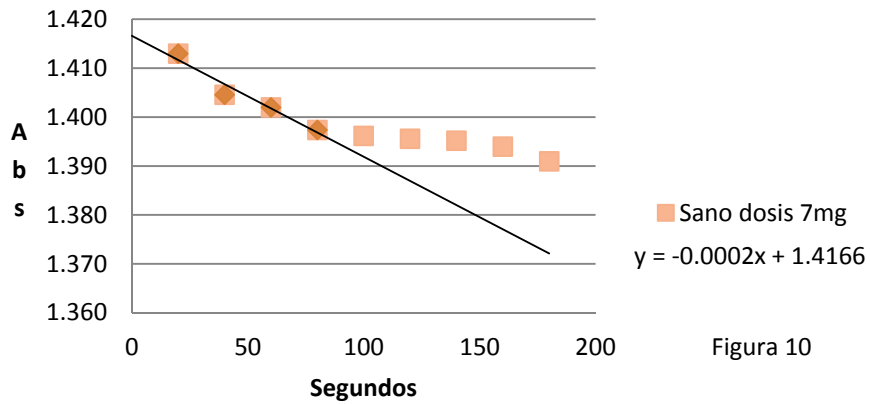


Figura 10

Después de obtener los valores de ΔA_{240} de cada grupo se calcularon las Ucat (Unidad de catalasa) sobre mg de proteína. Las figuras 11 y 12 presentan los resultados.

