



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“EFECTO DE LAS LECTINAS DE MEZQUITE

(*Prosopis laevigata*)

EN LA REGULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN

RATONES

HEMBRA CD1 TRATADOS CON ÓXIDO DE NIQUEL (NiO)”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

HERNÁNDEZ DÍAZ ELIZABETH MONTSERRAT

DIRECTORA DE TESIS

M. EN C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis maestros que durante mi largo camino me han enseñado a que la vida es una de las formas de aprender y saber a resolver problemas, a alentarme a seguir mi camino del saber por mas veces que haya caído.

Agradezco a mis maestros, a Catalina Machuca y al profesor Ernesto Mendoza por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio de investigación, por compartir sus conocimientos, por siempre creer en mí y en mi capacidad de investigación, por su paciencia, por el tiempo compartido y sobre todo por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles en la realización de esta tesis.

Agradezco al Dr Benny Weiss, a la M. en B.R. Judith, al M. en B.E. Enrique Mendieta y la M. en C. Véronica Mitsui por compartir sus conocimientos, guiarme y apoyarme durante la realización de esta tesis para mejorar constantemente como investigadora.

Gracias a mis amigos que me apoyaron en los momentos más felices y difíciles y sobre todo por siempre brindarme sus consejos y esas palabras de aliento.

Gracias a mis papas por guiarme y apoyarme a lo largo de mi formación como persona y como profesionista y sobre todo a ser constante y perseverante.

DEDICATORIAS

Esta tesis está dedicada a mis papas, a mi hermano, a mis tíos, amigos y los maestros Catalina Machuca, Ernesto Mendoza, a mis sinodales y a Luis Meza porque siempre creyeron en mí, me apoyaron incondicionalmente durante mi formación como persona y como profesionalista.

Gracias mama por tu ejemplo de perseverancia y fortaleza, por apoyarme y quererme incondicionalmente, por siempre mostrar mis debilidades y mis virtudes y fortalecerlas, por estar conmigo en los momentos felices y amargos, a enseñarme a nunca darme por vencida y además por siempre creer en mí e impulsarme a cumplir mis metas. Y aunque ya no estés conmigo en donde quiera que te encuentres siento tu apoyo, y siempre seguiras en mis recuerdos, te amo.

Gracias a mi papa Luis Hernández Rivera y mi hermano Luis Daniel Hernández Díaz porque a pesar de las diferencias y problemas se que cuento con su apoyo.

Gracias a mis tíos Luis Arturo Díaz y Mario Díaz Baez, por sus consejos, por siempre apoyarme en los duros momentos y en las noches de desvelos y estar a mi lado incondicionalmente. A mi tia María Isabel Díaz Báez, Rafael Velazquez por sus cuidados y atenciones y por apoyarme en los momentos difíciles.

Gracias a todos mis amigos Paty Patricio, Anita Joaquín, Verónica Juárez, Inés Góngora, Pedro Arias, Elizabeth Rivera y Uriel Gomez: amigos incondicionales que me apoyaron en los momentos difíciles y han compartido momentos maravillosos conmigo, gracias por siempre estar ahí y a las personas que me encontré en mi camino y ya no están a mi lado, de las cuales aprendí que en la vida hay altas y bajas y que los errores siempre nos enseñan a ser mejores seres humanos.

Y sobre todo gracias Dios, por los momentos felices y difíciles de mi vida, por siempre escucharme y apoyarme, por velar a mi lado en las noches más duras de mi vida, por guiarme siempre en el camino correcto y por ser el hombro donde me podía apoyar en las horas de debilidad.

INDICE GENERAL

Resumen	1
I.-Introducción	2
II.- Marco teórico	3
2.1. Lectinas	3
2.2. Estructura y clasificación de lectinas	3
2.3. Lectinas vegetales.	4
2.3.1. Efectos antinutricios de las lectinas vegetales	8
2.3.4. Efecto antitumoral de las lectinas vegetales	10
2.4. Mezquite (<i>Prosopis laevigata</i>)	12
2.4.1. Clasificación científica	12
2.4.2. Descripción morfológica	13
2.4.3. Origen, distribución y extensión	13
2.4.4. Usos y propiedades medicinales	14
2.4.5. Principios activos	15
2.4.6. Acción farmacológica	16
2.5. Estrés oxidativo	17
2.5.1. Definición, fuentes y origen	17
2.5.2. Vías de señalización y su relación con el estrés oxidativo	18
2.5.3. Radicales Libres (RL)	19
2.5.4. Nitritos (NO ₂ ⁻) : Fuentes y biotransformación	22
2.5.5. Generación de enfermedades. Cáncer: relación con el estrés oxidativo y la toxicidad de metales	23
2.5.5.1. Níquel	25
2.5.5.2. Homeostasis de níquel, esencialidad y toxicidad	26
2.5.5.3. Estrés oxidativo y níquel inducen carcinogénesis	27
2.5.5.4. Níquel induce activación de factores de transcripción	28
2.6. Procesos de detoxificación (enzimáticos y no enzimáticos)	29
2.6.1. Mecanismos no enzimáticos	29
2.6.2. Mecanismos enzimáticos	30
2.6.3. Catalasa	31
2.6.3.1. Función de catalasa	33
III.- Justificación	34
IV.- Hipótesis	35
V.- Objetivos	35
5.1. Objetivo general	
5.2. Objetivos particulares	

VI.- Métodos	36
6.1. Obtención de material vegetal	36
6.2. Procesos de extracción y semipurificación	36
6.2.1. Extracción salina de lectinas	36
6.2.2. Diálisis	36
6.2.3. Cromatografía de afinidad	37
6.2.4. Cuantificación de proteínas. Método de Biuret	37
6.3. Pruebas de hemaglutinación	37
6.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE)	38
6.5. Diseño experimental	38
6.5.1. Inducción a proceso carcinogénico mediante el tratamiento de NiO y de extracto enriquecido de lectinas de hoja de <i>Prosopis laevigata</i> en ratones hembra CD1	38
6.6. Extracción de plasma sanguíneo	39
6.7. Obtención de tejidos	39
6.8. Determinación de marcador de estrés oxidativo y defensa enzimática antioxidante	39
6.8.1. Determinación de nitritos: Método de Griess	39
6.8.2. Determinación de Catalasa (CAT)	40
6.8.3. Análisis estadístico	40
VII.- Resultados	41
7.0. Procesos de extracción y semipurificación	41
7.1. Cuantificación total de proteínas	42
7.2. Pruebas de hemaglutinación	42
7.2.1. Pruebas de hemaglutinación (120-5 mg/ml)	42
7.3. Electroforesis SDS-PAGE	45
7.4. Efecto del óxido de níquel en ratones hembra CD1	46
7.5. Efecto de lectinas de hoja <i>Prosopis laevigata</i> en el análisis macroscópico de bazo e hígado de ratones hembra CD1 tratados con óxido de níquel	47
7.6. Determinación de marcador de estrés oxidativo: concentración de nitritos en hígado de ratones hembra CD1	50
7.6.1. Determinación de la concentración de nitritos en plasma sanguíneo de ratones hembra CD1	51
7.7. Cuantificación permanganométrica de la actividad de catalasa en hígado de ratones hembra CD1	53
VIII.- Discusión	54
IX.- Conclusiones	67
X.- Bibliografía	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de tres plantas de lectinas representativas.	-----	5
Figura 2. Representación esquemática de las estructuras tridimensionales en lectinas vegetales.	-----	7
Figura 3 . Morfología de <i>Prosopis laevigata</i> (mezquite).	-----	12
Figura 4. Iones metálicos y EROS inducen a las vías de señalización.	-----	19
Figura 5. Representación metabólica de las EROS.	-----	21
Figura 6. Modelo de los 3 estados de la carcinogénesis y el nivel del efecto carcinogénico contra el nivel de radicales libres en los distintos estados del proceso carcinogénico.	-----	25
Figura 7 .Estructura general de catalasa.	-----	32
Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE al 12% en el análisis de muestras en los diferentes procesos de semipurificación desde extracción salina (fracción no semipurificada) – cromatografía de afinidad.	-----	46
Figura 9. Efecto del óxido de níquel en ratones hembra CD1.	-----	47
Figura 10. Efecto tóxico de lectinas de <i>Prosopis. laevigata</i> y su análisis macroscópico de bazo e hígado en ratones hembra CD1 Tratados con óxido de níquel.	-----	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Lectinas vegetales utilizadas para el estudio de glicoproteínas y su clasificación según sus especificidades hacia monosacáridos.	8
Cuadro 2.. Mecanismos de acción de lectinas vegetales en diferentes células malignas in vitro e in vivo.	11 - 12
Cuadro 3. Relación de lectinas muérdago coreano y mezquite en los efectos (antioxidantes) y/o mecanismo de acción de lectinas.	17
Cuadro 4. Principales EROS y ERN. Formula química y localización celular.	21
Cuadro 5. Mecanismo no enzimático.	29
Cuadro 6 . Mecanismo enzimático.	30
Cuadro 7. Pruebas de hemaglutinación con concentración de 120 mg/ml.	42
Cuadro 8. Pruebas de hemaglutinación con concentración de 80 mg/ml.	43
Cuadro 9. Pruebas de hemaglutinación con concentración de 40 mg/ml.	43
Cuadro 10. Pruebas de hemaglutinación con concentración de 20 mg/ml.	44
Cuadro 11 . Pruebas de hemoaglutinación con concentración de 10 mg/ml.	44
Cuadro 12. Pruebas de hemoaglutinación con concentración de 5 mg/ml.	45

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Concentración de proteínas en las diferentes fracciones proteicas de <i>P. laevigata</i> y su variación proteica en cada uno de los procesos de semipurificación.	----- 41
Gráfica 2: Efecto de lectinas de hoja de <i>Prosopis laevigata</i> contra el peso (g) de bazo de ratones hembra CD1 tratados con óxido de níquel.	-----48
Gráfica 3: Efecto de lectinad de hoja de <i>Prosopis laevigata</i> en el peso (g) hígado do de ratones hembra CD1 tratados con óxido de níquel	-----49
Gráfica 4. Cuantificación de la concentración de nitritos en hígado de ratones hembra CD1 en los grupos evaluados.	----- 50
Gráfica 5. Cuantificación de la concentración de nitritos en plasma sanguíneo de ratones hembra CD1 en los grupos evaluados.	-----52
Gráfica 6. Cuantificación permanganométrica decatalasa (U de catalasa / mg de proteína) en hígado de ratones hembra CD1.	-----53

ÍNDICE DE MAPAS

Mapa 1. Distribución de las diferentes especies de <i>Prosopis spp.</i> Y de <i>P. laevigata</i> en la República Mexicana.	----- -14
--	-----------

ABREVIATURAS

- **RL:** Radicales Libres
- **CD1:**Cepa de ratones no consanguíneos
- **KDa:** Kilodaltons
- **SDS-PAGE:** Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico
- **epCAM:** Molécula de Adhesión Celular Epitelial
- **NLS:** Señal de Localización Nuclear
- **Orp-150 truncada:** Proteína Regulada por Oxígeno de 150 kDa
- **HeLa:** Tipo Particular de Células de Cultivo Celular de Cáncer Cérvico-uterino
- **EROS:** Especies Reactivas de Oxígeno
- **ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- **REDOX:** Reacción de Oxido-Reducción
- **SOD:** Superóxido Dismutasa
- **NFκB:** Factor Nuclear kappa beta
- **AP-1:** Proteína Activadora I
- **MAPK:** Mitogeno Activado por Proteínas Quinasas
- **PI3-quinasa:** Fosfoinositol 3-Quinasas o Fosfoinositida-3-Quinasas
- **CAP-1:** Proteína de Adhesión Celular 1
- **p53:** Proteína Tumoral 53. Guardián del Genoma
- **HIF-1:** Factor 1 Inducible por Hipoxia
- **NAFT:** Factor Nuclear de Células T Activadas
- **RLO:** Radicales Libres de Oxígeno
- **NADH:** Nicotinamida Adenín Dinucleótido Oxidorreductasa
- **ERN:** Especies Reactivas de Nitrógeno
- **UV:** Ultravioleta
- **ATF-1:** Factor de Transcripción Activado 1
- **CREB:** Respuesta de cAMP Elemento de Unión "es una Proteína que Actúa Como factor de Transcripción.
- **cAMP:** Proteína Molecular de Adhesión c
- **Fe(II):** Hierro 2
- **CoQ10:** Coenzima Q 10
- **NO:** Oxido Nítrico
- **NOS:** Oxido Nitrico Sinteasa
- **Ca (II):** Calcio II
- **NiO:** Óxido de Níquel
- **Kg:** kilogramo
- **Ni₃S₂:** Sulfuro de níquel (III)
- **NiCl₂:** Cloruro de níquel
- **(ML-I):** Lectina-I de muérdago
- **(Con A):** Concaivalina A
- **(PCL):** Lectina de Polygonatum crytonema
- **GNA:** familia de la Lectina Galantus nivalis
- **(GalNAc):**N-acetil-D-galactosamina
- **ARNm:** Ácido Ribonucleotido mensajero
- **Molt- 4:** Línea Celular de Leucemia Linfoblástica Aguda Humana
- **Mn:** Manganeseo
- **Mg:** Magnesio
- **ml:** Mililitros
- **mg:** Miligramos

- g: Gramos
- μM : Micromolar
- μL : Microlitros
- PHA: *Phaseolus vulgaris*
- RCA: *Ricinus comunis*
- VCA: *Viscum álbium coloratum*
- INOS: Óxido Nítrico Sintasa Inducible
- ONOO \cdot : Peroxinitrito
- H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno
- $\cdot\text{O}_2^-$: Oxígeno Singlete
- OONO \cdot : Anión Peroxinitrito
- OCl \cdot : Ión Hipoclorito
- MPO: Enzima Mieloperoxidasa
- NO₂ \cdot : Nitrito
- 8-OHG: 8-hidroxiguanosina
- ERN: Especies Reactivas de Nitrógeno
- GPx: Glutation Peroxidasa
- HEC: Catalasa de Eritrocitos Humanos
- HepG₂: Línea Celular de Tumor Hepático Humano
- UCAT: Unidad de Actividad de Catalasa
- G1-G5: Grupo 1 – Grupo 5
- HCT116: Línea Celular de Carcinoma Epitelial Colorrectal
- HCT116-FM6: Línea Celular de Carcinoma Colorrectal Expresado en MUC-1 Epitelial
- MUC-1: Célula de Superficie Asociada a Mucina-1
- CaCo: Línea Celular de Adenocarcinoma Colorrectal
- MDA-MP435: Línea Celular de Carcinoma de Mama Ductual
- NaCl: Cloruro de Sodio
- ABO: Alelos ABO de los Grupos Sanguíneos
- GSHm: Glutation Monoetilester
- TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa
- NAC: N-acetilcisteína
- NO₃ \cdot : Nitrato
- LCA: *Lens culinaris*
- SBA: *Glycine max*
- PNA: *Arachis hypogaea*
- ALL: *Amaranthus leucocarpus*
- WGA: *Triticum vulgare*
- LTA: *Lotus tetragonolobus*
- UEA: *Ulex europeus*
- LPA: *Limulus polyphemus*
- ABA: *Aglutinina Agaricus bisporus*
- CRA: Aglutinina Relacionada con Quinasa
- CV-N: N- cyanovirina
- EEA: Aglutinina *Euonymus europeus*
- JAC: Jacalinas
- CPL: Lectina de *curcivitaceae pholoem*
- PHA-L: Lectina de *Phaseolus vulgaris*
- VFA: *Vicia faba*
- TMA: *Triholoma mongolicum*
- GS-1: *Griffonia simplicifolia*
- KML-C: Lectina de Muérdago Coreano (*Viscum álbium coloratum*)
- OH \cdot : Radical Hidroxilo
- RO \cdot : Radical Alcoxil
- ROO \cdot : Radical Peroxil
- H₂O: Agua
- PBS: Buffer Fosfato Salino
- CAT: Catalasa

RESUMEN

Prosopis laevigata (mezquite) es un árbol o arbusto perteneciente a la familia de Leguminosae de importancia etnobotánica y fitoquímica por sus propiedades antipiréticas, antivomitivas, antibacterianas, antiinflamatorias y antitumorales. Fitoquímicamente se compone de diversas sustancias químicas entre las que resaltan las lectinas por sus efectos citotóxicos, antiproliferativos, hemaglutinantes, antitumorales y efectos protectores contra el estrés oxidativo tanto *in vivo* como *in vitro*. Estas lectinas se obtienen de diversas plantas tales como *Ricinus communis* (RCA), *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Canavalina ensiformis* (Con A), *Prosopis juliflora*, *Viscum album* (VCA), entre otras. De acuerdo a lo anterior, el objetivo general de nuestro estudio fue evaluar la actividad antioxidante de lectinas de *Prosopis laevigata* en un modelo de cáncer murino.

Las lectinas se obtuvieron a partir de hojas de *Prosopis laevigata*, mediante una extracción salina al 10% en una proporción 1:3 m/v, diálisis en una membrana de 3kDa y se purificaron por cromatografía de afinidad en una columna de silica gel. Se evaluó la actividad hemaglutinante de lectinas de hoja de mezquite en suero humano de los grupos sanguíneos ABO⁺ a diferentes concentraciones (5 -120 mg/ml). Así como el efecto sobre la concentración de nitritos y la actividad de catalasa *in vivo* en ratones hembra CD1 tratados con NiO a los que se les proporcionaron por vía oral extractos de hoja de mezquite a tres diferentes concentraciones (40, 80 y 120 mg/kg/ml) durante cuatro semanas. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento del extracto de lectinas de hoja de mezquite disminuye la concentración de nitritos en plasma sanguíneo y en hígado, y aumentó la actividad de catalasa en hígado de ratones hembra tratados con NiO. En consecuencia el extracto enriquecido con lectinas de *Prosopis laevigata*, ejerce efecto en la actividad antioxidante en un modelo de cáncer murino.

I. INTRODUCCION

Actualmente el mezquite, al igual que muchas otras plantas medicinales, sigue siendo utilizado como tratamiento terapéutico en diversas enfermedades, actuando como antiinflamatorio, astringente y antihelmíntico. Recientes estudios han documentado sus efectos como citotóxico, antiproliferativo y hemaglutinante en diversos tipos celulares de cáncer, donde han sido identificadas una gran cantidad de componentes bioactivos, entre los que destacan las lectinas (Kyung, *et.al.*2010).

El estrés oxidativo se produce cuando se rompe el balance entre las sustancias pro y antioxidantes presentes en los organismos, favoreciéndose la producción y permanencia de los Radicales libres (RL), como el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y sus metabolitos estables, como nitratos (NO_3^-) y en especial los nitritos (NO_2^-). Su desbalance e incremento provocan diversos estados fisiopatológicos (Castell y Pérez de Alejo, 2000), como el cáncer, donde la desregulación de la homeostasis REDOX (reducción-oxidación), mediante el inicio de una inducción aberrante de las redes de señalización, promueve la carcinogénesis inducida por la exposición al níquel, comprobado como un inductor de tumores en modelos *in vivo*. En este sentido, el presente estudio tiene como objetivo central la evaluación del efecto de las lectinas de la hoja de mezquite (*Prosopis laevigata*), en la concentración de nitritos en ratones hembra CD1 tratados con óxido de níquel (NiO), ya que las lectinas de una gran variedad de organismos vegetales son reconocidas por su efecto citotóxico sobre células cancerosas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. LECTINAS.

Las lectinas (del latín “legere” que significa “escoger o seleccionar”, antes llamadas hemaglutininas) son un grupo de proteínas o glicoproteínas que reconocen de manera específica carbohidratos de la superficie celular o en suspensión, aglutinan células y precipitan glicoconjugados; las lectinas poseen por los menos dos sitios de reconocimiento a carbohidrato, un carbohidrato específico o una molécula glicosilada, de ahí su capacidad para aglutinar células (Castillo y Abdullaev, 2005, Hernández y col., 2005, Sharon y Lis, 2004).

Una de las principales funciones de las lectinas es el reconocimiento celular mediante la unión de las estructuras pares complementarias en la superficie de las células y en solución. La precipitación de glicoconjugados forma parte de conjugados como lectina-lectina, lectina-enzimas y lectina-anticuerpos (Hernández, y col., 2005).

Las lectinas poseen diversas propiedades biológicas, tales como aglutinación de eritrocitos y otras células como linfocitos, espermatozoides, plaquetas y bacterias, así como la inducción de mitosis y efectos citotóxicos en linfocitos, aglutinación de virus y otras.

Las lectinas están presentes en casi todo lo vivo, pues se han encontrado en el reino vegetal, animal y en microorganismos. En el reino animal se han encontrado en invertebrados, tales como crustáceos, lombrices y gasterópodos (Hernández, y col., 1999).

2.2 ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE LECTINAS

Las lectinas están compuestas por una cadena polipeptídica en la cual pueden estar unidos uno o más residuos de carbohidratos, normalmente de 2 a 15 monosacáridos residuales, es interesante hacer notar que existe sólo un grupo limitado de azúcares que las lectinas de plantas reconocen, que incluye a los monosacáridos D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, L-fucosa (6-deoxi-L-galactosa) y a dos azúcares aminados que son el N-acetil-D-glucosamina y el N-acetil-D-galactosamina y a los ceto azúcares D-fructosa y L-sorbosa.

Se han encontrado lectinas en una gran diversidad de seres vivos, por lo que pueden clasificarse de la siguiente manera (Lis y Sharon, 1998):

- **Lectinas animales**
- **Lectinas microbianas**
- **Lectinas vegetales (Fu *et al.* 2011).**

2.3 LECTINAS VEGETALES

Las lectinas vegetales se encuentran en mayor concentración en las semillas y tejidos de almacenamiento, constituyendo entre el 2 al 10% de las proteínas, principalmente en las semillas de leguminosa. Estas proteínas en semillas se localizan principalmente en los cuerpos proteicos de las células de los cotiledones y en menor cantidad en hojas, raíces y tallos, lo cual sugiere que las lectinas juegan un papel fisiológico importante en las plantas (Liener, 1976; Etzler, 1985; Chrispeels y Raikhel, 1991).