Ucat/mg de proteína en sangre

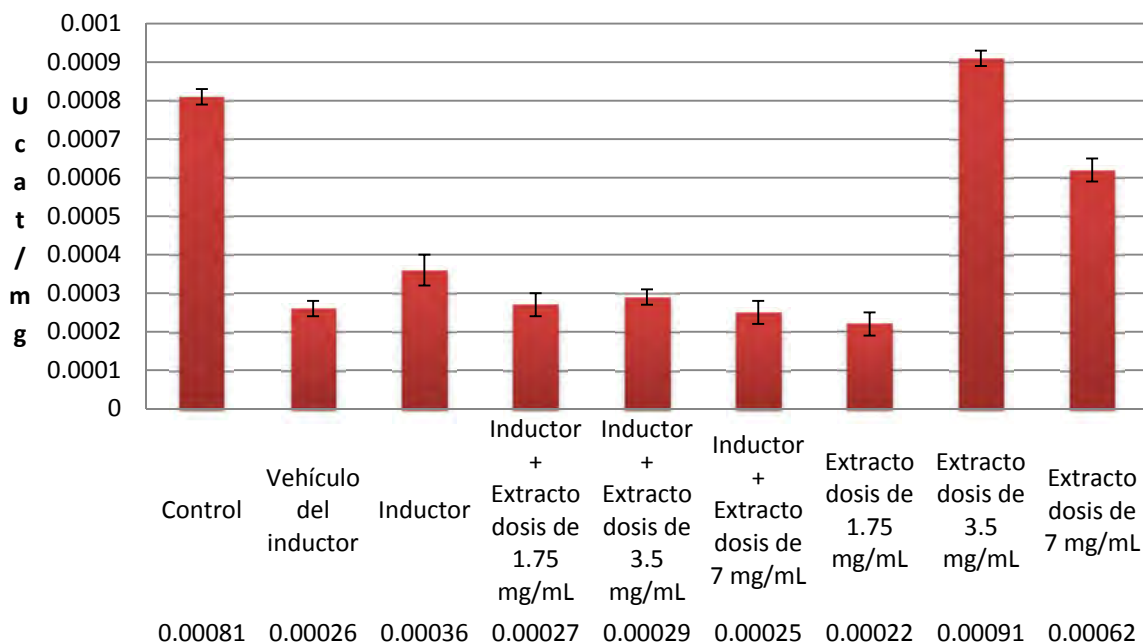


Figura 11

Ucat/mg de proteína en hígado

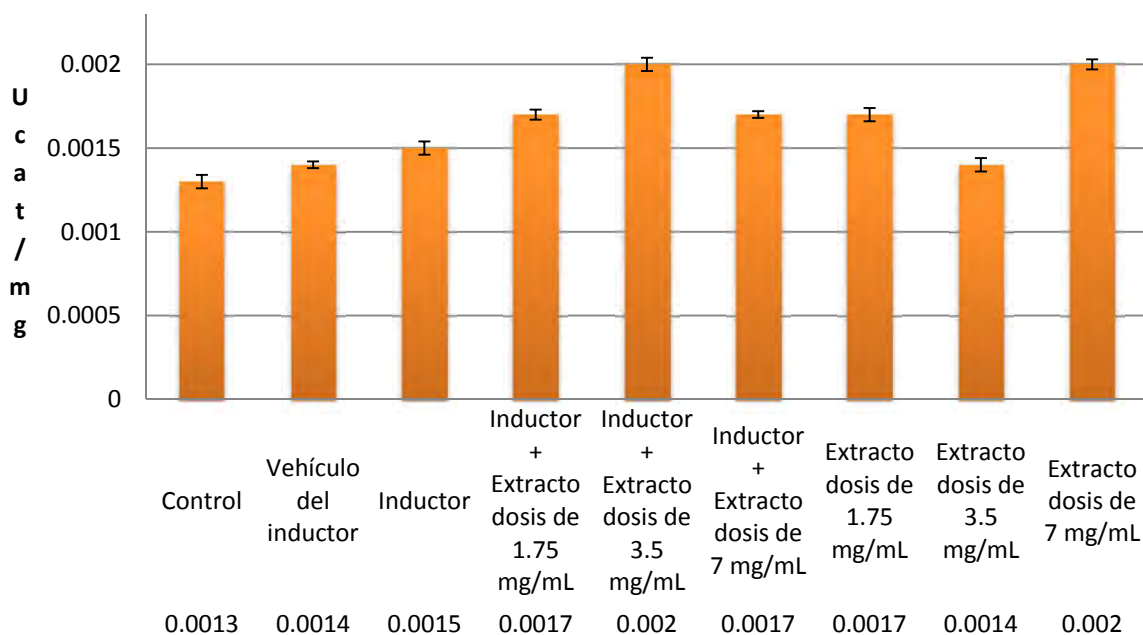


Figura 12

Se observa claramente que los niveles de catalasa en sangre son más inestables que en hígado, esto se debe a que la concentración de catalasa en sangre tiende a variar constantemente, al tratarse de una enzima está en un ciclo constante de síntesis y consumo. Sin embargo los datos de las pruebas en hígado muestran un comportamiento claro, que apoya la hipótesis del aumento en las concentraciones de EROs (Peróxido de hidrógeno H_2O_2) en respuesta a la administración de lectinas de ruda, se observa el caso particular del grupo "Extracto dosis de 3.5mg", este dato atípico es atribuible a un error experimental, incluso la ecuación de la recta de este grupo fue atípica.

Evaluación del efecto antitumoral

La inducción de las lesiones cancerosas se llevó acabo con una inyección hipodérmica de óxido de níquel un compuesto insoluble en agua, que produce cáncer en humanos expuestos por vía respiratoria, pero que no representa un riesgo a la salud de otra manera. En ratones se tiene reportado como inductor inespecífico de cáncer, principalmente sarcomas, después de la administración del inductor, se le permitió llevar a cabo su efecto durante 4 meses, monitoreando a los ratones semanalmente en busca de anomalías como bultos o inflamación palpable en el área de la inoculación. Durante la extracción de las muestras se realizó una necropsia en busca de cualquier anomalía, y se observó que alrededor de un 75% de los individuos generaron masas celulares anómalas. Se observó que en la mayoría de los casos había un depósito de Oxido de níquel en el tejido intersticial circundante al área de inoculación.