De acuerdo a Rudiger y Rouge (1998), estructuralmente existen características comunes entre las lectinas de una familia determinada, lo que ha permitido el estudio de la interacción lectina- carbohidrato. Por lo cual las lectinas vegetales suelen clasificarse de tres formas, la primera: la especificidad hacia el monosacárido que inhibe su actividad hemaglutinante y hacia las estructuras oligosacáridicas que reconocen, además de lectinas que reconocen N-glicanos (que son oligosacáridos unidos a un residuo de asparagina en las proteínas mediante una N-acetilglucosamina) y lectinas que reconocen a los O-glicanos (que son oligosacáridos unidos a un residuo de serina o treonina en las proteínas mediante una N-acetilgalactosamina) (Hernández, *y col.* 2005) (Figura 1).

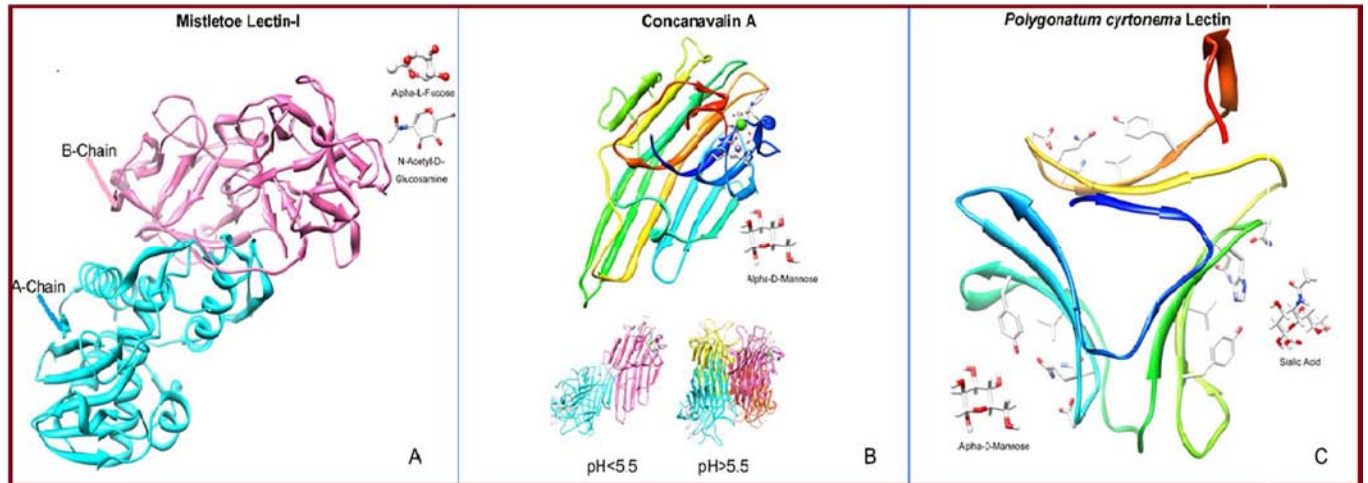


Figura 1: Estructura molecular de tres plantas de lectinas representativas: A) Lectina-I de muérdago (ML-I), lectina representativa de la familia de lectinas de Ricina-B; B) Concanalina A (Con A), la lectina representativa de leguminosa; C) Lectina de *Polygonatum crytonema* (PCL), la lectina representativa de la familia de lectina GNA. (Tomada y modificada de Fu *et. al.* 2011).

La segunda clasificación se basa en la estructura molecular de lectinas vegetales, la cual tiende a reemplazar a la clasificación basada en la especificidad hacia monosacáridos y en la cual se pueden distinguir seis familias de lectinas (Figura 2):

1. Lectinas aisladas de leguminosas. Es la familia de lectinas vegetales más estudiada, generalmente se encuentran constituidas por dos o cuatro subunidades idénticas de 25 a 30 kDa. Cada una de las sub-unidades contiene un sitio de unión para iones metálicos Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} . Una subunidad contiene aproximadamente 250 aminoácidos y presenta una gran homología con las otras subunidades. Está constituida por doce hojas β antiparalelas conectadas entre sí mediante α -hélices, lo que genera una estructura aplanada en forma de domo (Figura 2: 3-1), cuatro hélices localizadas en la parte superior del monómero que forma el sitio de reconocimiento a carbohidratos.

2. Lectinas con dominios tipo heveína o específicas de quitina (Figura 2: 3-2). Los miembros de esta familia generalmente presentan dos subunidades idénticas, ricas en cisteínas contrariamente a las lectinas de leguminosas. Una subunidad está constituida por cuatro dominios tipo heveína, conteniendo cuatro puentes disulfuros, lo cual origina que no existan estructuras secundarias regulares a excepción de una pequeña α hélice de cinco residuos, cada dominio presenta un sitio de reconocimiento a carbohidrato, que no necesita la presencia de iones metálicos. (Rudiger y Rouge, 1998).

3. Lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa. A este grupo de lectinas pertenecen las de orquídeas, ajo y amarilis, con secuencias de aminoácidos altamente conservadas. Estas lectinas son tetraméricas, cada monómero tiene un peso molecular de 12 kDa, así como una secuencia de 36 aminoácidos repetidas tres veces. El sitio de reconocimiento a carbohidrato está constituido por cuatro hojas β antiparelelas unidas entre sí por giros (Figura 2: 3-3). El conjunto se asocia de manera que forma una corona aplanada, dejando aparecer un gran túnel central.

4. Lectinas en forma de prisma β o del tipo jacalina. En este grupo, se encuentran lectinas vegetales, que presentan estructuras tridimensionales muy similares a la de *Artocarpus integrifolia* (jacalina). Son lectinas tetraméricas glicosiladas, donde cada sub-unidad contiene una cadena pesada (α) y una cadena ligera (β) y está constituida por tres hojas β antiparelelas arregladas a manera de un prisma triangular (Figura 2: 3-4).

5. Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas (Figura 2: 3-5). Estas proteínas forman parte de los venenos más tóxicos. Su estructura molecular es compleja. Están constituidas por dos cadenas, la A y B, las cuales son diferentes y se encuentran unidas por dos puentes disulfuro. La cadena A es la responsable de la toxicidad (actividad de N-glicosidasa sobre el ribosoma que inactiva la traducción), mientras que la cadena β posee la actividad de lectina. La cadena β está constituida por dos dominios que presentan cuatro sub-unidades, las cuales contienen α -hélices y hojas β (Rudiger y Rouge, 1998).

6.-Lectinas tipo amaranto. Dentro de este grupo se encuentran lectinas provenientes de distintas especies de amaranto, entre las que destacan *Amaranthus caudatus* y *Amaranthus leucocarpus*. Cada proteína se encuentra formada por dos monómeros en los que existen dos dominios N y C, unidos por una pequeña hélice 103, cada dominio muestra una conformación de trébol β semejante a la conformación observada en la cadena β de la lectina de *Ricinus communis* (Figura 2: 3-6).

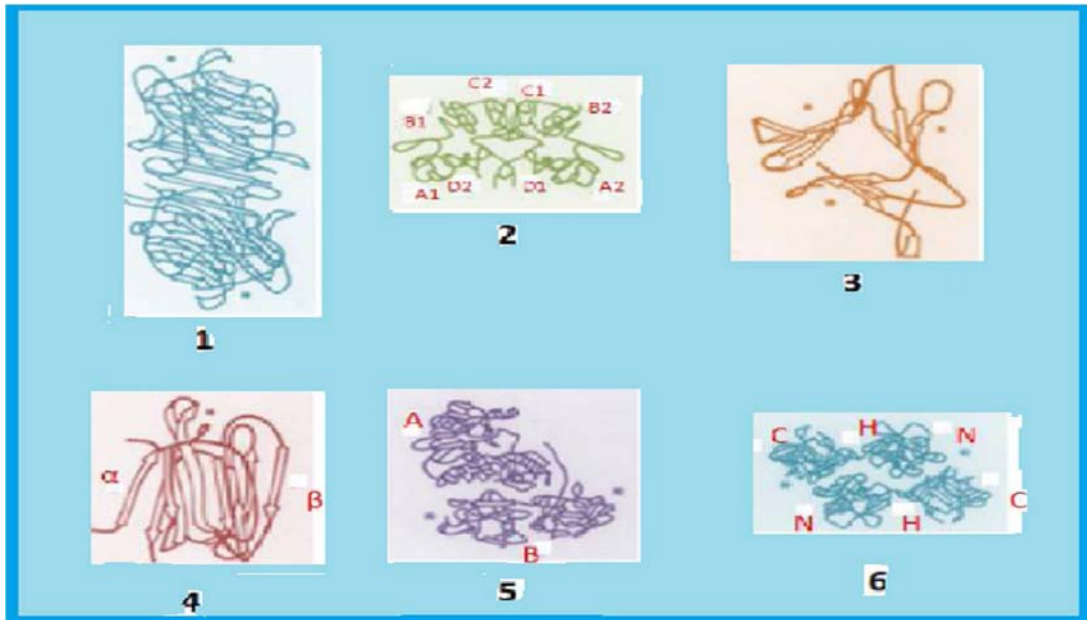


Figura 2: Representación esquemática de las estructuras tridimensionales en lectinas vegetales. Lectinas aisladas de leguminosas (1) con su sitio de unión al carbohidrato (*), lectinas con dominio tipo heveína, en donde cada uno de los dominios son representados con letras de la A-D, mismos que tienen un sitio de reconocimiento a carbohidrato (2), lectinas aisladas de monocotiledóneas, específicas de manosa (3), lectinas con estructura tipo prisma β (4), lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas (5), lectinas tipo amaranto (6) (Tomada y modificada de Rudiger y Rouge, 1998).

Y actualmente de acuerdo al Fu. *et .al*, (2011) se estableció una nueva clasificación, a partir de sus diferentes especificidades a unión de carbohidratos (cuadro 1):

Cuadro 1: Lectinas vegetales y su clasificación de acuerdo a las diferentes especificidades a unión de carbohidratos (Fu. *et.al.* 2011).

Familia	Lectina representativa	Abreviatura	Azúcar de unión específica
<ul style="list-style-type: none"> Homólogos de aglutinina <i>Agaricus bisporus</i> 	Aglutinina <i>Agaricus bisporus</i>	ABA	Galactosa
<ul style="list-style-type: none"> Clase V quitinasa homólogos con actividad de lectina 	Aglutinina relacionada con quitinasa	CRA	N-glicanos con alta manosa
<ul style="list-style-type: none"> Familia cyanovirina 	N-cyanovirina	CV-N	Manosa
<ul style="list-style-type: none"> Familia EEE 	Aglutinina <i>Euonymus europaeus</i>	EEA	Manosa/Galactosa
<ul style="list-style-type: none"> Familia GNA 	Aglutinina <i>Polygonatum crytonema</i>	PCL	Manosa/ácido siálico
<ul style="list-style-type: none"> Proteínas con dominios de haveínas 	Aglutinina con germen de trigo	WGA	N-acetil-d-glucosamina
<ul style="list-style-type: none"> Jacalinas 	Jacalinas	JAC	Manosa
<ul style="list-style-type: none"> Proteínas con dominios lectina de leguminosas Con dominio de LysM 	Concavalina A	Con A	D-manosa
<ul style="list-style-type: none"> Familia Nictaba 	Lectina de <i>Cucurbitaceae phloem</i>	CPL	
<ul style="list-style-type: none"> Familia ricina-B 	Lectina de muérdago europeo	ML-I	B-galactosa

2.3.1. EFECTOS ANTINUTRICIOS DE LAS LECTINAS VEGETALES

La especificidad que poseen las lectinas ha desencadenado numerosas aplicaciones en la ciencia de la medicina experimental básica utilizando diferentes rutas de administración (Hernández, y *col.*, 2005). No obstante, se han considerado como factores antinutricios, ya que estas son capaces de sobrevivir a través del tracto gastrointestinal para ejercer su

actividad biológica es necesario considerar que muchas lectinas son tóxicas y/o inflamatorias, por lo que no sorprende que la ingestión de éstas algunas veces cause envenenamiento (Freed, 1999). Muchos de los efectos tóxicos de las lectinas son dependientes de su interacción con la flora intestinal (Rhodes, 1999), debido a que dichas proteínas son resistentes a la digestión, lo que puede causar lesiones e interferencia con la absorción de nutrientes (Tareq al-Ati, 2001). En estudios *in vivo* e *in vitro* principalmente presentes en la familia de las leguminosas se ha observado que muchas lectinas son tóxicas en células de mamíferos, ya que se unen a las glicoproteínas del tracto gastrointestinal, por lo que pueden interferir reduciendo el crecimiento celular, deteriorando la integridad del epitelio intestinal, afectando la absorción y la utilización de los alimentos (Lajolo y Genovese, 2002; González de Mejía y Prisecaru, 2005 y Hernández y col., 2005).

Diferentes vías de administración tanto oral como intraperitoneal principalmente de lectinas pertenecientes a la familia de las leguminosa han comprobado que dosis por arriba de 200 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal presentan una disminución significativa del peso, inflamación abdominal severa y crecimiento hiperplásico del intestino; estos efectos son dependientes de las concentraciones de lectina, sin embargo para lectinas de mezquite no existen estudios que presenten los efectos antinutricios de lectinas tanto *in vitro* como *in vivo* y los cambios anatómicos que estos puedan provocar, los más importantes se producen y se citan solo en las lectinas de la familia legumonisae, principalmente para el Frijol Tepari afectando el timo y el bazo, provocando una disminución significativa de su peso y el incrementó en el tamaño del bazo que pudiera deberse a un estímulo de linfocitos requeridos por el sistema de defensa del cuerpo para contrarrestar la administración intraperitoneal de la lectina de frijol Tépari (Reynoso, R., González de Mejía, E. y Loarca-Piña, G. , 2003). Para concentraciones relativamente bajas de lectinas de leguminosas en pruebas *in vivo*, órganos como hígado, corazón, estomago, timo y bazo, no muestran alteraciones histopatológicas y de peso tanto en hembras como en machos de ratas Sprague- Dawley, pero riñones presentan alteraciones en el peso a concentraciones bajas (5 mg/ kg de peso) en la administración oral de Frijol Tepari.

2.3.2. EFECTO ANTITUMORAL DE LAS LECTINAS VEGETALES

A partir de 1999 se han reportado diferentes estudios que permiten entender más el mecanismo de acción a nivel molecular de las lectinas de plantas en relación con su efecto antitumoral. De acuerdo a Rambaruth y Dwak (2011), las lectinas pueden ser capaces del reconocimiento de patrones de glicosilación de proteínas de superficie que regulan la transducción de señales intracelulares; se conocen tres mecanismos para explicar el efecto antitumoral de las lectinas que van desde un nivel bioquímico y molecular (Cuadro 2):

1. Inhibición de proliferación no asociado a la citotoxicidad, posible interacción con la molécula de adhesión epCAM.
2. Afectación en el proceso de división celular a través de la inhibición de la proliferación, ya que se internalizan y selectivamente bloquean la importación de proteínas nucleares dependientes de NLS a través de Orp-150 truncada.
3. Inducción de apoptosis: activación de caspasas, desactivación intracelular de caspasas o inhibición de la telomerasa.

Cuadro 2. Mecanismos de acción de lectinas vegetales en diferentes células malignas *in vitro* e *in vivo*. Tomada y modificada de Castillo y Abdullaev, 2005.

IN VITRO

Lectina	Mecanismo de acción	Línea celular	Tipo
PHA-L (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones	LoVo, HCT-15, SW837	Cáncer colorrectal humano
Con A (Concavalina A)	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones	LoVo, HCT-15, SW837	Cáncer colorrectal humano
VCA (<i>Viscum album, coloratum</i>)	Inhibición del crecimiento Inhibición de proliferación dosis dependiente, con inducción de apoptosis	Molt-4 B16-BL6	Linfoblástico humano agudo Melanoma metastático
	Inducción de la apoptosis a través de la activación de caspasa-3	HL-60	Leucemia promieloide aguda
	Inhibición de la telomerasa	SK-Hep-1, Hep3B	Hepatocarcinoma humano
	Inducción de apoptosis por la defosforilación de Akt	A253	Cáncer humano
ML-I (<i>Viscum album</i>)	Inducción de apoptosis inactivación intracelular de caspasas	Jurkat, T-cell, BJAB B-cell	Leucemia humana
ABL (<i>Agaricus bisporus</i> I)	Inhibición de proliferación sin citotoxicidad, (<i>Agaricus bisporus</i> I) se internaliza y selectivamente bloquea la importación de proteínas nucleares dependientes de NLS a través de Orp-150 truncada	HT29	Adenocarcinomas de colon humano
VFA (<i>Vicia faba</i>),	Inhibición de proliferación no asociado a citotoxicidad y posible interacción con la molécula de adhesión epCAM	LS174T, SW1222, HT29	Cáncer de colon humano
Lectinas de semillas de mezquite (<i>Prosopis</i>)	Efecto antiproliferativo en células tumorales de cáncer cervical humano (HeLa) sin efecto en células normales	HeLa	Cáncer cervical humano

IN VIVO

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

2.4. MEZQUITE (*PROSOPIS LAEVIGATA*)



Figura 3.- Morfología de *Prosopis laevigata* (mezquite). (Imagen tomada y modificada de Mc Vaugh, 1997). A: hoja-raquis y pinas inferiores entre el néctar. B: rama inusualmente larga y fruto inmaduro. C: tipo de rama con flor y púa. D: ovario, estilo, antera y tres estados de desarrollo de la flor (derecha a la parte superior izquierda).

2.4.1 CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

- REINO: Plantae
- DIVISIÓN: Spermatophyta
- SUBDIVISIÓN: Angiosperma
- CLASE: Dicotiledónea
- ORDEN: Fabales
- FAMILIA: Leguminosae
- SUBFAMILIA: Mimosoideae
- GÉNERO: *Prosopis*
- ESPECIE: *Laevigata*

2.4.2. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DEL MEZQUITE

Basada en la descripción taxonómica realizada por Mc Vaugh (1997) y Rzedowski y Rzedowski, (2010), *Prosopis laevigata* pertenece a la familia Leguminosae, es descrita como árbol o arbusto, a veces hasta de 12 m de altura, aunque generalmente menor; tronco hasta de 1 m de diámetro, corteza gruesa, generalmente armado de púas o espinas; hojas bipinnadas, flores reunidas en espigas o racimos axilares, flores pequeñas de color amarillento, pétalos unidos muy cerca de la base (figura 3). Se conocen más de 20 especies de las regiones tropicales y subtropicales en el planeta.

2.4.3. ORIGEN, DISTRIBUCIÓN Y EXTENSIÓN

Originarias de México, las demás especies de *Prosopis* se encuentran principalmente en lugares áridos; mientras que la *Prosopis laevigata* se distribuye principalmente en: Guerrero, Querétaro, Estado de México, Oaxaca, Michoacán, Morelos, Puebla, San Luis Potosí, Nuevo León, Aguascalientes, Durango, Hidalgo, Guanajuato, Jalisco, Zacatecas y Veracruz. Se encuentra en el fondo del Valle y en las laderas bajas, entre 2250 y 2400 m de altitud en sitios con pastizal y matorral. Se ha colectado en la Sierra de Guadalupe y en la delegación de Xochimilco (Ver Mapa 1). Esta planta también es conocida como *Prosopis juliflora* (Swartz) DC., nombre que es asignado debido a que esta especie se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico desde Sinaloa a Centroamérica, Colombia y Venezuela, así como en las Antillas. Elemento característico de las zonas áridas de Norte América, aunque su distribución se ha extendido hasta algunas regiones áridas y semiáridas de Centro y Sudamérica (hasta Perú). Especie pantropical. Se ha propagado en Africa y en Asia.



Mapa 1: Distribución de las diferentes especies de *Prosopis spp.* y de *Prosopis laevigata* en la República Mexicana (Fuente: Rzedowski, 1988).

2.4.4. USOS Y PROPIEDADES MEDICINALES

Por otro lado, el mezquite tuvo crucial importancia para los primeros pobladores de las regiones áridas y semiáridas, por los usos que cada pueblo le dio. Los pueblos cazadores-recolectores, casi todos ellos nómadas, utilizaron el mezquite principalmente como alimento, combustible, sombra, para la elaboración de juguetes y utensilios, y como planta medicinal.

Para los años 1800-1900, se le encontraron diferentes usos, tales como la alimentación del ganado doméstico, elaboración de carbón, flora para la explotación de abejas, extracción de gomas y material de vivienda.

En la actualidad, el mezquite sigue presentando los mismos usos, por lo que es considerado como un recurso natural de importancia en las zonas áridas y semiáridas del país.

Para su uso medicinal en América Latina se emplea el exudado (látex), hoja, corteza, raíz y flor, donde la resina en cocimiento se emplea para curar la disentería y para algunas afecciones de los ojos. El jugo extraído de esta planta se usa para dolores de estómago, escalofríos, diarrea, gripe, dolor de cabeza, inflamación, comezón, sarampión, garganta y heridas.

La infusión de las hojas se usa como remedio para las inflamaciones de los ojos y la corteza como astringente. Las flores en cocción y la corteza de la raíz, como antivomitivo, para curar heridas, antihelmíntico y para el dolor de estómago.

Los extractos en alcohol de las hojas frescas y maduras han mostrado una marcada acción antibacterial contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Rojas, y col., 1994). En Brasil, las hojas hervidas se utilizan para curar ojos, a manera de colirio. En algunos lugares de Perú se usa para curar catarros y gripes. También los frutos se usan en este lugar como medicina popular: cocidos sirven para disolver cálculos vesiculares (Rojas, y col., 1994).

2.4.5. PRINCIPIOS ACTIVOS

La fitoterapia o herbolaria no es algo nuevo, estas prácticas son tan antiguas como el hombre quien hace uso de las propiedades específicas de cada parte de la planta como raíz, tallo u hoja para prevenir alguna enfermedad.

Se ha comprobado que corteza, ramas, hojas y fruto de *P. Juliflora*, contienen sustancias químicas a las que llamamos metabolitos secundarios, que son producto de numerosas rutas de biosíntesis a través de los cuales sintetizan y acumulan sustancias en sus órganos. Los metabolitos secundarios comprenden una rama muy extensa de compuestos y especies químicas que van desde terpenoides, flavonoides, compuestos aromáticos, curaminas y alcaloides, entre otros, (Zamacona- Montañez y Castro, 2010).

Encontramos que los principales activos de esta planta son:

- Alcaloides: piperidinas, especialmente juliflorine, julifloricindae, julifloridine), juliprosine (Daetwler *et.al.*, 1981), juliprosinine y juliflorinine (Ahmad, V. Basha, A. y Haque, W., 1978 y Ahmad, *et.al.*, 1989).
- Flavonoides: pautulitrinos (Wassel, G. Rizk, A. y Abdel - Bary, E, 1972) y monoespecíficos (Almaraz- Abarca, y *col.*, 2007).
- Glúcidos de flavonol (Wiermann y Vieth, 1983).
- Ácidos hidroxicinámicos (Campos, 1997).
- Lectinas: que se le han atribuido actividad hemaglutinante y citotóxica e inhibición de la proliferación celular en la línea celular de cáncer cervical humano (HeLa) (Rocha, y *col.*, 1999).

2.4.6. ACCIÓN FARMACOLÓGICA

De manera específica en México, se extraen de las hojas de *P.juliflora* sustancias medicinales, por ejemplo, principios de vinalina, que son usados en medicina como antimicrobianos.

Bajo condiciones *in vitro* el mezquite muestra ser antibacteriano, antifúngico, hemolítico y antiinflamatorio. Las actividades se le atribuyen a los alcaloides de piperidina presentes en los extractos de hoja de mezquite (Shankarmurthy y Siddiqui, 1948; Ahmad *et.al.* 1986; Aqeel *et.al.*, 1989; Kanthasamy, A. Subramanian, S. y Govindasamy, S., 1989, Ahmad *et.al.*, 1989; Ahmad, V. Basha, A. y Haque, W., 1978; Ott-Longoni, R. Viswanathan, N. y Hesse, M., 1980; Daetwler *et.al.*, 1981 y Batatinha, 1997).

Esta planta tiene una amplia diversidad en cuando al uso medicinal en el cual se ha reportado que el jugo de *P. juliflora* ha sido utilizada en casos de cáncer.

Particularmente Rocha, y *col.* (1999) y Alegría-Ríos, F. Gasca- Gasca, T. y Andrade-Montemayor, H., (2002) evalúan el efecto del tostado de la vaina de mezquite (*Prosopis laevigata*) en el contenido de proteínas, lectinas e inhibidores de tripsina. Además de que

a las lectinas se le han atribuido efectos antioxidantes afectando la expresión proteínica (Cuadro 3), sin embargo existen pocos estudios sobre los efectos antioxidantes pertenecientes a esta planta principalmente atribuidos a las lectinas y otros compuestos (Rocha, y col. 1999, Almaraz- Abarca, y col., 2007).

Cuadro 3: Relación de lectinas muérdago coreano y mezquite en los efectos (antioxidantes) y/o mecanismo de acción de lectinas. (Modificado de Kyung, L. et.al., 2010 y Rocha, y col., 1999).

PLANTA Y FITOQUÍMICO	EFEECTO Y/O MECANISMO DE ACCIÓN
Muérdago Coreano: Lectina de Muérdago Coreano	Disminución de la interacción de iNOS a través de NF-Kb, reduce la expresión regulada de la proteína p-IKBa, que indica el efecto de inhibición de ONOO ⁻ inducido de la traslocación de NF-kb Reducción de las expresiones de ARNm y de la proteína de iNOS
Mezquite (extractos con actividad de lectinas)	Efecto inhibitorio de la síntesis de ADN en células de HeLa Actividad hemaglutinante en eritrocitos de conejo Actividad citotóxica en células HeLa Alta inhibición de la proliferación celular de células HeLa (90%)

2.5. ESTRÉS OXIDATIVO

2.5.1. DEFINICIÓN, FUENTES Y ORIGEN

El estrés oxidativo se define como el efecto adverso de las reacciones oxidantes inducidas por las EROS (Especies Reactivas de Oxígeno) dentro de los sistemas biológicos y es reconocido en la génesis de diversas enfermedades (Beltrán, 2010, Contreras, y col., 2004). Este daño celular que producen las especies reactivas y los radicales libres (RL) ocurre en los enlaces de proteínas y en los fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, lo que provoca gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula, ocasionados por la activación de una reacción en cadena. Esto induce a que se presenten diversas enfermedades una de las cuales es el cáncer y sus diversas formas (Beltrán, 2010 y Ramos, y col., 2006). Entre los factores importantes ante la presencia de estrés oxidativo

y el papel que juega EROS en el proceso de carcinogénesis, está la demostración de que el estrés produce el rompimiento de una o ambas cadenas del ADN, así como aberraciones cromosómicas y esto puede contribuir al proceso de carcinogénesis a través de la modulación de la señal transduccional y proliferación celular (Beddowes, E. Faux, S. y Chipman, K., 2003).

2.5.2. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y SU RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO

Las EROS desempeñan un papel fisiológico importante en varios aspectos de la regulación y la señalización intracelular (Palmer y Paulson, 1997). Llega a interferir en la expresión de algunos genes y vías de transducción de señales, a ser oxidantes por naturaleza, influyen en el estado REDOX en donde altas concentraciones de EROS causan muerte celular y a bajas concentraciones afecta la proliferación celular y la supervivencia de las EROS.

Las vías de señalización además de ser afectadas por altas o bajas concentraciones de EROS, también son afectadas por iones metálicos los cuales inhiben principalmente fosfoserina/treonina, fosfotirosina y fosfolipidofosfatasas, mediante la interacción con grupos sulfhidrilo para formar enlaces disulfuro intramolecular o intermolecular (Poli *et. al.*, 2004 y Thannickal y Fanburg, 2000), afectando la estructura que conforma a las proteínas que conducen a la regulación de varias cascadas de señalización como: el factor de crecimiento quinasa, src/Abl quinasa, MAPK y PI3-quinasa. Éstas conducen a la activación de factores de transcripción redox regulados como son: CAP-1, NFκB, p53, HIF-1 y NAFT (Ver **Figura 4**).

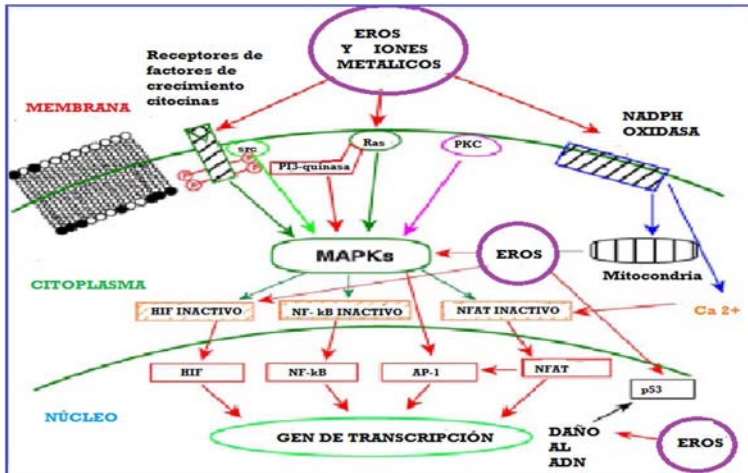


Figura 4: Iones metálicos y EROS inducen a las vías de señalización. Tomada y modificada de Valko *et. al.* 2006.

2.5.3. RADICALES LIBRES (RL)

El "estrés oxidativo" puede provenir de una deficiencia del sistema de defensa antioxidante, un incremento de la formación de EROS, cuya alta reactividad puede provocar: peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, rotura del ADN y degradación proteica (Pérez y Pérez, 2006). Una parte importante en la generación del estrés oxidativo es la presencia de los radicales libres (RL), átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado y en consecuencia son altamente reactivos, y para alcanzar su estabilidad electroquímica tienden a tomar un electrón de las moléculas estables, primero oxidándolas y luego atacando sus estructuras (Avello y Suwalsky, 2000).

Dentro de este concepto se encuentran las EROS, también conocidas como RL que son átomos o moléculas que poseen un número impar de electrones en su órbita más externa, los cuales se generan cuando ocurre una adición a un doble enlace. Estas se caracterizan por ser muy inestables y pueden reaccionar con otras moléculas, entregando o recibiendo un electrón, por lo que son altamente reactivas y atacan de forma constante a las células mediante reacciones bioquímicas REDOX, las que ocurren como parte normal del metabolismo celular o por la exposición de factores ambientales (Avello y Suwalsky, 2000 y Pérez, y Pérez, 2006).

El origen de los RL puede ser a nivel intracelular y extracelular, proviniendo de fuentes enzimáticas (como de transferencias de electrones, oxidasa como: xantina-oxidasa, indolamindioxigenasa, triptofanodioxigenasa, mieloperoxidasa, galactosa-oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa, monoaminooxidasa, NADPH oxidasa, sistemas transportadores y peroxisomas) y no enzimáticas (Cruz, y *col.*, 2011).

El aumento en los niveles de RL puede causar alteraciones celulares que van desde sus componentes y función, presentándose variaciones en las respuestas celulares patológicas que dependen de su función, composición bioquímica de las células y, de manera especial la capacidad de éstas para contrarrestar la acción de estos elementos agresores, lo que ocurre a través de diversos mecanismos, los que en conjunto son reconocidos como el sistema de defensa antioxidante (Avello y Suwalsky, 2000), que son sustancias capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, por medio de la liberación de electrones al torrente sanguíneo y son captados finalmente por los radicales libres, pero siguen manteniendo su estabilidad. Se presentan en bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), y retarda o previene la oxidación de éste (Cruz, y *col.*, 2011).

Las EROS son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al cuerpo humano mediante reacciones bioquímicas de REDOX, que ocurren en el metabolismo celular o la exposición de factores ambientales y se forman de la reducción univalente del O_2 que produce al radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), la reacción univalente subsecuente genera el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD) con alta capacidad oxidante por vía de la reacción de Fenton, y forma el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y que deriva a la formación de nuevos radicales libres (figura 5 y cuadro 4).

Además de considerar las EROS existen a las de nitrógeno que en su estructura presentan átomos de oxígeno; estas ERN (Especies Reactivas de Nitrógeno) que se forman de la intervención del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que incluyen al óxido nítrico (NO^{\cdot}) y a los radicales peroxinitrito en la formación del anión peroxinitrito ($OONO^{\cdot}$) (Pérez y Pérez, 2006).

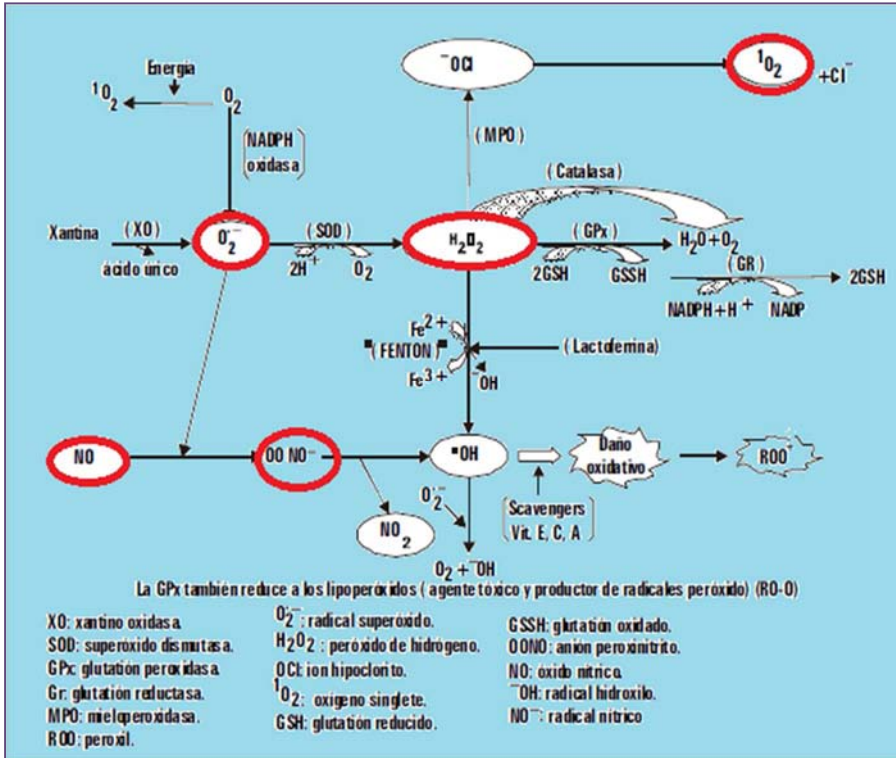


Figura 5. Representación metabólica de las EROS: En los círculos de color rojo se muestran las EROS y ERN importantes. Tomada y modificada de Pérez y Pérez, 2006.

Cuadro 4: Principales EROS y ERN. Formula química y Localización celular. Tomado y modificado de Keshav, (2006).

Especie molecular	Formula química o abreviación	Localización celular	Comentarios
Oxígeno singlete	¹ O ₂	Cloroplasto, Tilacoide, mitocondria y Peroxisoma	Señalización local Membrana impermeable
Radical de anión superóxido	O ₂ ⁻	Cloroplasto, Tilacoide Mitocondria, Peroxisoma y Apoplasto	Membrana permeable Interacción con NO [•]
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂	Cloroplasto, Mitocondria, Peroxisoma y Apoplasto	Membrana permeable Señalización molecular
Óxido nítrico	NO [•]	Mitocondria, Citosol, Peroxisoma y Apoplasto	Membrana permeable puede reaccionar con O ₂ ⁻
Peroxinitrito	ONONO ⁻	Peroxisoma, Citosol y Apoplasto	Formado por la vía de interacción con O ₂ ⁻

2.5.4. NITRITOS (NO₂⁻): FUENTES Y BIOTRANSFORMACIÓN

El óxido nítrico (NO[•]) es un radical reactivo abundante e importante en la señalización biológica oxidativa, es una molécula que participa en una gran variedad de procesos fisiológicos incluyendo la neurotransmisión, la regulación de la presión arterial, mecanismos de defensa, la relajación del musculo liso y la regulación inmune (Archer, 1993, Alderton, C. Cooper, R. y Knowles, 2001, Bergendi *et.al.*, 1999, Forstermann, U. Boissel, J. y Kleinert, H., 1998). Uno de los medios para investigar la formación de óxido nítrico es la determinación de nitrito (NO₂⁻), el cual es uno de los dos principales productos de degradación del NO[•] y que son estables, pues ya no sufren de modificaciones posteriores (Gallardo, 1999).

El nitrito en mamíferos puede derivarse de: 1) la oxidación endógena de NO[•], 2) la reducción de nitrato por saliva por bacterias comensales a través de la boca hasta el tracto digestivo, 3) fuentes nutricionales tales como carne, verduras y agua potable. Las concentraciones en estado estacionario de nitrito en el cuerpo están estrechamente regulados y varían dependiendo de cada tejido o compartimento y la actividad relativa de la Óxido Nítrico Sintasa (NOS). Sin embargo, por lo general el nitrito está concentrado más en los tejidos que en la circulación. El óxido nítrico se sintetiza por las células de mamíferos a partir de L- arginina a través de un reacción de oxidación catalizada por el complejo de flavo – hemoproteína de la NOS (Fassen *et.al.*, 2009).

La producción endógena de NO[•] juega un papel muy importante en la homeostasis vascular, neurotransmisión y mecanismos de defensa. En plasma, las concentraciones en el estado estacionario de nitrito se conservan a través de varias especies de mamíferos, incluyendo los seres humanos. El nitrito se mantiene estable durante varias horas, en sangre; sin embargo, el NO[•] y el nitrito se oxidan rápidamente a nitrato. La vida media de nitrito en la sangre humana es de aproximadamente 110 s y el nitrato tiene una vida media en circulación de 5-8 horas. El nitrito y nitrato de los tejidos, por otra parte, tienen *in vivo* una vida media de decenas de minutos y son excretado por los riñones (Bryan, 2006).

2.5.5. GENERACIÓN DE ENFERMEDADES.CÁNCER: RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA TOXICIDAD DE METALES

El estrés oxidativo ha sido implicado en varias enfermedades crónicas y procesos naturales como el envejecimiento, la aterosclerosis, diabetes mellitus, la artritis, las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y cáncer entre otras.

El estrés oxidativo, está implicado en la etiología del cáncer como resultado de un desequilibrio en la producción de EROS y las propias defensas antioxidantes celulares. Esto se observa en EROS y la desregulación de la homeostasis REDOX y promueve la formación de tumores mediante el inicio de una inducción aberrante de las redes de señalización que provocan la carcinogénesis, la cual se caracteriza por la acción acumulativa de múltiples eventos en una célula, entre otros:

- aumento de la síntesis de ADN
- Mitosis por agentes cancerígenos no genotóxicos (inducen mutaciones en células que se dividen a través de los sitios de reparación)
- Agentes genotóxicos por lo general productos químicos que dañan al ADN y compuestos carcinógenos.

EROS actúa en las 3 etapas de los mecanismos de carcinogénesis (Figura 6) las cuales son: iniciación, promoción y progresión de la siguiente forma:

1. INICIO

Implica una mutación no letal en el ADN que produce una célula alterada seguido por lo menos de una ronda de síntesis de ADN para reparar el daño, si las células en división son dañadas por la razón que sea, son capaces de interrumpir temporalmente su ciclo celular en la fase G1, S o G2 (puestos de control), reparan el daño y vuelven a la división (Loft, S. y Poulsen, H., 1996).

El daño oxidativo del ADN puede ocurrir a través de la acción de EROS, uno de estos a través de radicales hidroxilo, formadas a través de un tipo de mecanismos llamado Fenton, junto con otras especies.

El proceso de iniciación también se produce por la inducción del estrés oxidativo al Ca (II) que produce cambios que llevan al incremento en el calcio libre intracelular como resultado de su liberación del calcio intracelular y el influjo de calcio extracelular (II) (Dreher y Junod , 1996).

2. PROMOCIÓN

Se caracteriza por la expansión clonal de las células iniciadas por la inducción de la proliferación celular y/o inhibición de la muerte celular programada o apoptosis. Este proceso resulta en la formación de una lesión focal identificable. Esta etapa es dosis-dependiente, es decir, requiere la presencia continua del estímulo de promoción de tumores y por lo tanto es un proceso reversible (Loft, S. y Poulsen, H., 1996). Muchos promotores tumorales tienen un fuerte efecto de inhibición sobre los sistemas de defensa antioxidante de las células como SOD, catalasa, glutatión, entre otros. Mientras que un nivel alto de estrés oxidativo es citotóxico para la célula y la proliferación celular es detenida por la inducción de la apoptosis o necrosis, incluso un bajo nivel de estrés oxidativo puede de hecho estimular la promoción del crecimiento del tumor (Dreher y Junod, 1996). Esto implica que la promoción de EROS durante esta etapa de la carcinogénesis es la línea principal de promoción de tumores relacionados con EROS.

3. PROGRESIÓN

Esta etapa implica cambios moleculares y celulares irreversibles que ocurren desde el estado preneoplásico como son:

- Acumulación de alteraciones genéticas adicionales, que conducen a la transición de tumor benigno-maligno
- Inestabilidad genética
- Alteración de la integridad cromosómica

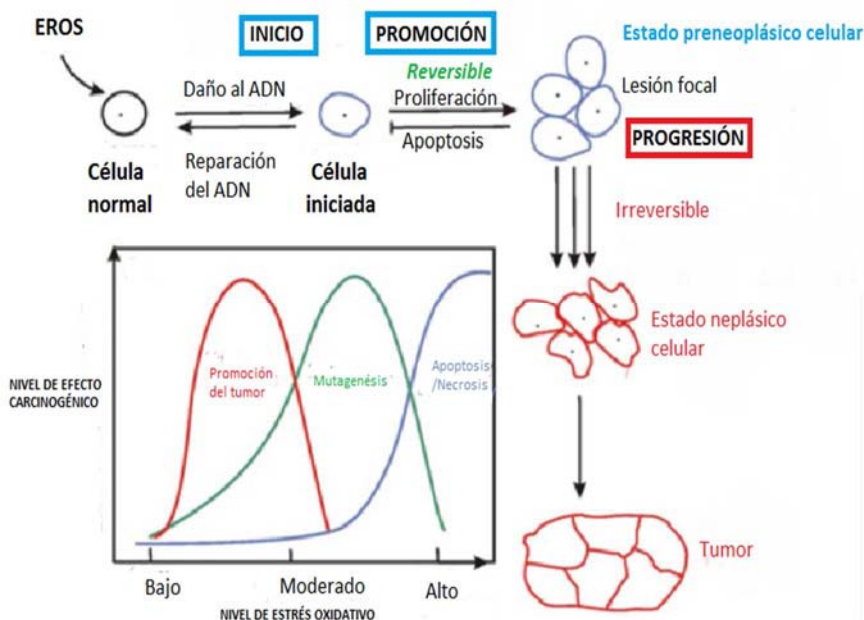


Figura 6: Modelo de los tres estados de la carcinogénesis y el nivel del efecto carcinogénico contra el nivel de radicales libres en los distintos estados del proceso carcinogénico. Tomado y modificado de Valko *et. al.* 2005.

Muchos estudios se han centrado en la toxicidad del metal inducido y la carcinogenicidad, destacando su papel en la generación de EROS y ERN en los sistemas biológicos y la importancia de este mismo (Valko *et. al.*, 2005; Leonard, S. Harris, G. y Shi, X., 2004; Stohs y Baghchi, 1995; Pekarkova *et. al.*, 2001; Chen *et. al.*, 2001 y Halliwell y Gutteridge, 1990). El metal es mediado por la formación de RL que pueden causar diversas modificaciones a las bases del ADN, peroxidación de lípidos mejorada al cambio en el calcio y a la homeostasis sulfhidrilo. Entre los metales que pueden inducir estrés oxidativo y están relacionados con procesos carcinogénicos, tenemos al hierro, el cobalto, el cromo, el vanadio, el cadmio, el arsénico y el níquel.