Figura 13

Se observa una masa anómala así como un depósito de NiO



Figura 14

Una masa tumoral de 3 mm de diámetro

El diámetro de los tumores se midió con un vernier digital, en los casos que presentaban más de una masa tumoral, los valores de los diámetros se anotaron por separado, pero se sumaron para no afectar el cálculo de la media. Se presenta la tabla con las medidas individuales de las masas tumorales así como una fotografía de los depósitos de NiO en el hígado de uno de los ratones

Grupo	Ratón				
	1	2	3	4	5
Control	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Vehículo del inductor	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Inductor	1.5mm	3mm	2.3mm	N/A	1mm
		0.5mm			0.8mm
Inductor + extracto dosis de 1.75mg/mL	N/A	1mm	1mm	1.3mm	N/A
		1.6mm	1.7mm	1mm	
Inductor + extracto dosis de 3.5mg/mL	1.3mm	2.3mm	1.7mm	N/A	0.9mm
	0.7mm				0.5mm
					0.5mm
Inductor + extracto dosis de 7mg/mL	N/A	1mm	1.6mm	0.9mm	1.1mm
		0.9mm		0.5mm	

Tabla 13

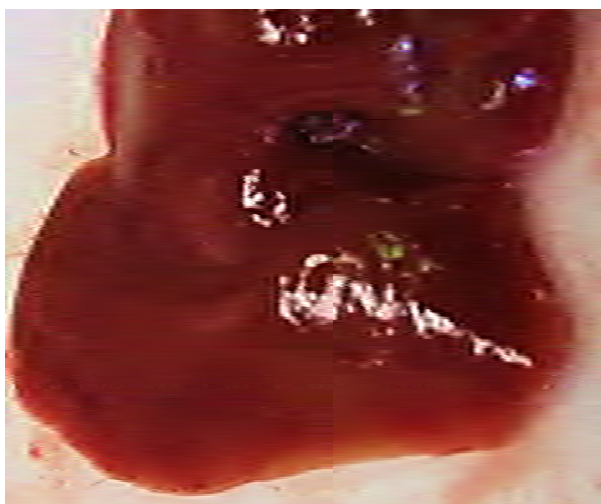


Figura 15

Debido a que el hígado se encarga de desintoxicar al organismo, es posible suponer que cantidades relativamente pequeñas del inductor logran infiltrarse en los capilares del área inoculada y viajan por el torrente sanguíneo, donde el hígado lo aisló para intentar proteger al individuo. Lo que explicaría las manchas de color verde en el hígado de este ratón.

Medias de los diámetros de los tumores por grupo

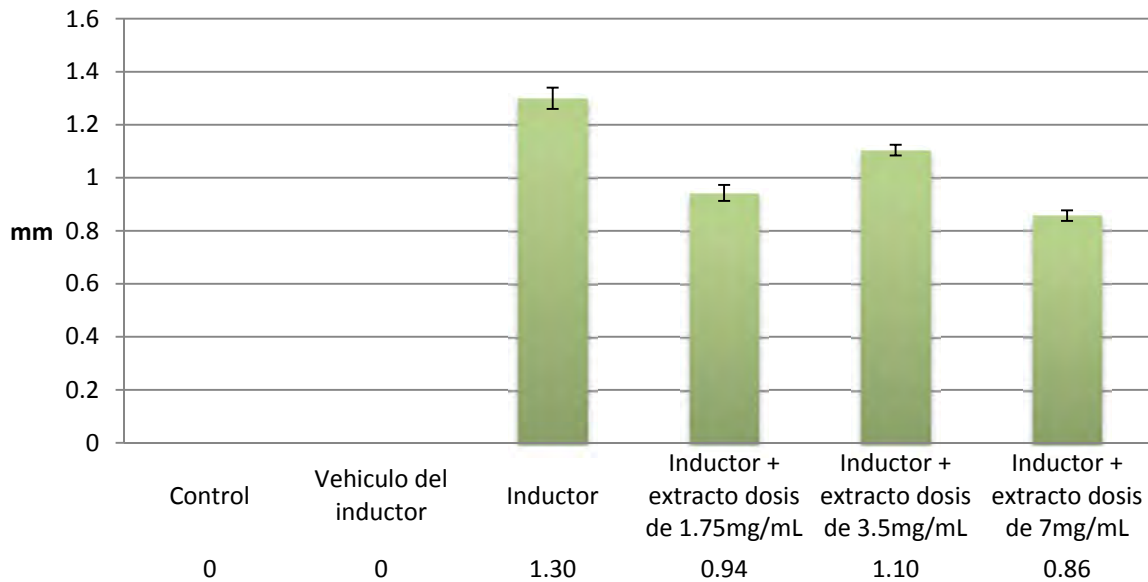


Figura 16

Se observa que la media de los diámetros de los tumores tiende a disminuir al aumentar la concentración del extracto. En el caso del grupo "Inductor + extracto dosis de 1.75mg/mL" dos individuos no generaron lesiones tumorales, recordemos que los sistemas biológicos no responden de la misma manera a los mismos estímulos, los resultados del grupo al que solo se le administro el inductor concuerdan con lo reportado en la literatura (Diaz, 1995).