2.5.5.1. NÍQUEL

El níquel se encuentra distribuido ampliamente en los biosistemas. Es ampliamente usado en la minería, la aleación de producción, la galvanoplastia, la refinación y la soldadura.

Los estudios epidemiológicos revelaron un mayor riesgo para la salud y como carcinógeno en humanos principalmente provoca daños en las vías respiratorias y por su uso

ocupacional provoca cánceres nasales, pulmonares y de la cavidad nasal en los mineros y los trabajadores de refineries de níquel, (Clemens y Landolph, 2003).

2.5.5.2. HOMEOSTASIS DE NÍQUEL, ESENCIALIDAD Y TOXICIDAD.

El níquel puede entrar en el cuerpo por inhalación, ingestión y absorción dérmica. La cantidad de níquel absorbido por el tracto gastrointestinal depende del tipo de níquel, el contenido y la capacidad de absorción. Normalmente, sólo el 1-2% de níquel ingerido es absorbido. La ingesta diaria de níquel se ha estimado en intervalos de 35 a 300 g por día (Nielsen y Flyvholm, 1984).

El níquel es un metal no acumulativo, se excreta por la orina y las heces. La excreción urinaria de níquel es rápida y la eliminación parece seguir una cinética de primer orden sin evidencia de la cinética dosis-dependiente. Después de la absorción, el riñón es la principal vía de eliminación. La excreción de níquel también se produce en la saliva y el sudor, lo cual puede contribuir significativamente la eliminación de níquel en ambientes calurosos.

La forma química del níquel determina la ruta por la que el níquel puede entrar en las células. El níquel soluble, por ejemplo, el carbonilo de níquel, es soluble en grasa y puede cruzar libremente las membranas celulares, probablemente por difusión o por medio de canales de calcio. Algunos autores, como, Foulkes y McMullen, (1986) sugieren la absorción de níquel por difusión transmembranal, mientras que otros propusieron la absorción de Ni (II) a través de los canales de Ca (II).

Los compuestos de níquel soluble son conocidos para entrar en la célula a través del canal ionóforo de ionomicina de calcio, lo que aumenta la absorción de níquel por un factor de 4-5 (Refvik y Andreassen, 1995).

Entre los compuestos del níquel la exposición al carbonilo de níquel, genera altas concentraciones de níquel en pulmón, cerebro, riñones, hígado y glándulas suprarrenales. La vida media biológica de óxido de níquel en el pulmón depende, en parte, del tamaño de partícula y el periodo de exposición en estudios con animales expuestos durante 11-21 meses (Tanaka *et.al.*, 1985).

En animales de experimentación, los compuestos de níquel inducen tumores en todos los sitios de aplicación. Muchos estudios documentan la inducción de tumores malignos después de la administración vía intramuscular, la inhalación y por vía intraperitoneal, intra-renal, intratesticular, intraocular y subcutáneas, (Coogan *et.al.*, 1989, Denkhau y Salnikow, 2002). Los datos experimentales sugieren que son altamente citotóxicos y genotóxicos cuando se asocian con compuestos insolubles de níquel, por lo que la exposición a Ni_3S_2 cristalino resultó que el contenido de níquel absorbido en el citosol y núcleo son altos (Fletcher *et. al.*, 1994), por otra parte, los compuestos de níquel solubles en agua entran a la célula a través de canales de calcio que muestran poco contenido de níquel en el citosol y el núcleo (Evans, R. Davies, P. y Costa, M., 1982).

2.5.5.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y NÍQUEL INDUCEN CARCINOGENESIS

Los datos experimentales sugieren que el estrés oxidativo puede ser importante en la carcinogénesis inducida por el níquel.

Sin embargo el efecto directo entre la capacidad de níquel para producir el estrés oxidativo y la carcinogenicidad, no está completamente comprendida. La controversia sobre el papel del estrés oxidativo entre el níquel y la carcinogénesis se documenta en los experimentos con animales. Mientras que la administración de níquel y cobalto, induce la formación de tumores, la administración de cobre y hierro no inducen tumores. Un problema adicional apareció en los estudios de cancerígenos y la actividad de los compuestos de níquel en varios animales. Mientras que la exposición a Ni_3S_2 insoluble induce carcinomas en 30% de las ratas expuestas, una exposición similar no causó tumores en pulmones de ratones. Sin embargo, la inflamación y la fibrosis en pulmón se

observaron en ambos grupos de animales. La diferencia genética entre animales responsables de la diferente actividad de las enzimas, que implica la actividad protectora contra el estrés oxidativo, parece jugar un papel importante en la inducción de carcinogenicidad del níquel.

El níquel produce un nivel bajo, pero medible de radicales libres en las células (Bal y Kasprzak, 2002). Métodos de fluorescencia revelan que formas de níquel (Cloruro de Níquel III soluble e Ni_3S_2 insoluble) evocan la formación de radicales libres (Salnikow *et. al.* 2000). Varios estudios han revelado la depresión de GSH (glutación), está representada por algún marcador de estrés oxidativo (Rodríguez, *y col.*, 1991).

2.5.5.4. NÍQUEL INDUCE ACTIVACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Los factores de transcripción activados por el níquel son:

- NF-kB: se encontró que era activado por níquel el cual induce una respuesta alérgica y de hipersensibilidad en la piel (Goebeler, *et.al.*, 1993).
- ATF-1: aumento del calcio intracelular después de administrar níquel a su vez conduce a la activación de una proteína quinasa en cascada que media la fosforilación ATF / CREB.
- HIF-1: Una explicación de la activación de níquel al inducir el factor de transcripción HIF-1, se basa en la suposición de que el níquel reemplaza hierro en el portador de oxígeno, Fe (II)-híbrido hemoglobina. La sustitución de hierro por interruptores de níquel señal a la hipoxia permanente, que a su vez activa el factor HIF-1 (Goldberg, M. Dunning, S. y Bunn, H., 1988).
- p53: De acuerdo a Maehle *et.al.* (1992), el gen p53 esta mutado en células de riñón epiteliales humanas expuestas al níquel. Se detecta una baja incidencia de mutaciones puntuales en el gen supresor de tumores p53 al ser inducido con níquel provocando tumores renales en ratas (Weghorst *et.al.*, 1994).

2.6. PROCESOS DE DETOXIFICACIÓN (ENZIMÁTICOS Y NO ENZIMÁTICOS)

Existen diversos sistemas de defensa antioxidante o detoxificantes celulares que son también adecuados a la vida media muy corta de los radicales libres; éstos comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas, macromoléculas con capacidad antioxidante, y también enzimas antioxidantes y enzimas asociadas. La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres se muestra en los cuadros 5 y 6.

2.6.1. MECANISMOS NO ENZIMÁTICOS

ANTIOXIDANTE	FUNCIÓN FISIOLÓGICA
Vitamina E	Capta los radicales libres en membrana evitando la lipoperoxidación.
Vitamina C	Efecto eliminador de radicales y recicla la vitamina E. Ambas vitaminas C y E trabajan como antioxidantes.
Glutación	Tiene varios efectos en la defensa antioxidante celular.
Ácido lipólico	Antioxidante eficaz y sustituto eficaz del glutación.
Ubiquinonas CoQ10	Efectos de gran utilidad como antioxidantes.
Carotenoides	Antioxidante de lípidos.

Cuadro 5: Mecanismo no enzimáticos: Antioxidantes y su función fisiológica. Tomado y modificado de López, y col. 2012.

Los mecanismos no enzimáticos (cuadro 5) comprenden moléculas como el glutación (GSH). El glutación es un tiol no proteico, y el más abundante en las células de mamíferos y desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas (Viña, 1990). Entre ellas, se encarga de proteger a la célula frente al ataque oxidativo, ya sea por radicales libres, peróxidos u otros agentes nocivos, participa en gran cantidad de procesos fisiológicos: en la síntesis de ADN, actúa como la primera barrera de protección frente al estrés oxidativo,

protege a la membrana celular contra el daño oxidativo y mantiene el estatus tiólico de la misma, participa en la regulación de la síntesis de proteína, modula actividades enzimáticas y regula la proliferación celular.

La vitamina C, por sus características estructurales puede reaccionar con EROS y oxidarse a dihidroascorbato que se recicla a ácido ascórbico por la enzima dihidroascorbato reductasa. Se encuentra en plasma a concentraciones mucho más bajas que el ascorbato, y es efectivo contra el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete.

La vitamina E (α -tocoferol), es probablemente el antioxidante más potente del organismo en cuanto a su capacidad como bloqueador de la cadena de lipoperoxidación, secuestra radicales peroxil lipídicos dando origen a hidroperóxidos lipídicos y al radical tocoperoxil.

2.6.2. MECANISMOS ENZIMÁTICOS

ANTIOXIDANTE	UBICACIÓN CELULAR	FUNCIÓN FISIOLÓGICA
Superóxido Dismutasa	Citoplasma (SOD-1) Mitocondria (SOD-2) Extracelular (SOD-3)	Dismutación de radicales superóxido.
Glutación peroxidasa	Citoplasma y mitocondria	Elimina el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos
Catalasa	Citoplasma y mitocondria	Elimina peróxido de hidrógeno.

CUADRO 6: Mecanismo enzimático. Principales antioxidantes, función fisiológica y ubicación celular
Tomado y modificado de López, y col., 2012.

Las EROS como el radical superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se forman durante la reducción del dioxígeno en agua. Estas especies pueden dañar las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos, por lo que se requieren sistemas antioxidantes eficientes, entre los que se incluyen ciertas enzimas. Los mecanismos enzimáticos comprenden principalmente a la superóxido dismutasa (SOD), que constituye la primera defensa al daño oxidativo que puede causar el ión superóxido y las especies reactivas que se derivan de su presencia. Cataliza la reacción que transforma el radical superóxido en

peróxido de hidrógeno, constituyendo el primer medio natural de defensa (McCord y Keele, 1974 y Fridovich, 1974).

Cabe destacar que el radical superóxido es inestable en medio acuoso y dismuta espontáneamente formando H_2O_2 . Como antioxidante primario, la actividad de superóxido dismutasa cumple un papel fundamental en la defensa encargada de dismutar el O^{2-} a H_2O_2 , antioxidante, ya que es una de las primeras líneas de defensa, ya que del 1 al 2% del oxígeno que consume la mitocondria en estado respiratorio, se transforma en la cadena de transporte electrónico, en radical superóxido (Boveris y Chance, 1973).

La glutatión-peroxidasa (GPx) juega un papel importante en la detoxificación del peróxido de hidrógeno y los lipoperóxidos que se generan en las células (Chance, *et.al.*, 1979). Forma parte de los denominados antioxidantes primarios, de modo que convierte los radicales libres en moléculas menos dañinas, o impide su formación; su actividad se encuentra en el citosol y en la matriz mitocondrial.

El peróxido de hidrógeno se forma por la dismutación del radical superóxido y también en la reacción de algunas oxidasas. Hay varias enzimas capaces de degradar el peróxido de hidrógeno: las catalasas, las peroxidases y las peroxirredoxinas. Las peroxidases eliminan el H_2O_2 usándolo para oxidar otros sustratos. A diferencia de las otras enzimas, que requieren de un sustrato reducido, las catalasas dismuta el peróxido de hidrógeno.

2.6.3. CATALASA

La catalasa (CAT) es una enzima antioxidante presente en la mayoría de los organismos aerobios. Cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno.

Es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en organismos anaerobios principalmente en bacterias y hongos, aerobios en animales y en el organismo humano. La actividad de la catalasa varía dependiendo del

tejido; ya que ésta resulta más elevada en el hígado y los riñones, y baja en tejidos conectivos y los epitelios, y nula en el tejido nervioso. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol. Esta enzima es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular se encuentra en el rango de 210-280 kDa (Céspedes, E. Hernández, I. y Llopiz, N. 1999).

En algunas especies la CAT contiene moléculas de Nicotinamín Adenín Dinucleótido Fosfatado en su forma Reducida (NADPH) ligadas estrechamente a la enzima; así se ha demostrado que la catalasa humana y la animal están ligadas a 4 moléculas de NADPH, 1 en cada subunidad y que no existe interacción directa entre el grupo hemo y el NADPH.

Entre los diferentes tipos de catalasa existen diferencias estructurales importantes. Las catalasas pequeñas son menos resistentes a la desnaturalización, unen NADPH, tienen hemo *b* y se inhiben e inactivan por sustrato. En cambio, las catalasas grandes tienen un dominio extra en el C-terminal que es semejante a la flavodoxina, son muy resistentes a la desnaturalización, tienen hemo *d*, presentan enlaces covalentes inusuales cercanos al sitio activo y son resistentes a concentraciones molares de H_2O_2 (Figura 7).

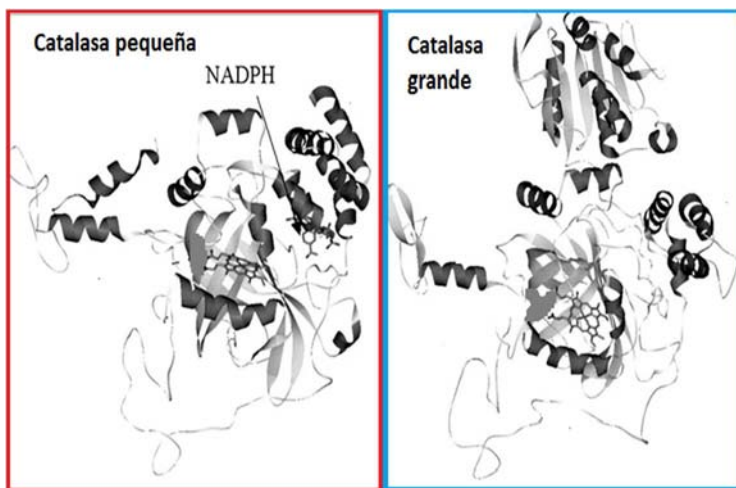
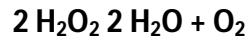


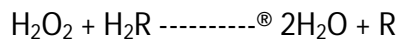
Figura 7: Estructura general de una catalasa pequeña. Muestra la molécula de NADPH unida a la catalasa pequeña, el cual es un monómero de la catalasa de eritrocitos humanos (HEC). También se muestra una catalasa grande el cual es monómero de la catalasa-1 de *N. crassa* (CAT-1). Tomada y modificada de Díaz, 2003.

La catalasa que reduce H_2O_2 a H_2O participa en la detoxificación de peróxido de hidrógeno a través de una reacción que da lugar a agua y a una molécula de oxígeno (Chance y cols., 1979).



2.6.3.1. FUNCIÓN DE CATALASA

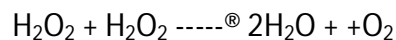
La catalasa como parte del sistema antioxidante está involucrada en la destrucción del H_2O_2 generado durante el metabolismo celular. Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero relativamente poca afinidad por el sustrato. Presenta dos funciones: la catalítica y la peroxidativa. Ambas se pueden representar por la ecuación:



sustrato donador CAT.

La reacción general entraña la reducción del sustrato tomando los átomos de hidrógeno aportados por el donador, y los productos finales serían el sustrato reducido y el donador oxidado.

En la función catalítica, el donador es otra molécula de H_2O_2 . Esta función sólo puede ser realizada por la enzima en su forma tetramérica.



En la reacción peroxidativa la enzima puede utilizar como donadores de hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, fenol y formaldehído.

En el hombre, la catalasa protege la hemoglobina del peróxido de hidrógeno que se genera en los eritrocitos. También tiene un papel de protección en la inflamación, en la prevención de mutaciones, evita el envejecimiento y cierto tipo de cáncer (Céspedes, E. Hernández, I. y Llópiz, N. 1999 y Díaz, 2003).

III.- JUSTIFICACIÓN

Actualmente se conoce que el estrés oxidativo está implicado en la etiología de diversas enfermedades crónicas no transmisibles entre ellas el cáncer, como resultado de un desequilibrio en la producción de EROS y las propias defensas antioxidantes celulares (Mendoza y Retana, 2009).

Diversos estudios sugieren que las lectinas muestran tener actividades de protección contra el estrés oxidativo inducido por los radicales libres. Particularmente para el mezquite se ha reportado su modulación del estrés oxidativo y su efecto citotóxico en cáncer de leucemia de las células T (Molt-4), células tumorales epiteliales humanas (HeLa), tumor hepático humano (HepG2) y fibroblastos F26.

En este estudio se analizó la participación de lectinas obtenidas de *Prosopis laevigata* (mezquite) en la regulación del estrés oxidativo en un modelo de ratón con cáncer. Aunque existen pocos estudios en los que se reporten que *Prosopis laevigata* puedan reducir el daño y efectos de EROS principalmente para lectinas, se ha encontrado que el mezquite (*P.juliflora* también conocida como *P.laevigata*) muestra tener actividad citotóxica.

Por lo tanto con el presente estudio se espera contribuir a determinar el efecto que las lectinas de mezquite (*Prosopis laevigata*) puedan tener en la regulación del estrés oxidativo en ratones hembra CD1 tratados con óxido de níquel (NiO), así como su participación en la modulación de la carcinogénesis.

IV.- HIPÓTESIS

El balance entre Especies Reactivas de Oxígeno y procesos de detoxificación celular se encuentra modificado en las células cancerosas. Las lectinas de una gran variedad de organismos vegetales son reconocidas por su efecto citotóxico sobre células cancerosas. En este sentido se espera una disminución en los niveles de radicales libres en ratones comprometidos a un proceso carcinogénico con NiO al ser tratados con lectinas de *Prosopis laevigata*.

V. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antioxidante de lectinas de *Prosopis laevigata* en un modelo de cáncer murino.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtención de lectinas a partir de hojas de *Prosopis laevigata* por medio de una extracción salina.
- Evaluar la actividad hemaglutinante de lectinas de hoja de mezquite en plasma sanguíneo de los tipos ABO⁺.
- Inducir un mecanismo de carcinogénesis con óxido de níquel (NiO) en ratones hembra de la cepa CD1.
- Evaluar la concentración de nitritos y la actividad de la enzima catalasa en hígado y plasma sanguíneo de ratón hembra CD1 tratados con extractos enriquecidos de lectinas de hoja de mezquite.

VI. MÉTODOS

6.1 OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

Hojas de *Prosopis laevigata* (Fabaceae, *Mimosaceae*), fueron recolectadas en la localidad de Tepelmeme, Oaxaca en el poblado de San Cristóbal Suchixtlahuaca (17°43'34.28" N, 97°22'10.23" O con una elevación de 2086 msnm). Posteriormente fueron determinadas en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza como *Prosopis laevigata* (W.) según McVaught (1997) y Rzendowski y Rzendowski (2010).

6.2. PROCESOS DE EXTRACCIÓN Y SEMIPURIFICACIÓN

6.2.1. EXTRACCIÓN SALINA DE LECTINAS

De acuerdo al método de Villarrubia, y col., (1995), 100 g de hojas frescas de *Prosopis laevigata* fueron trituradas en un mortero con solución salina al 10% (J.T. Baker Mex) en una proporción 1:3 m/v, la cual se mantuvo en refrigeración a 4°C durante 24 horas. Posteriormente para solubilizar las proteínas, el extracto se mantuvo en agitación (Thermo Scientific) a temperatura ambiente durante 1 hora.

La suspensión obtenida fue filtrada en gasa, a fin de retirar las partículas grandes y materiales insolubles, y se mantuvo en refrigeración a 4°C durante 24 horas, para centrifugarla (centrifuga SIGMA 2-5) a 3.000 RPM por 20 minutos a 4°C.

6.2.2. DIÁLISIS

De acuerdo al método de Villarrubia, y col., (1995), con algunas modificaciones, el sobrenadante obtenido fue dializado en una membrana de 3kDa (Thermo Scientific) en un amortiguador de bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) (J.T.Barker Mex.) 0,1 M, pH 8,0, durante 6 horas en agitación a temperatura ambiente. La eliminación de sal fue comprobada con nitrato de plata (AgNO_3) 0.01 N.

6.2.3. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

De acuerdo al método usado por Ganem y González (2007) con algunas modificaciones, la purificación se realizó mediante una cromatografía de afinidad en una columna empacada con Silica gel 60 GF (Merck KGaA) en una proporción (1:1 m/v) en agua destilada. El extracto de mezquite fue eludido con solución salina (J.T. Barker Mex.) 1M durante 48 horas a temperatura ambiente. Las proteínas retenidas en la columna se desplazaron con una solución 0.1 M de D⁺ glucosa (Sigma Mex.), los cuales fueron cuantificados por espectrofotometría a 545nm.

6.2.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS. MÉTODO DE BIURET

La determinación de proteínas se realizó por espectrofotometría (Thermo Scientific Genesys-20) a 545 nm, empleando una curva estándar con albumina de huevo (marca Merck) de 100 mg/ml.

6.3. PRUEBAS DE HEMAGLUTINACIÓN.

La actividad hemaglutinante de lectinas se realizó de acuerdo a lo descrito por Costa *et al.*, (1999), se tomaron muestras sanguíneas del sistema ABO positivo, los cuales se centrifugaron (SIGMA 2-5) a 3000 RPM por 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante, aspirando cuidadosamente la capa superior, los eritrocitos se suspendieron en aproximadamente 10 volúmenes de buffer fosfato salino (PBS) y se centrifugaron en las condiciones antes descritas, repitiendo el lavado dos veces más. Posteriormente el volumen de eritrocitos sedimentados se resuspendió en PBS a una dilución del 3% (v/v). Se procedió a preparar por triplicado pozos con 50 µl de lectina y 50 µl de eritrocitos, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y se observaron en un microscopio óptico (Primo Star) a 10X y 40 X. El grado de aglutinación se determinó de acuerdo a la escala propuesta por Hohenhaus (2000).

6.4. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BAJO CONDICIONES REDUCTORES (SDS-PAGE).

La determinación del número y del peso molecular de las lectinas presentes en los extractos se realizó por medio de una electroforesis de poliacrilamida al 12%. Tomando un volumen de 2.5 µl - 5.0 µl de los extractos de proteína tipo lectina y 10 µl de buffer de muestras. Dejando correr a 95 voltios durante 90 min. La tinción se realizó por el método de nitrato de plata de acuerdo a lo establecido en el protocolo de The protein Protocols Handbook (Walker, 2002).

6.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Las pruebas experimentales *in vivo* se utilizaron 2 poblaciones de 30 ratones hembra de la cepa CD1 de 4 semanas de edad, criadas y mantenidas en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza bajo condiciones estándar de fotoperiodo (12 h luz / 12 h oscuridad), temperatura ambiental (22°C±2°C), agua y alimento *ad libitum*.

6.5.1. INDUCCIÓN A PROCESO CARCINOGENICO MEDIANTE EL TRATAMIENTO DE NiO Y DE EXTRACTO ENRIQUECIDO DE LECTINAS DE HOJA DE *PROSOPIS LAEVIGATA* EN RATONES HEMBRA CD1

Se realizó la inducción al proceso carcinogénico de acuerdo al método de Ortiz, A. Castillo, R. y Beausoleil, I., (1995) con algunas modificaciones, la inducción se realizó por duplicado en 24 ratones hembra CD1 de 3 semanas de edad, los cuales se indujeron a proceso carcinogénico por medio de la administración de 20 mg de polvo de óxido de níquel en 0.05 mL de aceite de oliva estéril, en una dosis única intramuscular hasta la observación del tumor.

Para la evaluación del extracto enriquecido de lectinas de mezquite se evaluaron tres dosis de acuerdo a lo propuesto por Alonso (2004) y Radberg *et.al.* (2001) de 40, 80 y 120 mg/kg/ml, vía oral por un periodo de 4 semanas agrupando a los animales de la siguiente forma:

Grupo I: Control. 6 Ratones hembra CD1 en condiciones normales

Grupo II: 6 Ratones hembra CD1 con tratamiento de NiO

Grupo III: 6 Ratones hembra CD1 con tratamiento de NiO y dosis de 40 mg/kg/ml de extracto enriquecido de lectinas de hojas de mezquite

Grupo IV: 6 Ratones hembra CD1 con tratamiento de NiO y dosis 80 mg/kg/ml de extracto enriquecido de lectinas de hojas de mezquite

Grupo V: 6 Ratones hembra CD1 con tratamiento de NiO y dosis 120 mg/kg/ml de extracto enriquecido de lectinas de hojas de mezquite

6.6. EXTRACCIÓN DE PLASMA SANGUÍNEO

Se llevó a cabo la extracción de sangre por medio de la punción cardiaca de acuerdo a Sáenz, (2004) con algunas modificaciones. La sangre obtenida fue colocada en tubos con EDTA (anticoagulante) y sometida a centrifugación con la finalidad de separar el plasma y se lavó el plasma con solución salina.

6.7. OBTENCIÓN DE TEJIDOS.

De acuerdo al método seguido por Borrás, *et.al.*, (2003) con algunas modificaciones, se disectó el hígado de todos los grupos de ratones tratados, los cuales se perfundieron con solución salina fisiológica a baja temperatura y fueron mantenidos en cama de hielo hasta su utilización.

6.8. DETERMINACIÓN DE MARCADOR DE ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFENSA ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE

6.8.1. DETERMINACIÓN DE NITRITOS: MÉTODO DE GRIESS

De acuerdo al método de Gallardo, (1999) con algunas modificaciones la cuantificación de nitritos se realizó espectrofotométricamente (Thermo Scientific Genesys-20) por el método de Griess a 550 nm empleando una curva estándar de nitrito de sodio 100 mM, con diluciones de proporción 1:10(v/v) en el buffer usado para las muestras

experimentales. En el cual se determinó la concentración de nitrito en las muestras experimentales para cada grupo utilizado.

6.8.2. DETERMINACIÓN DE CATALASA (CAT)

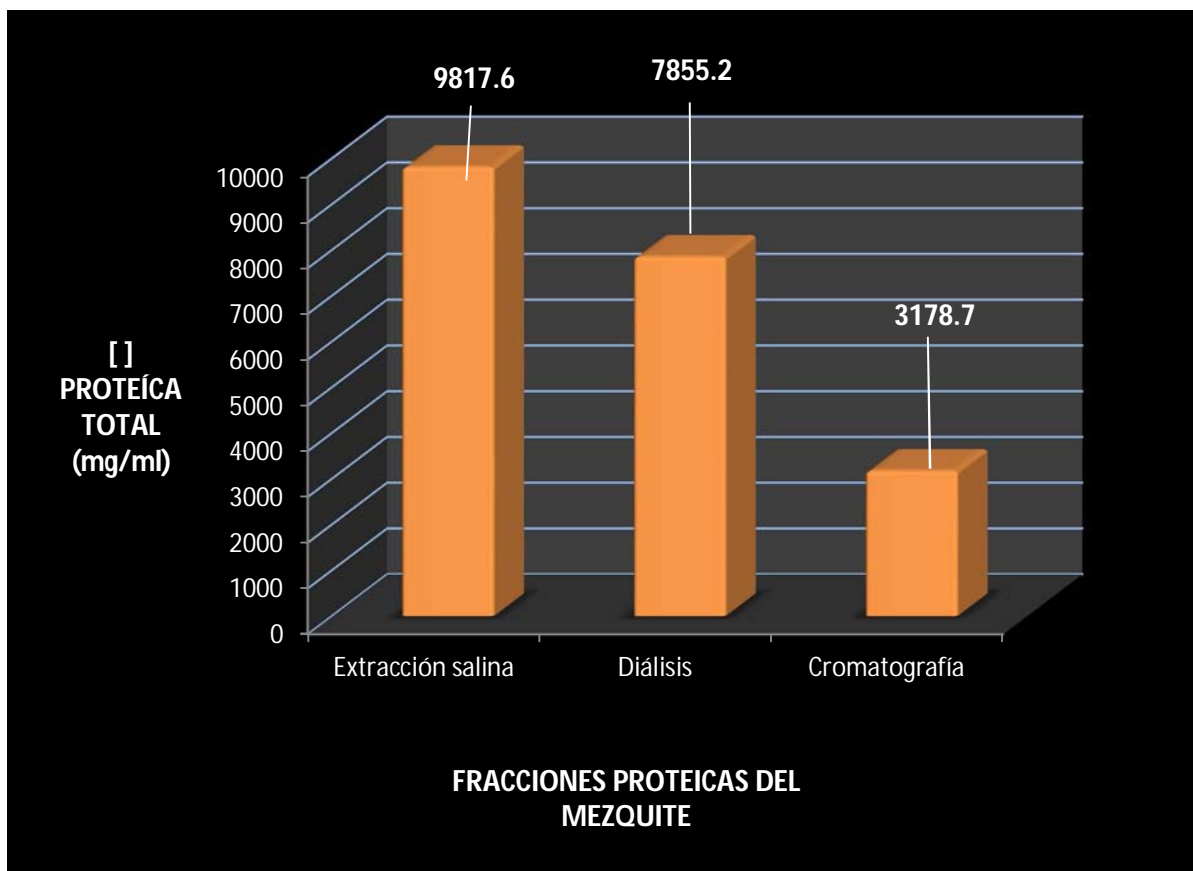
De acuerdo al método permanganométrico empleado por Baquero, L. Castro, J. y Narváz, C., (2005) con algunas modificaciones, se evaluó la mediante titulación H_2O_2 no descompuesto con Permanganato de Potasio ($KMnO_4$) estandarizado (10 mM) y un blanco mediante la adición de H_2SO_4 (ácido sulfúrico) (1:3) previa al extracto enzimático para desnaturalizar la enzima y detener la descomposición del H_2O_2 por parte de la enzima. Donde una unidad de actividad (UCAT) fue definida como los $\mu mol H_2O_2$ descompuesto/min. La actividad específica fue expresada en unidades de actividad por mg de proteína (UCAT/mg proteína).

6.8.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron sometidos a análisis estadístico de varianza, considerando un nivel de confianza del 95%. Los datos significativos fueron representados como ($p < 0.05$) (Marques Dos Santos, 2004).

VII. RESULTADOS

7.0. PROCESO DE EXTRACCIÓN Y SEMIPURIFICACIÓN



GRÁFICA 1. Concentración de proteínas en las diferentes fracciones proteicas de *Prosopis laevigata* su variación proteica en cada uno de los procesos de semipurificación.

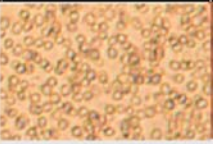







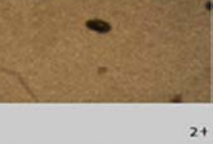



7.1. CUANTIFICACIÓN TOTAL DE PROTEÍNAS

Los resultados observados en la gráfica 1 muestran la cuantificación total de proteínas obtenidas en cada proceso de purificación. Podemos apreciar que durante los diferentes procesos de purificación (diálisis, cromatografía de afinidad) la concentración de proteínas fue disminuyendo. Lo cual indica que el extracto fue enriquecido con proteínas tipo lectina, lo cual se comprobó con el ensayo de hemaglutinación.

7.2. PRUEBAS DE HEMAGLUTINACIÓN



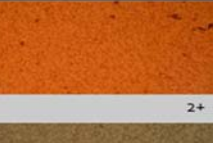
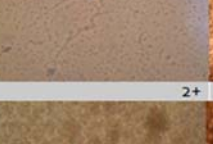


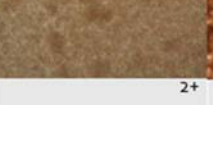


Las pruebas de hemaglutinación se realizaron en cada uno de los extractos en el sistema ABO⁺ humano mostrando los diferentes grados de hemaglutinación que se presentaron en la diferentes dosis del extracto enriquecido de lectinas de hoja de mezquite (Cuadros 7 - 12). Se pudo comprobar que las fracciones obtenidas después de la cromatografía eluida con glucosa presentan un mayor porcentaje de hemaglutinación.

7.2.1. PRUEBAS DE HEMAGLUTINACIÓN (120- 5 mg/ml)

EXTRACTO	O+	A+	B+
Control negativo PBS			
	0+	0+	0+
HOJA 1 (sin dializar y sin cromatografía)			
	2+	2+	2+
HOJA 2 dializado			
	2+	3+	2+
HOJA 3 cromatografía			
	2+	4+	2+

Grado de aglutinación
0+

Cuadro 7: Pruebas de hemaglutinación con concentración de 120 mg / ml.

EXTRACTO	O+	A+	B+
HOJA 1 (sin dializar y sin cromatografía)			
	3+	3+	2+
HOJA 2 dializada			
	2+	3+	2+
HOJA 3 cromatografía			
	2+	4+	4+

Grado de aglutinación
4+

Cuadro 8: Pruebas de hemaglutinación con concentración de 80 mg / ml.

EXTRACTO	O+	A+	B+
HOJA 1 (sin dializar y sin cromatografía)			
	2+	2+	2+
HOJA 2 dializada			
	2+	2+	2+
HOJA 3 cromatografía			
	3+	4+	2+

Grado de aglutinación
2+

Grado de aglutinación
4+

Cuadro 9: Pruebas de hemaglutinación con concentración de 40 mg / ml.

EXTRACTO	O+	A+	B+
HOJA 1 (sin dializar y sin cromatografía)			
	2+	2+	2+
HOJA 2 dializada			
	1+	3+	1+
HOJA 3 cromatografía			
	2+	4+	2+

Grado de aglutinación
1+

Grado de aglutinación
4+

Cuadro 10: Pruebas de hemaglutinación con concentración de 20 mg / ml

EXTRACTO	O+	A+	B+
HOJA ₁ (sin dializar y sin cromatografía)			
	2+	2+	2+
HOJA ₂ dializada			
	3+	3+	2+
HOJA ₃ cromatografía			
	3+	3+	2+

Cuadro 11: Pruebas de hemaglutinación con concentración de 10 mg / ml

Grado de aglutinación
3+

EXTRACTO	O+	A+	B+
HOJA ₁ (sin dializar y sin cromatografía)			
	2+	2+	2+
HOJA ₂ dializada			
	2+	2+	2+
HOJA cromatografía			
	2+	2+	2+

Cuadro 12: Pruebas de hemaglutinación con concentración de 5 mg / ml

Grados de aglutinación
2+

Los resultados muestran un mayor grado de aglutinación en el grupo sanguíneo A⁺ del extracto de hoja de mezquite con cromatografía, desde las concentraciones 120 mg/ml, - 20 mg/ ml, con un grado de aglutinación 4⁺ en la cual podemos observar que la aglutinación con pocas células libres, (como se puede observar en las imágenes cuadro 7-12) y menor grado de aglutinación en el grupo O⁺ con un grado de aglutinación general de 2⁺ (ver cuadros 7-12) . Por lo tanto los resultados presentados demuestran que existe un

mejor grado de aglutinación en las dosis altas (120 - 80 mg/ml,) que en dosis bajas (40-5 mg/ml,) conforme el proceso de purificación.

7.3. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Para la determinación del peso molecular de las proteínas obtenidas en los diferentes procesos de purificación se desarrolló una electroforesis SDS-PAGE al 12%. Los resultados obtenidos para esta se muestran en la figura 8.

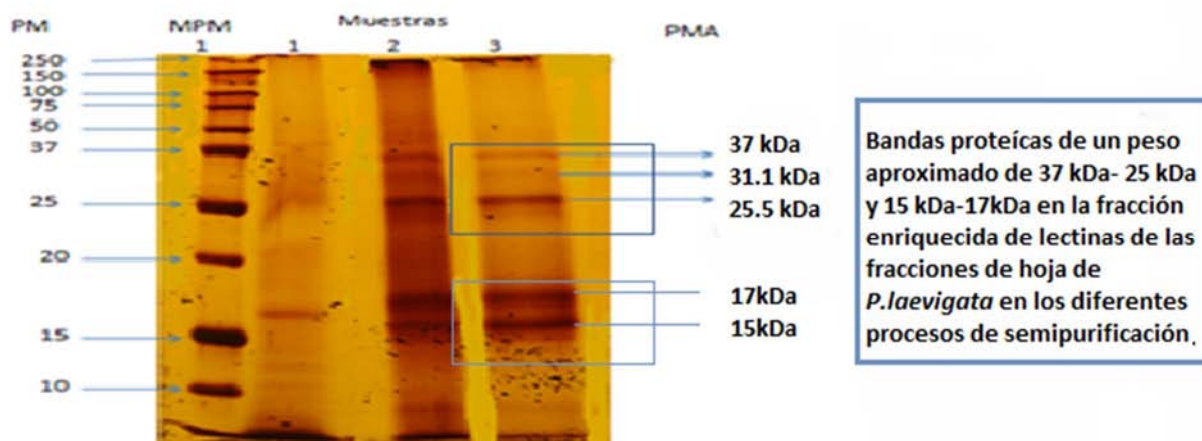


FIGURA 8: Electroforesis SDS-PAGE al 12% en el análisis de muestras en los diferentes procesos de semipurificación extracción salina (fracción no semipurificada) - cromatografía de afinidad. MPM (Marcador de Peso Molecular KDa). Muestra 1: Fracción no purificada; muestra 2: Fracción dializada y muestra 3: Fracción con cromatografía de afinidad. En el cual las muestras de hoja de mezquite 2 y 3 se observan la presencia de la lectina semipurificada enriquecidas que van de entre 15-20 kDa y de 25.5 -37 KDa.

7.4. EFECTO DEL OXÍDO DE NÍQUEL EN RATONES HEMBRA CD1

Los resultados muestran que 20 mg de polvo de óxido de níquel en 0.05 mL de aceite de oliva estéril, en una dosis única intramuscular en la parte de las mamas a ratones hembra CD1 a las 8 semanas de edad en un periodo de 4 semanas, produce tumoraciones en 5 ratones en la zona de aplicación y lesiones dérmicas en oreja, pata y abdomen (como se muestra en la figura 9).

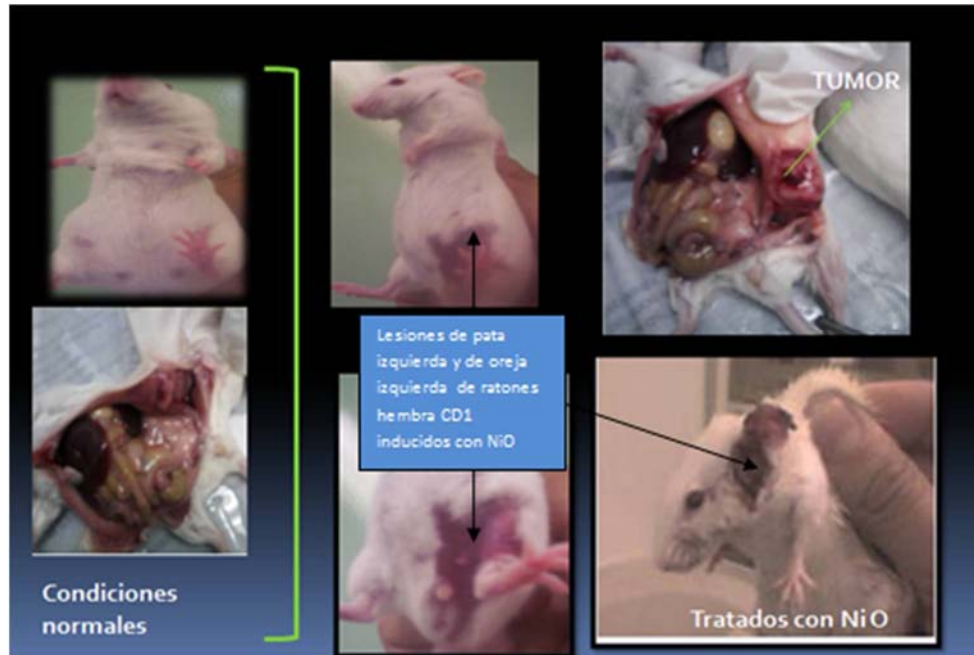


Figura 9: Efecto del óxido de níquel en ratones hembra CD1: En las imágenes de la figura se observan los efectos a corto plazo que produce el óxido de níquel al administrarse por vía intramuscular a ratones hembra CD1 de aproximadamente 8 semanas de edad durante 4 semanas de tratamiento. En las imágenes ubicadas al lado izquierdo superior e inferior se observan a los ratones hembra CD1 en condiciones normales sin ningún tratamiento y en la parte derecha las 4 imágenes muestran aquellos tratados con óxido de níquel con laceraciones tanto de la oreja, la parte superior de la pata y al disectar en la parte del abdomen (señalada con una flecha) se observa una masa extraña (tumor).

7.5. EFECTO DE LECTINAS DE HOJA DE *PROSOPIS LAEVIGATA* EN EL ANÁLISIS MACROSCÓPICO DE BAZO E HÍGADO DE RATONES HEMBRA CD1 TRATADOS CON ÓXIDO DE NÍQUEL

Los resultados muestran que de acuerdo a la dosis tomada de la DL50 de lectinas de *Viscum album* de 75mg/kg/día y de *Phaseolus vulgaris* de 200 mg /kg de peso corporal (Alonso, 2004 y Radberg *et al.* 2001) con algunas modificaciones para lectinas de hoja de *P. laevigata* a diferentes dosis: dosis baja 40 mg/kg/ml, dosis media 80 mg/kg/ml y dosis alta de 120 mg/kg/ ml, al ser administradas por vía oral en ratones hembra CD1. En la necropsia muestran tener efectos macroscópicos en órganos como bazo e hígado (figura 10).

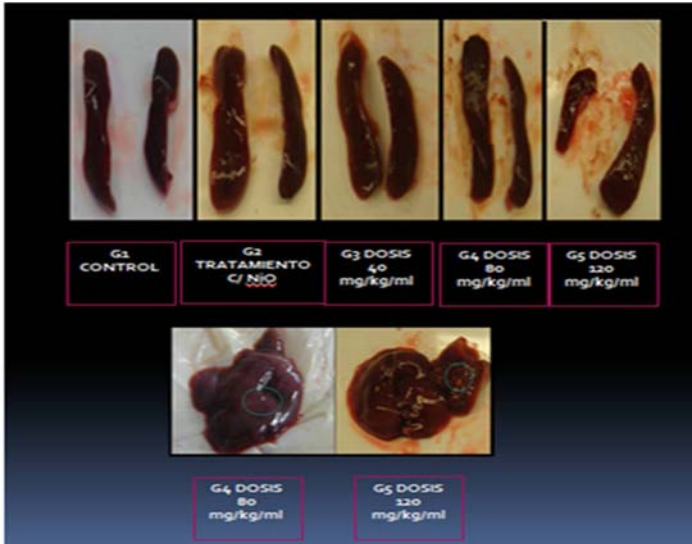
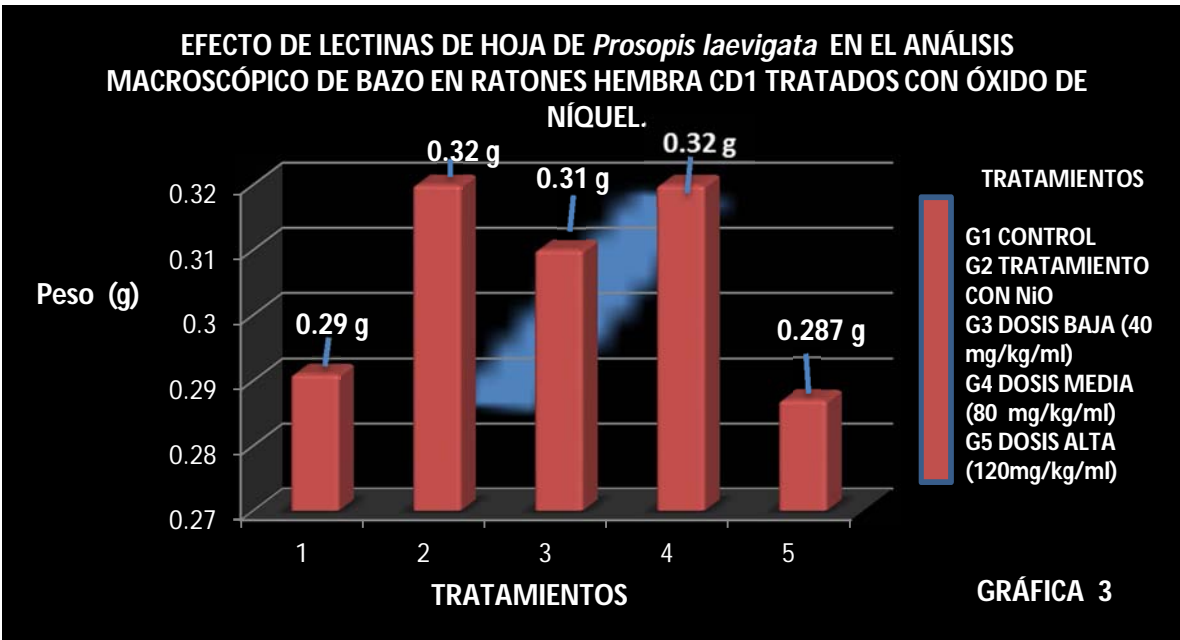


Figura 10: Efecto de las lectinas de hoja de *Prosopis laevigata* y su análisis macroscópico de bazo e hígado de ratones hembra CD1 tratados con óxido de níquel.