Análisis y discusión de los resultados

Ha sido documentado que la mayor concentración de proteínas se encuentra principalmente en las semillas (Perez, 1999). Sin embargo existen estudios que emplean extractos de hoja con un fuerte efecto hemoaglutinante (Vargaz, 2009), los resultados obtenidos mediante este proceso de extracción concuerdan con los resultados de otros trabajos similares, el proceso de precipitación salina en el cual se utiliza una sal con alta fuerza iónica para provocar la pérdida de solubilidad de las proteínas en extracto acuoso, nos permitió concentrar la mayor cantidad de proteínas sin modificar su estructura (KSU, 2009), esta es una herramienta de bastante utilidad para obtener extractos protéicos con funcionalidad biológica.

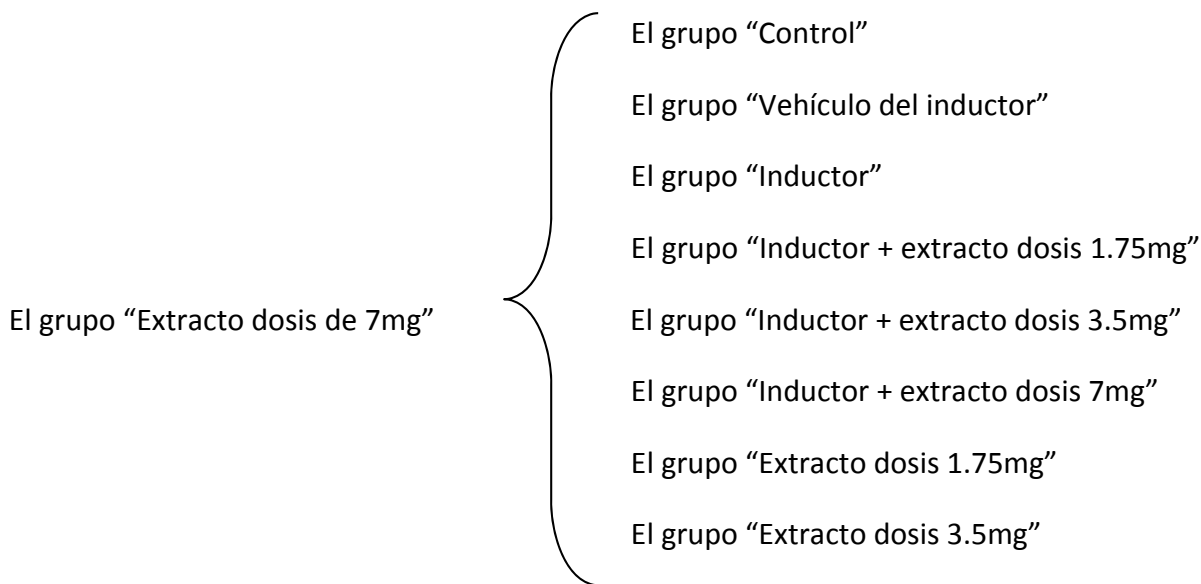
La cuantificación protéica por el método colorimétrico de Biuret mostró que la eficiencia del método de extracción presenta una pérdida importante de proteínas debido a la capacidad de absorción de las fibras de la hoja fresca. Se prefirió su uso sobre el material desecado, debido a que las proteínas pueden cambiar su arreglo tridimensional en ausencia de agua (Nagano C. , 2007) lo que puede comprometer su actividad biológica, la eficiencia del método de extracción y purificación fue de 131mg de proteína/30g de material vegetal es decir que la fracción protéica de nuestro interés representa el 0.43% del peso total del material vegetal.