Gráfica 2 : Efecto de lectinas de hoja de *Prosopis laevigata* en el peso (g) de bazo de ratones hembra CD1 tratados con óxido de níquel.

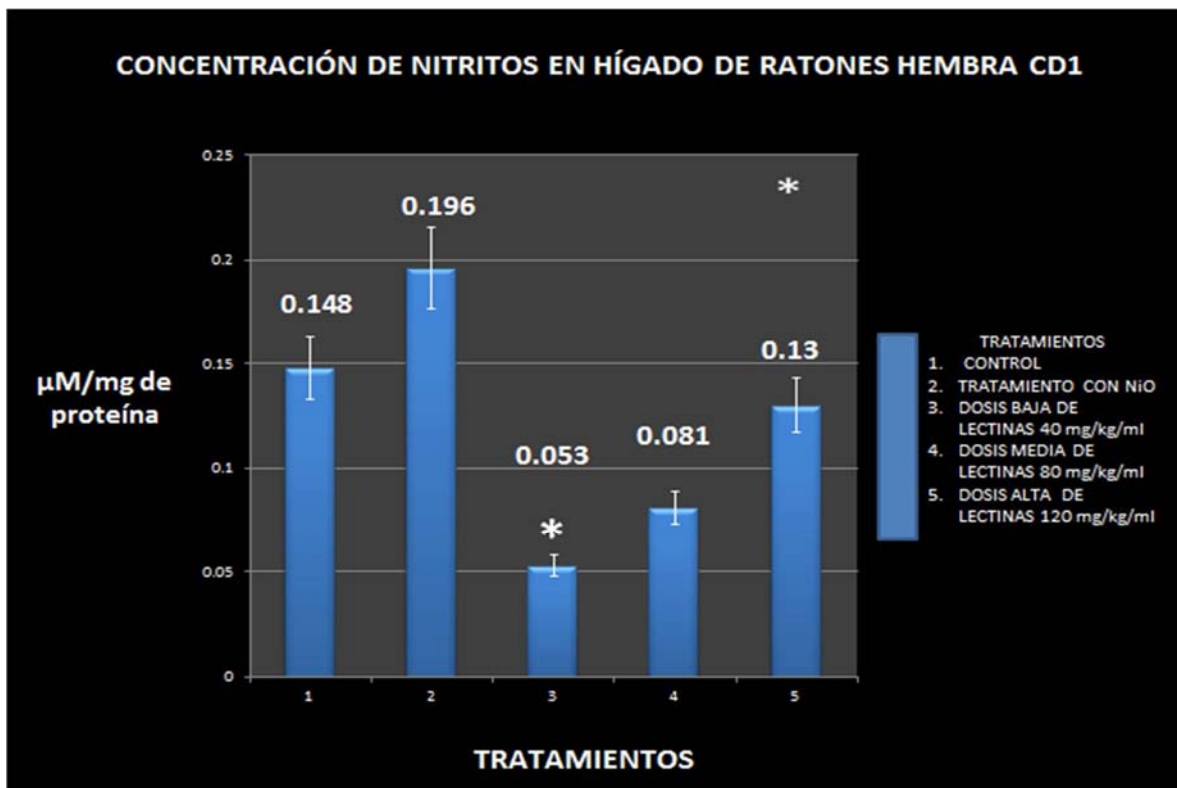


Gráfica 3: Efecto de lectinas de hoja de *Prosopis laevigata* en el peso (g) de hígado de ratones hembra CD1 tratados con óxido de níquel

En las imágenes se muestran los efectos del tratamiento oral de lectinas de hoja de *Prosopis laevigata* en sus diferentes dosis en el análisis macroscópico de bazo e hígado, donde se observaron las diferencias macroscópicas presentes en el tamaño de bazo con aumento de peso a dosis de 80 mg/kg/ml y 40 mg/kg/ml y el grupo tratado con NiO respecto al grupo control, como se puede observar en la gráfica 2. En hígado a dosis de 80 mg/kg/ml y 120 mg/kg/ml encontramos una diferencia en coloración, en cuanto al tamaño el grupo tratado con NiO presenta aumento en el peso a diferencia de las dosis de 80 mg/kg/ml y 120 mg/kg/ml que presentan una disminución de peso (gráfica 3) y apariencia como se puede observan en los óvalos anaranjados unos pequeños residuos (trazas) amarillo- verdosos adheridos a la membrana del hígado (figura 10).

7.6. DETERMINACIÓN DE MARCADOR DE ESTRÉS OXIDATIVO: CONCENTRACIÓN DE NITRITOS EN HÍGADO DE RATONES HEMBRA CD1

Para determinar la concentración de nitritos en hígado y plasma sanguíneo de ratones hembra CD1, se evaluó mediante el método espectrofotométrico de Griess. Los resultados mostrados en la gráfica 4-5 indican el comportamiento de la concentración de nitritos en hígado y plasma sanguíneo de los diferentes grupos de ratones hembra CD1, donde se observa un aumento significativo de la concentración de nitritos en hígado y plasma sanguíneo en el grupo perteneciente al control positivo (inducción con NiO) en comparación al control. Por el contrario los grupos tratados con el extracto enriquecido de lectinas de hoja de *P. laevigata* a diferentes dosis (40-120 mg/kg/ml) se observa una disminución de la concentración de este.

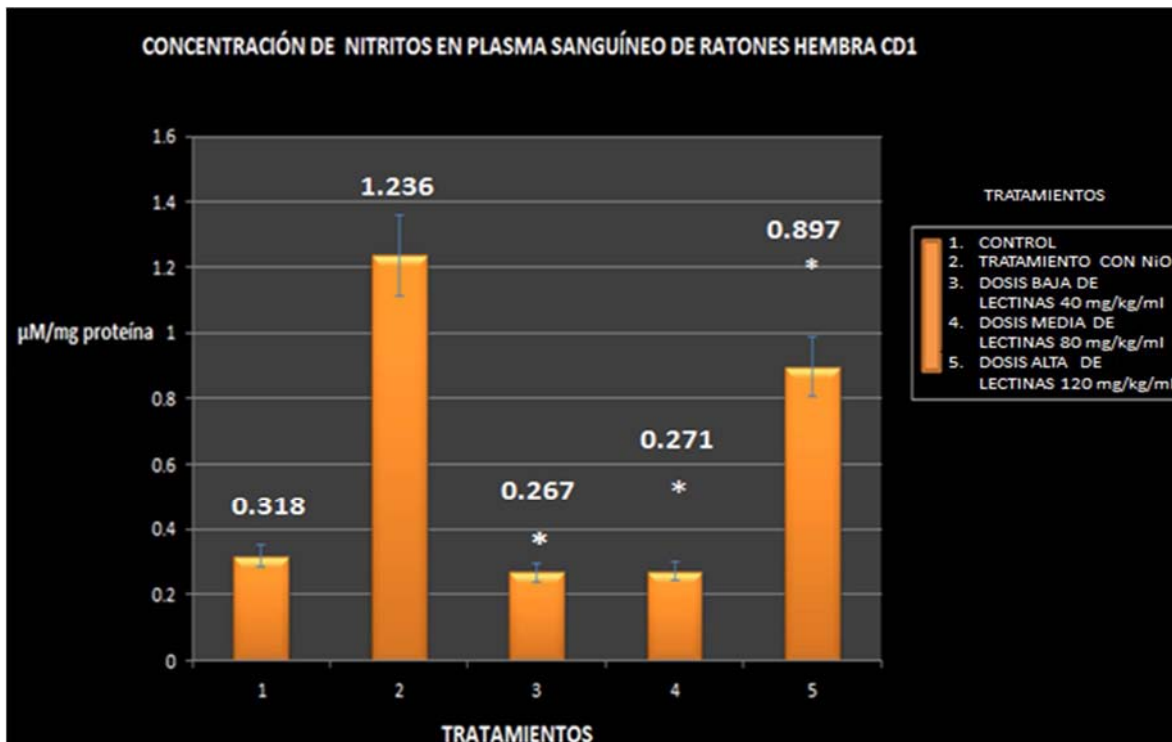


GRÁFICA 4: CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRITOS EN HÍGADO DE RATONES HEMBRA CD1. Tratamientos. 1: control negativo, 2: control positivo (inducción con NiO), 3: experimental (inducción de NiO + tratamiento con lectinas de hoja de mezquite dosis baja (40 mg/kg/ml), 4: experimental (inducción de NiO + tratamiento con lectinas de hoja de mezquite dosis media (80 mg/kg/ml) y 5: experimental (inducción de NiO + tratamiento de lectinas de hoja de mezquite dosis alta (120 mg/kg/ml). Concentración de nitritos (µM/mg de proteína) y valores de análisis estadísticos de varianza.

De manera general los resultados mostrados en la cuantificación de la concentración de nitritos en hígado indican un aumento significativo ($p < 0.05$) en la concentración de nitritos en el grupo 2 de ratones tratados con NiO (0.192 $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína) respecto al control (0.148 $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína). Por lo contrario, los grupos experimentales tratados con el extracto de lectinas de hoja de *P. laevigata* en sus diferentes dosis, encontramos que para la dosis de 40 mg/ml (0.052 $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína) y dosis de 80 mg/ml (0.081 $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína) disminuyen significativamente en comparación a este y de lo contrario la dosis de 120 mg/ml (0.13 $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína) aumenta la concentración de nitritos con respecto a las dosis bajas. Por lo tanto se observan variaciones entre tratamientos y la concentración de este radical para hígado respecto al control positivo y negativo (gráfica 4).

7.6.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRITOS EN PLASMA SANGUÍNEO DE RATONES HEMBRA CD1

En los resultados mostrados en la gráfica 5 se puede observar que el plasma sanguíneo de ratones hembra CD1 tratados con óxido de níquel y en el grupo 4 perteneciente a la dosis alta de 120 mg/ml, un aumento de la concentración de nitritos considerable al observado en el grupo 3 de dosis baja (40 mg/ml) y grupo 4 de dosis de 80 mg/ml, donde se aprecia una disminución de la concentración de nitritos comparable al grupo 1 control.

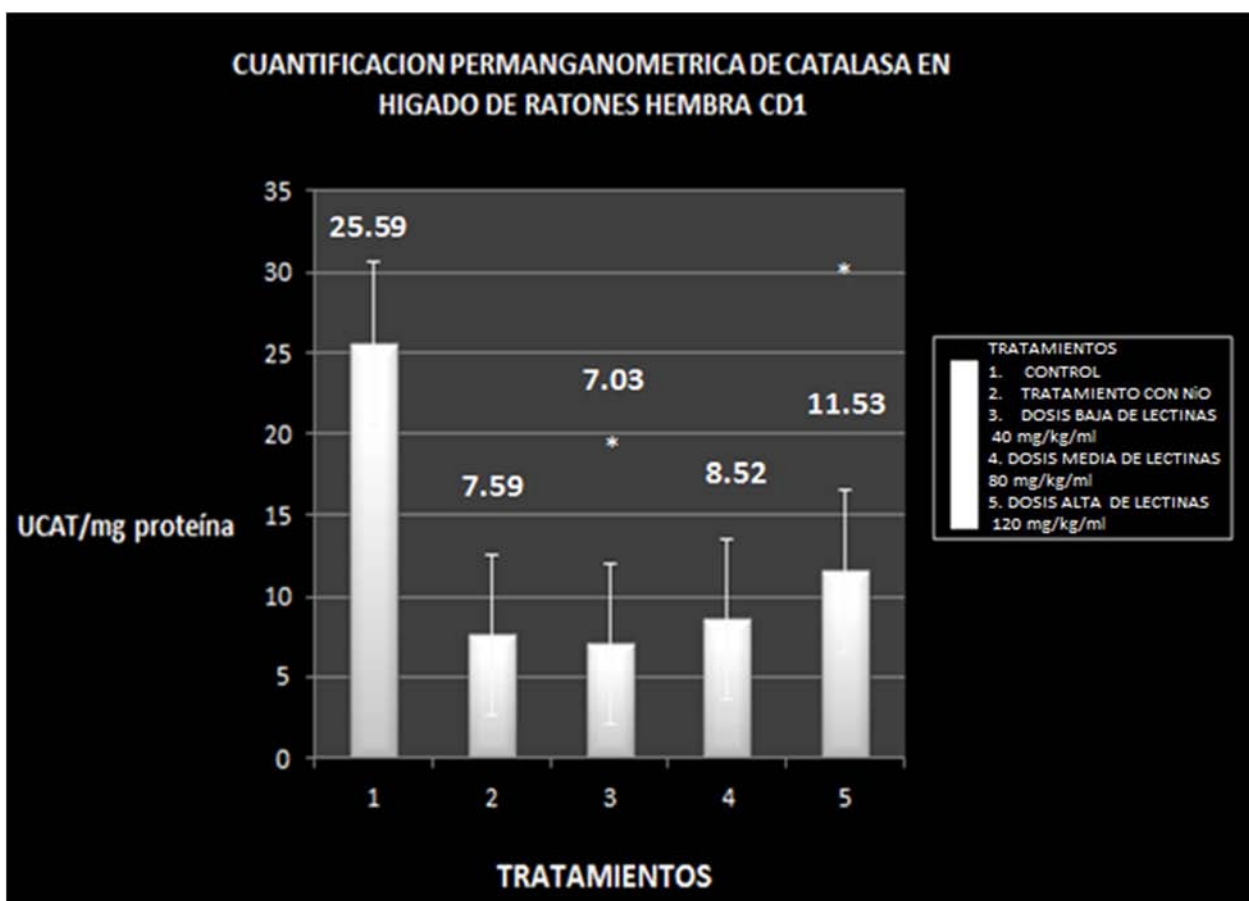


GRÁFICA 5: CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRITOS EN PLASMA SANGUÍNEO DE RATONES HEMBRA CD1. Tratamientos. 1: control negativo, 2: control positivo (inducción con NiO), 3: experimental (inducción de NiO + tratamiento con lectinas de hoja de mezquite dosis baja (40 mg/kg/ml), 4: experimental (inducción de NiO + tratamiento con lectinas de hoja de mezquite dosis media (80 mg/kg/ml) y 5: experimental (inducción de NiO + tratamiento de lectinas de hoja de mezquite dosis alta (120 mg/kg/ml). Concentración de nitritos (μM/mg de proteína) y valores de análisis estadísticos de varianza.

A partir de la evaluación de la concentración de nitritos en plasma sanguíneo de ratones hembra CD1 encontramos un aumento significativo ($p < 0.05$) de la concentración de nitritos en plasma sanguíneo en el grupo 2 inducido con NiO (1.236 μM/mg proteína) respecto al control como se observa en la gráfica 5, mientras que en los tratados con el extracto de lectinas de hoja de *P. laevigata* en sus diferentes dosis evaluadas, la dosis de 40 mg/ml (0.267 μM/mg proteína) y la dosis de 80 mg/ml (0.271 μM/mg proteína), disminuye significativamente la concentración de éste radical en el plasma sanguíneo con respecto al control negativo. En contraparte con la dosis de 120 mg/ml (0.897 μM/mg proteína) que muestra un aumento significativo de éste en comparación a los tratamientos de lectinas de hoja de mezquite a dosis menores.

7.7. CUANTIFICACION PERMANGANOMETRICA DE LA ACTIVIDAD DE CATALASA EN HÍGADO DE RATONES HEMBRA CD1

Para la cuantificación de catalasa se utilizaron las muestras de hígado de ratones hembra CD1, las cuales se evaluaron mediante el método de permanganométrico mediante la descomposición de peróxido de hidrogeno a diferentes tiempos de ensayo establecidos 0 - 12 min. En los cinco grupos que conforman el diseño experimental y los resultados se expresaron en U de actividad de catalasa/ mg de proteína, se obtuvieron los siguientes resultados (gráfica 6).



GRÁFICA 6. CUANTIFICACIÓN PERMANGANOMETRICA DE CATALASA (U CAT./mg de proteína) EN HÍGADO DE RATONES HEMBRA CD1. 1: control negativo, 2: control positivo (inducción con NiO), 3: experimental (inducción de NiO + tratamiento con lectinas de hoja de mezquite dosis baja (40 mg/ml), 4: experimental (inducción de NiO + tratamiento con lectinas de hoja de mezquite dosis media (80 mg/ml) y 5: experimental (inducción de NiO + tratamiento de lectinas de hoja de mezquite dosis alta (120 mg/ml). Concentración de la actividad de catalasa (U catalasa/mg de proteína) y los valores de análisis estadísticos de varianza.

Los resultados muestran una disminución significativa de la actividad de catalasa en hígado en el grupo 2 tratado con NiO (7.59 U CAT/ mg de proteína) con respecto al control negativo. Por otro lado, los grupos experimentales tratados con el extracto enriquecido con lectinas de *P. laevigata* a sus diferentes dosis muestran que para la dosis de 40 mg/ml (7.03 U CAT/mg de proteína) una disminución de la actividad de ésta y para las dosis de 80 mg/ml (8.52 U CAT /mg de proteína) y 120 mg/ml (11.53 U CAT /mg de proteína) respectivamente su aumento es poco significativo con la actividad de ésta enzima antioxidante en comparación control negativo.

VIII.- DISCUSIÓN.

Las plantas contienen numerosos componentes fisiológicamente activos o fitoquímicos benéficos en la prevención de una gran variedad de enfermedades y actualmente en base a estudios epidemiológicos indican que su consumo está fuertemente asociado con una reducción de riesgo en padecer ciertos padecimientos causados por el estrés oxidativo como son los diferentes tipos de cáncer (Block, G. Patterson, B. y Subar, A., 1992). Las lectinas han sido identificadas principalmente por sus propiedades aplicadas terapéuticamente contra este padecimiento, ya que estudios han reportado diversos efectos, ya sea como antitumorales tanto *in vitro* como *in vivo*, antiproliferativos y citotóxicos, estos distribuidos en una diversidad de plantas y líneas celulares de cáncer humano; para *Prosopis laevigata* principalmente en células tumorales de cáncer cervical humano (HeLa) (González de Mejía *et.al.* 2002).

De los métodos reportados para la obtención de lectinas la extracción salina propuesta por Villarrubia, *y col.* (1995) y Mendoza, *y col.* (2007), que se caracteriza por aumentar la fuerza iónica del medio y eliminar la capa de solvatación que presentan las proteínas, estableciendo una interacción proteína- proteína, además de obtener moléculas asociadas a lectina- carbohidratos (Hernández, *y col.* 2005). De los procesos de

semipurificación (diálisis y cromatografía), el primero retiene proteínas con un peso molecular mayor a 3kDa, eliminando las de menor peso y la cromatografía de afinidad permite la liberación del receptor y su actividad hemaglutinante propiciando una competencia entre el agente inhibidor y el ligando.

Los resultados obtenidos para la extracción salina y el proceso de purificación indican que la concentración proteica total de las fracciones de hoja de *P. laevigata* en la extracción salina es de 9817.6 mg/ml, siendo esta mayor en comparación con las diferentes fases del proceso purificación que disminuyen de forma significativa en cada proceso de lo cual se obtuvo el rendimiento de lectinas respecto a la concentración proteica de hoja del 6.17 % que se aproxima al rango establecido del 2-10% del total proteico (Hernández, y col., 1999).

Lo anterior nos estaría indicando que la extracción salina aplicada para hoja de mezquite probablemente traslada moléculas asociadas a carbohidratos relacionados directamente con lectinas vegetales. Y los procesos de purificación, como la diálisis estarían eliminando moléculas menores a 3kDa, dejando el contenido de distintas proteínas retenidas en la membrana y la cromatografía de afinidad estaría permitiendo la separación de mezclas proteicas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando, proporcionando proteínas con afinidad a distintos carbohidratos y la aplicación de glucosa en el método se sugiere para determinar la afinidad de la lectina a este carbohidrato, no descartando la posibilidad de afinidad de la lectina extraída de *P. laevigata* con otros carbohidratos.

Además de que el método establecido por Ganem y González, (2007), para la extracción y purificación de lectinas se basan en la solubilidad de las lectinas en soluciones acuosas o salinas y su capacidad de formar enlaces reversibles con la glucosa permitiendo que mediante la aplicación de este método el aislamiento de la lectina propicie a una elevada pureza. Lo que no prueba directamente que el extracto de hoja de *P. laevigata* presente

una elevada pureza después de la semipurificación. Sin embargo, se comprueba que la disminución de la concentración proteínica señala el enriquecimiento del extracto, posiblemente por el reconocimiento a varios sitios de unión a carbohidratos, no solo de glucosa y de diversas proteínas con actividad de lectina, para lo cual se tendría que comprobar su afinidad con otros carbohidratos.

Las lectinas poseen diversas propiedades entre las que encontramos la capacidad de reconocer de manera específica carbohidratos de la superficie celular o en suspensión proporcionando su capacidad de aglutinación. La aglutinación se define como la agregación sistemática de células mediadas por macromoléculas específicas que reconocen estructuras moleculares determinadas (antígenos), la cual va a depender del número de determinantes antigénicos y de su localización sobre las células. Esta propiedad se presenta en diversos tipos de células como linfocitos, espermatozoides, plaquetas, bacterias, células tumorales y eritrocitos (Castillo y Abdullaev, 2005 y Santoyo, *y col.* 2003).

Las membranas de los eritrocitos están formadas por capas de moléculas lipídicas, proteicas y carbohidratos, formando oligosacáridos y polisacáridos ligados a proteínas y lípidos, formando los grupos sanguíneos (Santoyo, *y col.* 2003).

La aglutinación de eritrocitos humanos es una de las principales propiedades de las lectinas, ya que algunas de estas pueden ser específicas en sus reacciones con todos los grupos sanguíneos de los alelos A, B y O y sus reacciones son utilizadas en la determinación del tipo sanguíneo (Hernández *y col.* 1999). La determinación del tipo sanguíneo está relacionado con la especificidad de las lectinas, la cual está mediada por la presencia de carbohidratos terminales en la superficie celular y la variación de carbohidratos presentes que están genéticamente codificados por tres alelos comunes (A, B y O) de una enzima glucotransferasa, donde el antígeno O sintetiza un glucano central común sin actividad enzimática, el alelo A transfiere una porción de N-

acetilgalactosamina terminal y el alelo B una porción de galactosa terminal (Santoyo, y col. 2003).

Las pruebas de hemaglutinación de lectinas de hoja de *P. laevigata* en plasma sanguíneo de los tipos ABO⁺ nos indican que los extractos obtenidos presentan fracciones enriquecidas de proteínas tipo lectina, en mayor o menor grado en las diferentes concentraciones y proceso de semipurificación, dando un efecto aglutinante en los diferentes tipos sanguíneos.

De las cuales las fracciones proteicas tomadas del extracto de hoja de mezquite, la mayoría presentó altos grados de aglutinación en el tipo A⁺ principalmente en las concentraciones de 120- 20 mg/ml, lo que supone que las lectinas extraídas de hoja de esta planta presentan una afinidad preferente a N-acetilgalactosamina, afinidad reportada para distintas lectinas como Haba de lima, trigo, *Ulex europeaus*, *Amaranthus caudatus*, *Chelidonium majus* y *Prosopis chilensis* (González de Mejía y Prisecaru, 2011, Micucci y Camps, 1987 y Ranea, y col. 2007), señalando de esta manera que este carbohidrato es responsable de la especificidad para este grupo sanguíneo preferentemente. Lo cual demostraría que la concentración del extracto tal vez es un determinante en la identificación de la actividad de distintos tipos de lectinas y la variación en el reconocimiento a distintos carbohidratos, de lo cual no ha sido determinado para las lectinas de *Prosopis laevigata*.

Las lectinas vegetales presentan pesos moleculares de 12-65 kDa, para lectinas de leguminosas de 25-30 kDa y para vaina de *Prosopis laevigata* entre 21.5 y 31.0 kDa (Hernández, y col. 2005 y Alegría-Ríos, F. García-Gasca, T. y Andrade- Montemayor, H., 2005).

En el caso de mezquite no se ha encontrado ningún reporte específico para hojas, sin embargo en este estudio se obtuvieron cinco proteínas con pesos moleculares de 15kDa, 17 kDa, 25.5 kDa, 31.1 kDa y 37 kDa aproximadamente que sobresalen de la última fase del proceso de purificación, indicando que se encuentran en el rango de peso establecido

para lectinas vegetales y por lo tanto el enriquecimiento del extracto con proteínas tipo lectina, por lo cual se requeriría establecer el tipo específico de lectina correspondiente a cada peso molecular, obtenido en cada una de las bandas proteicas para determinar cada una de estas.

Debido a sus propiedades específicas, las lectinas se han utilizado como herramientas en la bioquímica, biología celular, inmunología, genética y biomedicina con propósitos analíticos y preparativos, así como para el diagnóstico y terapia en el cáncer (Castillo y Abdullaev, 2005).

El cáncer es considerada como una Enfermedad Crónica No Transmisible (ECNT) en la que se implican una amplia gama de factores de los cuales, la exposición a diversos compuestos, principalmente metales que son conocidos como compuestos carcinogénicos pueden desencadenar un proceso carcinogénico (Limón –Pacheco y Gonssebat, 2009 Mendoza y Retana, 2009 y Valko *et.al.* 2005). El níquel y sus respectivos derivados (principalmente Ni_3S_2 y NiO) son considerados carcinogénicos para humanos y animales.

De lo estudiado para el óxido de níquel en sistemas *in vivo* de acuerdo a lo reportado por Ortiz, A. Castillo, R. y Beausoleil, I., (1995), del total de los ratones de las líneas consanguíneas IOR y Balb inoculados por única vez con este compuesto presentaron efectos carcinogénicos 52.5 % presentaron tumoraciones de los cuales el 100% mostraron ser neoplasias, además de procesos neumónicos y distróficos en hígado y bazo y la aparición de trazas de níquel en estado quiescente.

De lo anterior encontramos que del total de ratones tratados con NiO en comparación a lo reportado, 8.3% presentaron tumoraciones indicando la disminución del efecto del NiO en comparación a lo reportado, lo que podría señalar la existencia de variables no controladas durante las pruebas que pudieron afectar el modelo experimental, atribuidas por el compuesto como son, su cinética y homeostasis, lo cual nos indicaría que

probablemente el tiempo de inoculación del compuesto no es el suficiente, ya que el ratón estaría eliminando rápidamente el NiO de su sistema, por la principal vía de eliminación sugerida por Valko *et al.* (2005) evitando que la absorción de este sea insuficiente para que se concentre en el sistema y pueda provocar daños significantes que desencadenen a un proceso carcinogénico.

En cuando al aumentó en el tamaño de hígado y bazo, provocado por el compuesto utilizado y las lesiones dérmicas en orejas, patas y abdomen que demuestra el efecto reportado por Ortiz, A. Castillo, R. y Beausoleil, I., (1995), lo que sugiere que el efecto del NiO en bazo e hígado está causando distrofia y aumento de tamaño, que puede ser debido al reconocimiento del NiO como un antígeno extraño en el sistema, el cual se está tratando de eliminar mediante la acción detoxificantes del hígado en la sangre y en conjunto con el bazo, se está realizando una respuesta inmune a través de la sangre y de la producción de anticuerpos y otras células defensivas para el organismo con el fin de neutralizar la toxicidad en el sistema, además de posibles aumentos en los marcadores de inflamación que puedan estar causando la distrofia y el aumento de tamaño en estos órganos (Dick, C. *et al.* 2003).

Además de las consecuencias atribuidas al NiO en sistemas *in vivo*. Las lectinas también han sido consideradas por tener efectos tóxicos y antinutricios *in vitro* reduciendo el crecimiento celular e *in vivo* principalmente por unirse al tracto gastrointestinal al interferir en la absorción de nutrientes y en su resistencia a la digestión mediante las diferentes vías de administración tanto oral como intraperitoneal que han comprobado los efectos producidos al emplear diferentes concentraciones, perjudiciales principalmente cuando se suministran de forma inyectada; diversos estudios han reportado que tanto la administración oral como intraperitoneal de lectinas de frijol común *Phaseolus vulgaris* (PHA) por vía oral a dosis elevadas (0.5 g-1 g / kg de peso corporal) producen cambios atróficos en bazo (por vía intraperitoneal incremento de

peso) y en hígado una moderada reducción del peso (Pusztai y Bardocz, 1996 y Reynoso, R. González de Mejía, E. y Loarca-Piña, G. 2003).

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos de las lectinas extraídas de las hojas de *Prosopis laevigata* que mostraron principalmente una disminución de peso en hígado a concentraciones de 80 y 120 mg/kg/ml, con cambios de coloración y residuos amarillo-verdosos adheridos en su membrana y en el bazo un incremento de peso a concentraciones de 40 y 80 mg/kg/ml

Los efectos observados que presentaron las lectinas del mezquite en bazo e hígado, nos podría indicar que las dosis utilizadas son elevadas para ratones hembra CD1, por el daño macroscópico del bazo con un incremento en el peso que puede deberse a un estímulo de linfocitos requeridos por el sistema de defensa para contrarrestar la administración oral continua de esta lectina y en cuando al hígado la disminución del peso posiblemente se debe a que la lectina de *P. laevigata* este provocando pérdida de lípidos y glucógeno y por lo tanto no se detoxifican de manera eficaz, comprobando los posibles efectos tóxicos que tienen estas lectinas en las dosis utilizadas.

Todo esto sugiere que los resultados obtenidos hasta el momento demuestran el efecto del NiO y su relación con el nivel de radicales libres y el proceso carcinogénico.

El estrés oxidativo está implicado en la etiología del cáncer, resultado de un desequilibrio en la producción de EROS y las propias defensas antioxidantes celulares, esto se observa en la desregulación de la homeostasis REDOX, que promueve la formación de tumores mediante el inicio de una inducción aberrante de las redes de señalización que provocan la carcinogénesis que se caracteriza por la acción acumulativa de múltiples eventos en la célula en el cual se basa el estudio y el efecto de la exposición a carcinógenos químicos que dañan al ADN como el NiO y su relación con el estrés oxidativo que sobreproduce las EROS y las ERN a través de errores endógenos y exógenos, que en este caso su

sobreexpresión puede desencadenar un procesos de carcinogénesis y desregular la producción prolongada de oxidantes que pueden provocar mutaciones modificando la expresión génica para dicho proceso (Valko *et.al.* 2005).

El óxido nítrico es un radical que forma parte de las ERN, este contiene metabolitos estables conocidos como nitratos y nitritos, este último, se tiene documentado, que incluso bajas concentraciones son vasodilatadores *in vivo* cuando se implica en combinación con bajas concentraciones de oxígeno. Como tal, el nitrito posee varias funciones principalmente la de actuar como citoprotector contra el daño isquémico en una amplia gama de tejidos (Fassen, *et al.* 2009).

Con respecto a la evaluación de la concentración de nitritos en plasma e hígado, los resultados indican que el tratamiento con el extracto enriquecido de lectinas de hoja de *P. laevigata* para la concentración de nitritos en hígado presentan una diferencia significativa entre el grupo control y a los tratados con NiO, al igual que las dosis de 40 mg/kg/ml del tratamiento de lectinas de mezquite y de 80 mg/kg/ml. Sin embargo se muestra aumento significativo de la concentración en la dosis alta de lectinas (120 mg/kg/ml) en comparación a las dosis menores.

Cabe señalar que de acuerdo a los resultados anteriores, se ha reportado que la concentración de nitritos para este órgano aplicado para modelos *in vivo* es de 0.8-0.06 μ M (Fassen *et.al.* 2009 y Bryan *et.al.*, 2004) y su metabolizaciones por vía enzimática es lenta, ya que se lleva a cabo por hidrolisis a través de la enzima glutatione – nitrato orgánico reductasa y la conversión de nitratos en metabolitos desnitrogenados y nitritos inorgánicos, los cuales van a originar metabolitos hidrosolubles que son excretados en la orina (Albert, 1985 y Nogué, *y col.* 2008).

Lo que podría indicar que posiblemente las lectinas de *P. laevigata* en las dosis de 40 mg/kg/ml y 80 mg/kg/ml promuevan la estimulación de los diferentes sistemas

antioxidantes mostrando una protección contra el daño oxidativo generado por el tratamiento con NiO, sin embargo estaríamos observando que concentraciones de 120 mg/kg/ml aumentan la concentración de nitritos, ya que de acuerdo a estudios reportados las lectinas de *Phaseolus vulgaris* y *Canavalia ensiformis* de la familia de las leguminosas se le han reportado efectos mitogénicos en células T que afectan al tamaño del hígado que podría indicar principalmente la pérdida de lípidos y glucógeno que harían susceptibles al sistema al promover un mayor daño (López, C. 2008).

Para la concentración de nitritos en el plasma sanguíneo encontramos un aumento significativo en la concentración en el grupo tratado con NiO (1.236µM/mg de proteína), mientras que los grupos tratados con lectinas del extracto proveniente de las hojas de *P. Laevigata* en sus diferentes dosis de 40 mg/kg/ml y 80 mg/kg/ml presentan una diferencia significativa entre el tratamiento de NiO y al mismo tiempo este con el control, para la dosis de 120 mg/kg/ml observamos un aumento significativo en comparación a las dosis menores y al grupo control, en comparación a lo reportado para concentración de nitritos en plasma sanguíneo para sistemas *in vivo* en ratas Sprew- Dawley y Winstar es de 0.290 µM- 0.05 µM (Fassen *et.al.*, 2009 y Bryan *et.al.*, 2004) y a diferencia del modelo experimental utilizado en el estudio, observamos que existe poco aumento en la concentración de nitritos en el plasma sanguíneo, pero tomando en cuenta el modelo utilizado, los resultados arrojan diferencias significativas en los tratamientos que a diferencia del estudio referido se presenta poca diferencia con el control. Por lo tanto se podría establecer que debido a que la metabolización de dos tercios de nitritos en la dieta entran al estómago derivado de la reducción de nitrato salival, el nitrato ingerido es convertido a nitrito y procesado del intestino al torrente sanguíneo, lo que sugiere que este anión está siendo metabolizado durante el tránsito sanguíneo de arteria-vena, asociándose con el aumento de nitritos en plasma y en donde estos en la sangre están correlacionados con la formación de óxido nítrico en la hemoglobina tanto *in vivo* como *in vitro* y las diferencias que presentan el grupo control con los parámetros establecidos.

El aumento de concentración de nitritos en este sistema y la intervención de tratamiento de NiO, puede sugerir que de acuerdo a Valko *et.al.* (2005) y Fermín, y *col.* (2005) el NO_2^- este convirtiéndose rápidamente a NO_3^- en la sangre mediante la oxidación de la hemoglobina por el nitrito, bajo condiciones aeróbicas mediante la transferencia de un electrón del nitrito hacia la oxihemoglobina unida, se indicaría que este aumento pudiera estar influenciado por la proteína principal de transporte del níquel en la sangre, la albumina, ya que es la proteína que se encuentra en mayor proporción en el plasma sanguíneo.

Para los grupos tratados con el extracto enriquecido con lectinas de hoja del mezquite a dosis de 40 mg/kg/ml y 80 mg/kg/ml, disminuyen significativamente en la producción de nitritos en plasma en comparación con el tratamiento con NiO, lo que nos estaría indicando efectos moduladores presentes en las lectinas extraídas de hoja de *P. laevigata* de acuerdo a los estudios establecidos por Lee, S. y Blair, I. (2001) y Kyung, L. *et.al.* (2010) para estas glicoproteínas, esta modulación estaría interfiriendo con la producción de nitritos, y posiblemente en el daño oxidativo de otros radicales y tal vez en el desarrollo del proceso carcinogénico. Pero no, para la dosis de 120 mg/kg/ml en el cual nos muestra que esta concentración afecta negativamente al sistema provocando un aumento significativo de nitritos en comparación a las dosis menores utilizadas, lo que nos estaría señalando que a partir de este rango de dosis, se está provocando un efecto contradictorio al modulador para nitritos y otros radicales en este sistema propiciando el aumento de su producción y concentración.

Bajo condiciones fisiológicas normales las células captadoras balancean la producción de EROS con las defensas antioxidantes endógenas como las enzimáticas en las que se incluyen a la catalasa. Por otro lado las defensas antioxidantes son de gran utilidad para equilibrar los prooxidantes y los antioxidantes, ya que una disminución en la actividad de las enzimas de defensa antioxidante causa el incremento de EROS pues reportes señalan que cuando estas especies se acumulan contribuyen a la reducción de la actividad

enzimática antioxidante por un lado la catalasa que ejerce su acción sobre el peróxido de hidrógeno de forma muy eficaz (Díaz, 2003).

Al evaluar la actividad de la enzima catalasa en hígado los resultados indican que para el grupo control (25.59 UCAT/mg de proteína) con respecto al tratamiento con NiO (7.59 UCAT/mg de proteína) muestran una disminución en su actividad, lo cual indicaría que el níquel aumenta las EROS celulares por la implicación de éstas en la inhibición de la reparación del ADN, de la síntesis de glutatión y de la actividad de catalasa, por lo tanto se estaría potencializando el efecto y citotoxicidad de este compuesto, ya que la inhibición de la actividad de catalasa y glutatión peroxidasa puede aumentar el efecto que tiene este carcinógeno en la reincorporación del daño acumulado en las cadenas de ADN, por lo que se ha propuesto que el níquel puede unirse a las enzimas de reparación y generar radicales libres, que pueden causar la degradación de proteínas *in situ*, este daño irreversible a las proteínas está implicado en la reparación del ADN, su replicación, recombinación y transcripción que puede ser importante para los efectos tóxicos del níquel (Lynn *et.al.*, 1997).

Por lo que se sugiere que la disminución de la actividad de catalasa en hígado (descomposición de peróxido de hidrógeno) para el tratamiento con NiO estaría indicando que existe poca actividad detoxificante de esta enzima con posibles efectos negativos tanto a nivel proteínico como en el ADN, lo que podría estar generando la desregulación de la homeostasis REDOX que podría estar propiciando la formación y el aumento de EROS principalmente de peróxido de hidrogeno, radicales hidroxilo y oxígeno singlete, que particularmente se relacionan con este antioxidante, que tendría que reducir la elevación de estos prooxidantes para proporcionar la protección contra el estrés oxidativo que induce el níquel tanto en el sistema *in vivo* estudiado en este caso el hígado.

Para los resultados indicados para los grupos tratados con las diferentes dosis de los extractos enriquecidos con lectinas de la hoja de *P. laevigata* encontramos que para las

dosis de 40, 80 y 120 mg/kg/ml no existe una diferencia significativa entre los tratamientos en comparación con el tratamiento de NiO, en el cual podemos observar que para la dosis de 40 mg/kg/ml y 80 mg/kg/ml, la actividad de catalasa disminuye de manera poco significativa y en contraparte para la dosis 120 mg/kg/ml, aumenta la actividad de esta enzima.

Sin embargo, de acuerdo a los resultados encontrados se ha reportado que la concentración de la actividad de catalasa es diferente en los distintos órganos, en plasma su concentración es baja, activa en eritrocitos, ausente en cerebro (Evans, 1993, Nieto, 1993 y Ramón, 1993) y para hígado en humanos es de 5.0 U CAT/mg de tejido y en ratones de la cepa C3/HeJ con rangos que van de 27.26- 33.73 UCAT/mg de tejido (Helmut, 2014, Kaplan y Groves, 1972). En comparación a lo anterior con el grupo control de ratones hembra de la cepa CD1, encontramos que existe poca diferencia con respecto al rango reportado anteriormente.

Sin embargo la disminución de la actividad de catalasa en la dosis de 40 mg/kg/ml, nos podría estar sugiriendo que la dosis de lectinas no propicia la descomposición de peróxido de hidrógeno y otros prooxidantes que se pudieran estar originando, por lo cual se estaría disminuyendo la capacidad protectora de las lectinas contra la generación de radicales libres y el aumento poco considerable de la actividad de catalasa en las dosis de 80 y 120 mg/kg/ml, su aumento es poco significativo en comparación al control, lo que indica que existe un aumento de la actividad de la catalasa al aumentar la dosis del extracto de lectinas que señalaría el comportamiento dosis- dependiente de la actividad de catalasa y lectinas, ya que aunque no hay estudios que reporten la concentración de la actividad de catalasa para lectinas de mezquite, los resultados obtenidos señalan que en la catalización se está presentando la dismutación del peróxido de hidrogeno, pero esta no es la esperada para hígado, ya que como órgano detoxificador y de metabolización por excelencia se tendría que producir mayor oxidación-antioxidación que en otros tejidos, y por consiguiente mayor exposición al daño oxidativo. Estudios *in vivo* indican que el H₂O₂

es representativo en la detección de catalasa en hígado por ser un tejido rico en peroxisomas, y en cuando a mitocondrias al ser purificadas presentan una proporción alta de flujo de electrones que da lugar al H_2O_2 que conserva un orden de magnitud menor al 2% para el hígado (Chance, *et.al.* 1979 y Helmut, 2014).

Los efectos protectores contra el estrés oxidativo y detoxificantes en sistemas biológicos principalmente el hígado podrían estar relacionando los efectos protectores de lectinas de *P. laevigata* que estan basados en los estudios referidos por Castillo y Abdullaev, (2005) y Kyung, L. *et.al.* (2010) para las lectinas, lo cual comprobaría el efecto antioxidante de estas glicoproteínas y en específico para esta planta, la actividad antioxidante que pudiera estar relacionada con la concentración de lectinas y otros fitoquímicos como agentes prometedores con actividades protectoras contra el estrés oxidativo inducido por radicales libres.

Por lo que finalmente se comprueba que balance de Especies Reactivas de Oxígeno y los procesos de detoxificación para los primeros están modificados y para los segundos pueden estar modificados en las células cancerosas, sin embargo se requieren de otros factores para el inicio de este proceso en la célula, por lo cual se sugiere comprobar mediante la aplicación de otros métodos para validar la presencia y tipo de células cancerígenas. Además de que las lectinas extraídas de la hoja de *P. laevigata*, no comprueban si se está ejerciendo los efectos citotóxicos sobre estas células, pero se demuestra que la regulación de la concentración de nitritos es parcial y diferenciada, ya que depende del tejido u órgano a analizar en el sistema *in vivo* estudiado, por otro lado las lectinas extraídas de la hoja de mezquite disminuyeron los niveles de estos en los ratones comprometidos al proceso carcinogénico con NiO, pero en dosis específicas, lo cual requiere de la amplificación del estudio con la investigación de otros radicales libres y antioxidantes y el aumento de rangos de dosis que estén interviniendo en el proceso para determinar su efectividad y la participación de otros antioxidantes no solo de catalasa; y el efecto producido por la aplicación de lectinas a diferentes dosis, lo que nos

llevaría a comprobar el efecto del NiO y la relación específica en la activación del daño oxidativo tanto *in vivo* como *in vitro* y el mecanismo de acción específico por el cual las lectinas de esta planta podrían regularse contra el estrés oxidativo, lo que permitiría su aplicación como agente efectivo preventivo y natural contra este padecimiento para regular el daño oxidativo que provoca.