Para probar la conservación del efecto biológico y la presencia de lectinas, se realizó un ensayo de hemoaglutinación con eritrocitos humanos de fenotipo conocido del sistema ABO factor Rhesus positivo. Además de comprobar la ausencia/presencia de proteínas tipo lectina el ensayo nos permite proponer una curva de dosis respuesta para evaluar el efecto biológico del extracto, se eligió una dosis baja de 1.75mg, porque está entre los dos primeros valores que suscitaron un cambio observable en los valores de hemoaglutinación, la siguiente dosis de 3.5mg se eligió porque la mayoría de los grupos presentaron un nivel de hemaglutinación de 2 en vez de 1 y la concentración final de 7mg produjo una aglutinación grado 3 en todos los tipos sanguíneos.

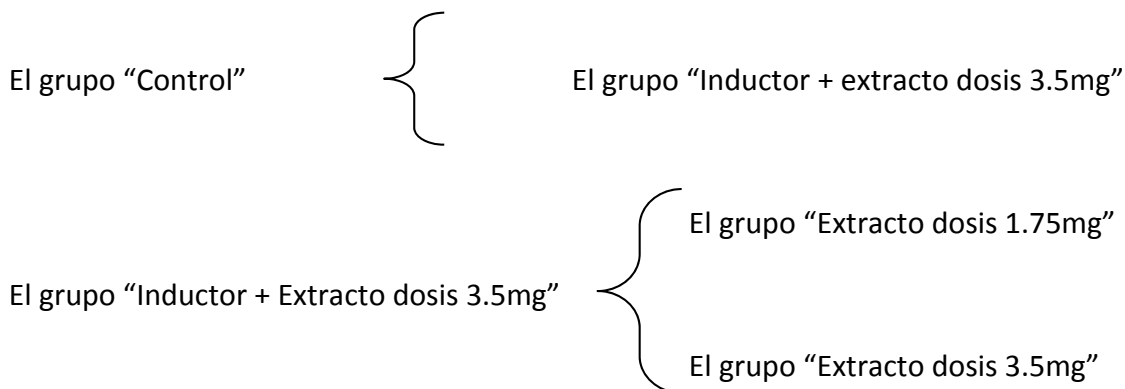
Los ratones inducidos a cáncer con óxido de níquel, generaron masas tumorales de 0.5 mm a 2.1 mm de diámetro. A lo largo de 4 meses el óxido de níquel produjo varios tumores en la zona de inoculación. Nuestros hallazgos son consistentes con lo reportado en la literatura (Diaz, 1995) la razón por la que se eligió un inductor no específico y con una tasa de inducción del 80% fue su seguridad para los humanos, ya que solo es nocivo para la salud si se aspira durante periodos prolongados de tiempo (VALE, 2010). El modelo cumplió el objetivo, de permitirnos analizar la respuesta de un proceso canceroso a la administración del extracto, ya que a pesar de que en el grupo "Inductor + extracto dosis de 1.75mg" dos individuos no generaron tumores, se observa una clara reducción en los diámetros de los tumores presentes en los grupos tratados que atiende a la concentración de proteínas administradas.

El óxido nítrico es un compuesto muy volátil en el organismo, debido a su reactividad, los mecanismos antioxidantes transforman el óxido nítrico en nitritos, un metabolito más estable que puede cuantificarse mediante el método de Griess.

La concentración de nitritos en el tejido hepático de los ratones del grupo “Extracto dosis de 7mg” presenta un claro aumento, todos los grupos presentaron una diferencia estadísticamente significativa con este grupo.



Esto indica que a altas dosis, en un individuo sin un proceso canceroso instalado, el efecto pro oxidante de las lectinas de ruda produce un efecto adverso ya que eleva los niveles de EROs, esto denota la importancia del establecimiento de una curva de dosis respuesta, ya que nos permite establecer los límites operativos de un tratamiento potencial. El comportamiento de los niveles de nitritos en sangre es más errático, presenta diferencias estadísticamente significativas entre los siguientes grupos:



Estos datos, revelan que las lectinas poseen la capacidad de aumentar la concentración de EROs si se administran en dosis altas, la concentración elevada de EROs conduce a las células a la autofagia y a la apoptosis (Fu B. I.-j.-k., 2009). En los individuos sanos se observa un efecto pro oxidante (toxico), que concuerda con lo reportado por Fu lei lei et al en 2011.

La catalasa es una enzima encargada de biotransformar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en dos moléculas de agua y una de oxígeno molecular (O_2) (Goodsell, 2004) Medir el nivel de catalasa permite conocer la cantidad de agentes antioxidantes que un organismo produce, con este dato podemos inferir las condiciones del individuo. Una vez más, los resultados obtenidos en el tejido sanguíneo muestran un comportamiento errático, que no revela mucho. Sin embargo los resultados de hígado, donde los niveles de la enzima son más estables, permiten observar un comportamiento similar al de nitritos, es decir un aumento en sus niveles dependiente de la concentración de lectinas administradas. Se observa una caída en los niveles de catalasa del grupo "Inductor + extracto dosis de 7mg" posiblemente muestra el límite operacional del sistema antioxidante. La curva de extinción del grupo "Extracto dosis de 3.5mg" es demasiado abrupta, los niveles de catalasa bajan muy rápido, lo que nos inclina a pensar que se produjo un error experimental a la hora de re suspender la muestra lo que provocó una reacción retardada de la enzima. Una vez más el grupo "Extracto dosis de 7mg" Presenta un nivel alto de catalasa este resultado refuerza lo antes observado, la administración en dosis altas a individuos sanos produce un efecto toxico típico de las lectinas (Fu I.-I. C.-c.-y.-k., 2011). Sin embargo, los niveles de catalasa estaban muy elevados en el grupo "Inductor + Extracto dosis de 7mg" esto significa que a pesar de que las lectinas no elevaron los niveles de NO, si elevaron los niveles de H_2O_2 .

Conclusiones

- El método de extracción fue muy eficiente en concentrar las proteínas de nuestro interés y las lectinas, mantuvieron su actividad biológica.
- El rendimiento protéico del método de extracción para este tejido (hojas) fue muy bajo, tan solo del 0.43% del peso total del material vegetal fueron proteínas, aunque altamente concentradas.

- La actividad Hemoaglutinante del extracto fue más fuerte en las muestras del grupo sanguíneo O Rh+. Todos los grupos sanguíneos presentaron hemoaglutinación a la dosis de 2mg y los tres grupos presentaron una hemoaglutinación de grado 3 a la concentración de 7mg.
- La curva de dosis respuesta nos permitió evaluar la respuesta de un sistema murino de cáncer a diferentes concentraciones de lectinas, se estableció que la mejor respuesta se obtuvo al administrar una alta concentración (7mg/mL) del extracto protéico enriquecido en proteínas tipo lectina.
- El óxido de níquel es un inductor muy seguro para los humanos, aunque no tan fiable ya que cuenta con una tasa de inducción del 75% al 80%, genera principalmente carcinomas in situ, poco agresivos.
- La administración de proteínas tipo lectina de ruda, aumenta los niveles de nitritos, en individuos sanos.
- La administración de lectinas de ruda en altas concentraciones (7mg), incrementa los niveles de catalasa en tejido hepático en ratones con un proceso canceroso instalado y en ratones sanos
- La administración de un extracto de ruda enriquecido en proteínas tipo lectina a una dosis de 7 mg disminuye el tamaño de las lesiones cancerosas inducidas por NiO.

Conclusión general

El extracto de ruda enriquecido en proteínas tipo lectinas, aumenta los niveles de peróxido de hidrógeno en un modelo murino inducido a cáncer, al punto en que las lesiones cancerosas disminuyen en diámetro.

Los resultados implican al incremento en los niveles de la ERO peróxido de hidrógeno, provocado por la administración de lectinas, en la reducción del diámetro de los tumores cancerosos producidos por la inoculación de 20mg de NiO.

Un estudio posterior al presente, podría darse a la tarea de monitorear diferentes puntos en las vías de señalización de los procesos de autofagia y apoptosis, para poder determinar el mecanismo de acción específico de las lectinas de ruda en diferentes líneas de cáncer, con el fin de evaluar su posible uso como agente anticancerígeno o adyuvante en la recuperación de un paciente con cáncer.

Bibliografía

- Abdullaev, F. C.-V. (2005). Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de investigación clínica*, vol 57, 55-64.
- Büssing, A. A. (1998). Induction of apoptosis by the N-acetyl-galactosamine specific toxic lectin from *Viscum album* L. is associated with a decrease of nuclear p53 and Bcl-2 proteins and induction of telomeric associations. *Cancer Letters*, vol 27, 57-68.
- Christofori, G. K. (2006). Lymphatic vessels in cancer metastasis: Bridging the gaps. *Carcinogenesis*, vol 3, 1729-1738.
- Cold Spring Harbor Laboratory Press. (2006). *Cold spring Harbor Protocols*. Obtenido de Phosphate-buffered saline solution: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8247>
- da Rocha, A. B. (2001). Natural products in anticancer therapy. *Current opinion in pharmacology*, vol 1, 364-369.
- de Martel, C. F. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The lancet oncology*, vol 13, 607-615.
- Díaz, A. M. (1995). Carcinogenesis por óxido de níquel en 2 líneas de ratones consanguíneas. *Revista cubana de oncología*, vol 11, 1-3.
- Duffy, M. M. (2008). Cancer invasion and metastasis: Changing views. *J Pathol*, vol 214, 283-293.
- Earnshaw, S. H. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental cell research*, vol 256, 42-49.
- Eichhorn, J. M. (2014). Molecular analysis of functional redundancy among anti-apoptotic Bcl-2 proteins and its role in cancer cell survival. *Exp Cell Res*, vol 322, 415-424.
- Ellman, G. L. (1982). The Biuret reaction in the ultraviolet absorption spectra and its application to the determination of peptide bonds. *Analytical Biochemistry*, vol 3, 40-48.
- Fidler, I. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the seed and soil hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, vol 3, 453-458.
- Flores, G. L. (2012). *Evaluación de la citotoxicidad de lectinas de *Ruta graveolens* en células de cáncer de mama*. Mexico D.F. UNAM.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New england Journal of medicine*, vol 285, 1182-1186.

- Fu, B. I.-j.-k. (2009). Plygonatum cyrtonema lectin induces apoptosis and authophagy in human melanoma A375 cells trough a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 pathway, vol 275, *Cancer Cells*, 54-60.
- Fu, I.-I. C.-c.-y.-k. (2011). Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol 43, 1442-1449.
- Fundacion para la Excelencia y la Calidad de la Oncologia. (2009). *Generalidades en oncologia*.
- GLOBALCAN. (2012). *Cancer incidence and mortality: Worldwide*.
- Goodsell, D. (2004). *Catalase*. RCSB Protein Data Bank.
- Guevara, I. I.-K.-M. (1998). Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clinica Chimica Acta*, vol 274, 177-188.
- Gupta, G. &. (2006). Cancer metastasis: Building a framework. *Cell*, vol 127, 679-695.
- Halina, L. N. (2003). Lectins. *Kluwer Academic Publishers*, vol 282 2753-2764.
- Hanahan D, W. R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, vol 100, 57-70.
- Hengartner, M. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, vol 407, 770-776.
- Jhonstone, A. A. (2002). Apoptosis: A link between cancer, genetics and chemotherapy. *Cell*, vol 108, 235, 153-164.
- KSU. (2009). *Salting in, salting out, and dialysis of proteins, 1-5*.
- Lahti, E. B. (2004). Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung cancer metastasis. *Cancer Cell*, vol 5, 365-374.
- Lei-lei Fu, C. c.-y.-k. (2011). Plant lectins: Targeting programmend cell death pathways as antitumor agents. *The international journal of biochemistry & Cell Biology*, vol 44, 1442-1449.
- Li, W. w.-y.-I.-k. (2011). Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis forr cancer therapeutics. *Biochemical and biophysical research communications*, vol 414, 282-286.
- López, T. (2001). Papel de la angiogenesis en el crecimiento tumoral. *Revi Cubana Invest Biomed*, vol 20, 223-230.
- Machley, C. B. (1955). Assays of catalasses and peroxidases. *Methods in enzymology*, vol 2, 764-775.
- Mashima, T. T. (2005). Defects of the apoptotic pathway as therapeutic targets aganist cancer. *Drug rsistance updates*, vol 8,339-343.

- Massagué, J. (2009). Evolución y metástasis del cancer. *SEBBM*, vol 160, 22-25.
- Nagano, C. (Febrero de 2007). Estudios estructurales de lectinas de algas marinas y de vegetales superiores. Valencia, España: Universidad de Valencia.
- Nagano, S. C. (2007). *Estudios Estructurales de Lectinas de Algas Marinas y de Vegetales Superiores*. Valencia: Instituto de Biomedicina de Valencia.
- Naveda-Gonzalez, G. (2010). Proyecto previo a la obtención del título de ingeniero agroindustrial. *Establecimiento de un proceso de obtención de extracto de ruda (Ruta graveolens) con alto contenido de polifenoles*. Quito, Ecuador: Escuela politecnica nacional facultad de ingeniería química y agroindustria.
- Onard, S. A. (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters*, vol 266, 6-11.
- O'Reilly, M. H. (1997). Endostatin an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, vol 88, 277-285.
- Paget, S. (1889). the distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The lancet*, vol 133, 571-573.
- Parvin, R. S. (1965). On the colorimetric Biuret method of protein determination. *Analytical biochemistry*, vol 12, 219-229.
- Pelicano, H. D. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug resistance updates*, vol 61, 97-110.
- Perez, G. &. (1999). Extracción, purificación y caracterización de dos lectinas en semillas de *Dioclea sericea*. *Revista academica Colombiana*, vol 23, 445-454.
- Putnam, A. L. (1971). Sensitive Biuret method for determination of protein in an impure system such as whole bacteria. *Analytical biochemistry*, vol 44, 239-245.
- Reuter, S. S. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free radical biology & medicine*, vol 49, 1603-1616.
- Sapan, C. V. (1999). Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol. Appl. Biochem*, vol 29, 99-108.
- Stamenkovic, I. B. (2008). Metastatic cancer cell. *Annu Rev Pathol*, vol 3, 221-247.
- Steege, P. S. (2006). Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*, vol 25, 895-904.
- Stuehr, D. J. (1987). Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon-gama. *The journal of immunology*, vol 139, 518-525.

- Toyokuni, S. (1998). Oxidative stress and cancer: The role of redox regulation. *Biotherapy*, vol 11, 147-154.
- Trachootham, D. Y. (2006). Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS mediated mechanism by *trans*-phenylethyl isothiocyanate. *CANCER CELL*, vol 10, 241-252.
- VALE. (25 de 11 de 2010). Nickel Oxide Safety Data Sheet. *Nickel Oxide*.
- Valko, M. C. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, vol 160, 1-40.
- Vargas, J. (2009). Actividad hemoaglutinante e identificación de lectinas del árbol del Neem *Azadirachta indica*. San Nicolás de Hidalgo, Michoacan, México: Universidad Michoacana.
- Weinberg, R. H. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, vol 100, 57-70.
- Zoltan, N. O. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, vol 64, 609-619.

Apéndice de fórmulas

Buffer PBS pH 7.4

Para un litro de Producto:

- Disolver 8 g de NaCl en 800 mL de H₂O destilada
- Una vez disuelto, agregar y disolver 0.2 g de KCl
- Posteriormente agregar 1.44 g de Na₂HPO₄
- Al final, disolver 0.24 g de KH₂PO₄

Determinar el pH, de ser mayor al deseado se debe ajustar a 7.4 añadiéndole gotas de HCl una a la vez, al obtener el pH deseado se debe completar el volumen a 1 L con H₂O.

Reactivo de Biuret

Para un litro de reactivo

- Disolver 200 g de NaOH en 450 mL de H₂O
- Una vez disuelto el hidróxido de sodio, disolver 2.5 g de CuSO₄·5H₂O

Se completa el volumen a 1000 mL de agua destilada.

Reactivo de Griess

Solución A

- Disolver 0.1 g de N-1-naftiletildiamina (NED) en 120 mL de H₂O destilada calentándola

Solución B

- Dejar enfriar y agregar 30 mL de ácido acético glacial, filtrar y guardar en frío.

Si cualquiera de las soluciones se torna colorida, agitar con 0,5 g de zinc en polvo y filtrar, al momento de utilizar el reactivo, mezclar ambas soluciones y guardar en un frasco ámbar.