IX. CONCLUSIONES

1. Se comprueba la existencia de proteínas tipo lectina en *Prosopis laevigata* (mezquite) mediante las pruebas de hemoaglutinación en los sistemas sanguíneos ABO⁺.
2. Las lectinas extraídas de mezquite presentan mayor grado de aglutinación en el tipo sanguíneo A⁺ y menor aglutinación en el tipo O⁺, por lo tanto presenta una mayor afinidad a la N- acetilgalactosamina.
3. La hoja de mezquite (*P. laevigata*) presenta proteínas tipo lectinas de un peso molecular aproximado de 15-17 kDa y de 25.0 kDa- 31.1 kDa.
4. Se comprueba el daño dérmico y el efecto tumorogénico, además de aumento en la concentración de nitritos en plasma sanguíneo e hígado de ratón hembra CD1 al ser tratados con NiO.
5. Los efectos de extractos enriquecidos con lectinas de mezquite a concentraciones de 80 mg/kg/ml y 120 mg/kg/ml producen daño orgánico en bazo e hígado sin embargo existe una disminución del efecto oxidante, ya que a dosis bajas disminuyen satisfactoriamente la concentración de nitritos en plasma sanguíneo e hígado de ratón hembra CD1 tratados con NiO.
6. Y por lo tanto se demuestra que el proceso de detoxificación para catalasa al ser tratados con extractos enriquecidos con lectinas de hoja de *P. laevigata* en dosis de 120 mg/kg/ml en sistemas comprometidos a un proceso carcinogénico se encuentran modificados. Además de existir una estimulación del sistema

antioxidante y de detoxificación de catalasa en hígado de ratones hembra CD1 al ser tratados con los extractos enriquecidos de lectinas de mezquite, por lo tanto se comprueba una catalización de la dismutación de peróxido de hidrógeno.

X. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

1. Ahmad, V. U., Basha, A. and Haque, W. (1978). **"New alkaloids from *Prosopis juliflora*"**. *Z. Naturforsch*, **33**: 347-348.
2. Ahmad, A., Ali K. K., Ahmad V. U. and Qazi, S. (1986). **"Antibacterial activity of juliflorine isolated from *Prosopis juliflora*"**. *Planta Medica*. 1: 285-288.
3. Ahmad, V.U. Sultana, A. and Qazi, S. (1989). **"Alkaloids from the leaves of *Prosopis juliflora*"**. *Journal of Natural Products*. 52: 497-501.
4. Albert, L.A. (1985). **"Curso básico de toxicología ambiental: Nitratos y Nitritos"**. Sociedad Mexicana de Toxicología. Capítulo 17: 286-288.
5. Alderton, W.K. Cooper, C.E. and Knowles, R.G. (2001). **"Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition"**. *Biochem. J.* 357 593–615.
6. Alegría-Ríos FS, García-Gasca T, Andrade-Montemayor H. (2007). **"El tostado de la vaina de Mezquite (*Prosopis laevigata*) puede modificar el contenido de proteína y factores antinutricios"**. Memorias XXII Reunión Nacional sobre Caprinocultura. 37-38; 46-47.
7. Almaraz-Abarca, N. Delgado-Alvarado, A. Ávila-Reyes, J.A. Naranjo- Jiménez, N. y Herrera-Corral, J. (2003). **"Actividad Antioxidante de Extractos de Polen de Abeja"**

- Monoespecífico de Mezquite (*Prosopis sp.*)**". En: X Congreso Internacional de Actualización Apícola. Tlaxcala, Tlax. México. 43–49.
8. Alonso, J. (2004). **"Tratado de Fitofármacos y nutraceuticos: Curso anual de Fitomedicina"**. Modulo XXXIX. Corpus Ed. Rep. Argentina. 5-7 p.
 9. Aqeel, A. Khursheed, A. K. Viqaruddin, A. and Sabiha, Q. (1989). **"Antimicrobial activity of julifloricine isolated from *Prosopis juliflora*"**. *Arzneim. - Forsch. Drug Research*, 39: 652-655.
 10. Archer, S. (1993). **"Measurement of nitric-oxide in biological models"**. *FASEB J.* 7 349–360.
 11. Avello, M. y Suwalsky, M. (2000). **"Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular"**. Departamento de Farmacia. Facultad de Farmacia. Departamento de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción. *Atenea*. 494(II). Sem. 2006. 161-172 pp.
<http://www.scielo.cl/pdf/atenea/n494/art10.pdf>
 12. Bal, W. and Kasprzak, K.S. (2002). **"Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals"** *Toxicol. Lett.* 127(1-3): 55-62.
 13. Baquero, L. Castro, J. y Narváez, C. (2005). **"Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*): maduración y senescencia"**. *Acta Biológica Colombiana* 10 (2): 52-53.
 14. Batatinha, M.J. (1997). **"Investigations on toxic influences of *Prosopis juliflora* D.C. (Algarobeira) on cell cultures as well as on ruminal fermentation in cattle (*in vitro*)"**. Dissertação (mestrado)- Veterinary Medicine University, Hannover. 189 pp.

1. Beddowes, E., Faux, S. and Chipman, K. (2003). **"Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress"**. *Toxicology* 187: 101-115.
2. Beltrán, D. (2010). **"Determinación de niveles de aductos de malondialdehído en DNA de personas expuestas a contaminación por compuestos orgánicos volátiles en el ambiente y su relación con los polimorfismos genéticos CYP2E1, GSTM1, GSTT1 Y NQO1"**. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Tesis de licenciatura de Biología. 14- 17.
3. Bergendi, L. Benes, L. Durackova, Z. and Ferencik, M. (1999). **"Chemistry, physiology and pathology of free radicals"**. *Life Sci.* 65:1865–1874.
4. Block, G., Patterson, B., and Subar, A. (1992). **"Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence"**. *Nutr. Cancer*, **18**(1):1–29.
5. Borrás, C. Sastre, J. Garcia-Sala, D. Lloret, A. Pallardo F.V. and Vina, J. (2003). **"Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males"**. *Free Radic Biol Med* 34(5): 546-52.
6. Boveris, A. y Chance, B. C. (1973). **"The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen."** *Biochem. J.* 143: 707-716.
7. Bryan, N.S. (2006). **"Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? A systems-based review"**. *Free Radical Biology & Medicine* 41: 691–701.

8. Bryan, N.S., Rassaf, T., Maloney, R.E., Rodríguez, C.M., Saijo, F., Rodríguez, J.R., and Feelisch, M. (2004). **"Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: An insight into their nature and kinetics in vivo"**. *PNAS* 101(12):4308-4312.
9. Campos, M.G. (1997). **"Caracterizac-a~o do polen apicola pelo seu perfil em compostos fenolicos e pesquisa de algumas actividades biológicas"**. Tesis de doutoramento. Universidad de Coimbra. Portugal. 317 pp.
10. Castell, P.P. y Pérez de Alejo, J. (2000). **"Métodos para medir el daño oxidativo"**. *Rev. Cubana Med Milit* 29 (3): 192-198.
11. Castillo C y Adbullaev F. (2005). **"Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer"**. *Revista de Investigación Clínica*. 57(1):55-64.
12. Céspedes, E. Hernández, I. y Llópez, N. (1996). **"Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II Catalasa"**. *Rev. Cubana Invest. Bioméd* 15(2). 1-5.
13. Chance, B. Schoener, B. Oshino, R. Itshak, F. and Nakase, Y. (1979). **"Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals"**. *J. Biol. Chem.* 254(11): 4764-71.
14. Chen, F. Ding, M. Castranova, V. and Shi, X.L. (2001). **"Carcinogenic metals and NF-kappa B activation"**. *Mol. Cell. Biochem.* 222: 159-171.
15. Chrispeels, M.J. and Raikhel, N.V. (1991). **"Lectins, lectin genes and their role in plant defense"**. *The Plant Cell* 3:1-9.
16. Clemens, F. and Landolph, J.R. (2003). **"Genotoxicity of samples of nickel refinery dust"** *Toxicol. Sci.* 73:114-123.

17. Contreras, G. Meléndez, M. Zuñiga, A. Pasquetti, A. (2004). "**Antioxidantes y aterosclerosis**". *Rev. Endocrinología y Nutrición* 12 (4): 199-206.
18. Coogan, T.P. Latta, D.M. Snow, E.T. and Costa, M. (1989). "**Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds**". *Crit. Rev. Toxicol.* 19: 341–384.
19. Costa, F. Sampaio, A. Neves, S. Rocha, M. Benavides, M. and Freitas, A. (1999). "**Purification and characterization of a lectin from the red marine alga *Amansa multifida***". *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 5: 53-61.
20. Cruz, H. Licea, M. Hernández, P. Marcel, E. y Yanes, M. (2011). "**Estrés oxidativo y diabetes mellitus**". *Rev. Mex. Patol. Clin.* 58(1): 4-15.
21. Daetwler, P. Ott-Longoni, R. Schöpp, E. and Hesse, M. (1981). "**Over juliprosine, a further alkaloid from *Prosopis juliflora* A. DC**". *Helvetica Chimica Acta* 64: 1959-1963.
22. Denkhaus, E. and Salnikow, K. (2002). "Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity". *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42(1): 35-56.
23. Díaz, A. (2003). "**La estructura de las catalasas**". *REB.* 22 (2): 76-84.
24. Dick, C.A.J. Brown, D.M. Donaldson, K.; Stone, V. (2003). "**The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types**". *Inhal. Toxicol.* 15: 39-52.
25. Dreher, D. and Junod, A.F. (1996). "**Role of oxygen free radicals in cancer development**". *Eur. J. Cancer* 32A: 30–38.
26. Etzler, M. (1985). "**Plant lectins: Molecular and biological aspects**". *Annual Review of Plant Physiology.* 36:209-234.

27. Evans, R.M. Davies, P.J. and Costa, M. (1982). "Video time-lapse microscopy of phagocytosis and intracellular fate of crystalline nickel sulfide particles in cultured mammalian cells". *Cancer Res.* 42(7): 2729 -2735.
28. Fassen, E., Bahraim, S., Feelisch, M., Hogg, N., Kelm, M., Kim-Shapiro, D., Kozlov, A., Li, H., Lundberg, J., Mason, R., Nohl, H., Rassaf, T., Samouilov, A., Slama-Schwork, A., Shiva, S., Vanin, A., Weitzberg, E., Zweier, J. and Gladwin, M. (2009). "**Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology**". *Med Res Rev.* 29(5): 683–741.
29. Fermin, A., Tenorio, L., del Valle, L. y Pastelín, G. (2005). "**Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en fluidos biológicos**". *Rev. Mex. De Ciencias Farmacéuticas.* 36 (001): 31-32.
30. Fletcher, G.G. Rosetto, F.E. Turnbull, J.D. and Nieboer, E. (1994). "**Toxicity, uptake, and mutagenicity of particulate and soluble nickel compounds**". *Environ. Health. Perspect.* 102(3):69– 79.
31. Forstermann, U. Boissel, J.P. Kleinert, H. (1998). "**Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III)**". *FASEB J.* 12 773–790.
32. Foulkes, E.C. and McMullen, D.M. (1986). "**On the mechanism of nickel absorption in the rat jejunum**". *Toxicology.* 38(1): 35–42.
33. Freed, D. (1999). "**Do dietary lectins cause disease?**" *British Medical Journal.* 318:1023-1024.

34. Fridovich, I. (1974). "**Superoxide dismutase.**" *Adv. Enzymol.* 41: 35-97.
35. Fu, L. Zhou, C. Yao, S. Yu, J. Liu, B. and Bao, J. (2011). "**Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents**". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 43:1442-1449.
36. Gallardo, M. (1999). "**Laboratorio de toxicología (óxido nítrico: método de Griess)**". CIBIOR-IMSS. México.1-4.
37. Ganem, A. y González, O. (2000). "**Lectina concanavalina A: obtención y purificación**". Laboratorios Beterá.
38. Goebeler, M. Meinardus-Hager, G. Roth, J. Goerdts, S. and Sorg, C. (1993). "**Nickel chloride and cobalt chloride common contact sensitizers, directly induce expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and endothelial leukocyte adhesion molecule (ELCAM-1)**". *J. Invest. Dermatol.* 100: 759–765.
39. Goldberg, M.A. Dunning, S.P. and Bunn, H.F. (1988). "**Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein**". *Science.* 242(4884): 1412–1415.
40. González de Mejía, E. and Prisecaru, V. (2005). "**Lectins as bioactive plant proteins: A potencial in cancer treatment**". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 425-445.
41. González de Mejía, E., Rocha, N., Winter, H.C., and Goldstein, I.J. (2002). "**Differential effect of a lectin from mesquite (*Prosopis juliflora*) on HeLa and normal human keratinocyte cells**". *FASEB J.*, 15(4):C 128.

42. Halliwell, B. y Guteridge, J.M.C. (1990). **"Role of free-radicals and catalytic metal-ions in human-disease—an overview"**. *Meth. Enzymol.* 186: 1–85.
43. Helmut, S. (2004). **"Role of metabolic H₂O₂ generation:Redox signaling and oxidative stress"**. *J. Biol.Chem.* 289(13): 8735-41.
44. Hernández, P. Martín, O. Rodríguez, Y. y Ganem, F. (1999). **"Aplicaciones de las lectinas"**. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 15:91-96.
45. Hernández, P. Pérez, E. Martínez, L. Ortiz, B. y Martínez G. (2005). **"Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato"**. *Rev. de Educación Bioquímica.* 24(1):21-27.
46. Hohenhaus, A. E. (2000). **"Blood Banking and Transfusion Medicine. In: Ettinger, S. J.; Feldman, E. C. Textbook of Veterinary Internal Medicine"**. 5th edition. Edit. W B Saunders. Pennsylvania, E.E.U.U. 1: 348 – 356.
47. Kanthasamy, A. Subramanian, S. and Govindasamy, S. (1989). **"Bactericidal and fungicidal effects of *Prosopis juliflora* alkaloidal fraction"**. *Indian Drugs* 26: 390-394.
48. Kaplan, J.H and Groves, J.N. (1972). **"Liver and blood cell catalase activity of tumor-bearing mice"**. *Cancer Res.* 32: 1193.
49. Keshav,K. (2006). **"Oxidative stress, disease and cancer"**. London Imperial Collage Press; Hackensak New Jersey. 153 pp.
50. Kyung, L. Kyoung, A. K., Zhang, R., Kim, B.J., Kang, S.S. and Hyun, J.W. (2010). **"Mitochondria protection of baicalein against oxidative damage via induction of manganese superoxide dismutase"**. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 31(1): 233-241.

51. Lajolo, F. y Genovese, M. (2002). **"Nutricional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes"**. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 50: 6592-6598.
52. Lee, S.H., O, T.; Blair, I.A. (2001). **"Vitamin C-induced decomposition of lipid peroxides to endogenous genotoxins"**. *Science*. 292: 2083-2086.
53. Leonard, S.S. Harris, G.K. Shi, X.L. (2004). **"Metal-induced oxidative stress and signal transduction"**. *Free Rad. Biol. Med.* 37:1921–1942.
54. Liener, I.E. (1976). **"Phytohemagglutinins"**. *Annual Review of Plant Physiology* 27:291
55. Limón-Pacheco, J. and Gonsebatt, M.E. (2009). **"The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress"**. *Mutat. Res.* 31; 674(1-2):137-47.
56. Lis, H. and Sharon, N. (1998). **"Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins that mediate cellular recognition"**. *Chemistry Reviews*. 98:637–674.
57. Loft, S. Poulsen, H.E. (1996). **"Cancer risk and oxidative DNA damage in man"**. *J. Mol. Med.-JMM* 74 297–312.
58. López, C. (2008). **"Estudio sobre la toxicidad aguda y subcrónica vía oral de una lectina de Frijol Tépari"**. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias. Tesis de maestría en Nutrición Humana. 19,30 pp.
59. López, L.A. Fernando A. Lazarova, Z. Bañuelos V. y Sánchez R. (2012). **"Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades"**. *Rev. ANACEM* 6(1): 48-53.
60. Lynn, S. Yew, F.H. Chen, K.S. and Jan, K.Y. (1997). **"Reactive oxygen species are involved in nickel inhibition of DNA repair"**. *Environm. Mol. Mutagen.* 29: 208 216.

61. Maehle, L. Metcalf, R.A. Ryberg, D. Bennett, W.P. Harris, C.C. and Haugen, A. (1992). **"Altered p53 gene structure and expression in human epithelial cells after exposure to nickel"**. *Cancer Res.* 52(1): 218–221.
62. Márques Dos Santos, M. J. (2004). **"Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico-Biológicas: Capítulo 13. Análisis de Varianza"**. 2ª ed. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México. 337-380 p.
63. Mc Cord, J. M. Keele, B. B. (1974). **"An enzyme based theory of obligate anaerobius: the physiological function of superoxide dismutase."** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 41: 35-97.
64. Mc Vaught, R. (1997). **"Flora Novo- Galiciana: A descriptive account of the vascular plants of western Mexico"**. University of Michigan Press. Leguminosae. 5:240-243.
65. Mendoza, W., Gandolfo, L., Ponce, L., Novello, J., Marangoni, S. (2007). **"Estudios, estructura y función de una lectina aislada de *Casaelpinia spinosa kunze (Tara)***. *IDESIA*.(25)2:49-58.
66. Mendoza, V. y Retana, R. (2009). **"Estrés oxidativo e inflamación: Medición e interpretación diagnóstica"**. Universidad Nacional Autónoma de México. DGAPA, PAPIME. 1ª ed. México. 46-49.
67. Micucci, H. A. y Camps, E. (1987). **"Lectinas: Obtención, Estructura Química, Propiedades y Aplicaciones Diagnósticas y Farmacológicas"**. *Acta Farm. Bonaerense* 6 (1): 35-54.
68. Murshudov, G.N. Grebenko, A. Brannigan, J.A. Anston, A.A. Barynin, V.V. Dodson, G.G. Dauter, Z. Wilson, K.S. and Melik-Adamyán, W.R. (2002). **"The structures of**

- Micrococcus lysodeikticus* catalase, its ferryl intermediate (compound II) and NADPH complex". *Acta Cryst D58*: 1082-1972.**
69. Nielsen, G.D. and Flyvholm, M. (1984). **"Nickel in the Human Environment"**. Sunderman FW Jr, Ed., Lyon: International Agency for Research on Cancer. 333-338.
70. Nogué, S., Antolin, A., Claramonte, X., Chavarín, A., Galicia, M., Balanzó, X. y Amigó, M. (1990). **"Urgencias por sobredosis de drogas de abuso: Poppers"**. Sección de Toxicología Clínica y Servicio de Urgencias. Clinic Barcelona. Hospital Universitario. 82-84.
71. Ortíz, A., Castillo, R. y Beausoleil, I. (1995). **"Carcinogénesis por óxido de níquel en 2 líneas de ratones consanguíneas"**. *Rev. Cubana de Oncología*. enero-junio (1):16-20.
72. Ott-Longoni, R. Viswanathan, N. and Hesse, M. (1980). **"The structure of the alkaloid juliprosopin from *Prosopis A. DC. juliflora A. DC.*"**. *Helvetica Chimica Acta* 63: 2119-2129.
73. Palmer, H.J. Paulson, K.E. (1997). **"Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression"**. *Nutr. Rev.* 55:353-361.
74. Pekarkova, I. Parara, S. Holecek, V. Stopka, P. Trefil, L. Racek, J. and Rokyta, R. (2001). **"Does exogenous melatonin influence the free radicals metabolism and pain sensation in rat?"** *Physiol. Res.* 50: 595-602.
75. Pérez-Pérez, J. (2000). **"Métodos para medir el daño oxidativo"**. *Rev. Cubana Med. Milit.* 29(3): 8-192.
76. Poli, G. Leonarduzzi, G. Biasi, F. and Chiarpotto, E. (2004). **"Oxidative stress and cell signaling"**. *Curr. Med. Chem.* 11:1163-1182.

77. Pusztai, A. y Bardocz, S. (1996). **"Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications"**. *Trends Glycosilation and Glicotechnology* 8:149-165.
78. Radberg, K. Biernat, M. Linderoth, A. Zabielski, R. Piersynowski, G. and Westrom, B. (2001). **"Enteral exposure to crude red kidney bean lectin induces maturation of the gut in suckling pigs"**. *Journal of Animal Science*. 79: 2669-2678.
79. Rambaruth, N.D. Dwek, M.M. (2011). **"Cell surface glycan-lectin interactions in tumor metastasis"**. *Acta Histochem*. 113(6): 591-600.
80. Ramos, M., Batista, C., Gómez, B., Zamora, A. (2006). **"Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes"**. *Investigación en Salud* (8):1-4.
81. Ranea, G. Fernando, A. Ricco, R. Gurni, A. y Wagner, M. (2007). **"Hemoaglutinina que fija N-ACETIL-D-GALACTOSAMINA (GalNAc) en *Prosopis chilensis* –Mimosaceae."** *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 6:(6).360-361.
82. Refvik, T. and Andreassen, T. (1995). **"Surface binding and uptake of nickel(II) in human epithelial kidney cells: modulation by ionomycin, nicardipine and metals"**. *Carcinogenesis*. 16(5):1107–1112.
83. Reynoso, R., González de Mejía, E., Loarca-Piña, G. (2003). **"Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*)"**. *Food and Chemical Toxicology* 41(1): 21-27.
84. Rhodes, J. M. (1999). **"Beans means lectins"**. *Gut* 44: 593-594.

85. Rocha, N. Salazar-Olivo, L.A. Abdullaev, F. and González de Mejía, E. (1999). **"The hemagglutinating and cytotoxic activities of extracts from Mexican legumes on human tumor cells"**. In: Whitaker JR, Haard NF, Shoemaker CF, Singh RP (eds.). *The proceeding of the 3rd. International Conference Food for Health in the Pacific Rim. Connecticut: Food & Nutrition Press.* 420-426.
86. Rodríguez, R.E. Misra, M. North, S.L. Kasprzak, K.S. (1991). **"Nickel-induced lipid peroxidation in the liver of different strains of mice and its relation to nickel effects on antioxidant systems"**. *Toxicol. Lett.*, 57: 269–281.
87. Rojas, C. Del Val, E., Carabias, J. y Fanjul, L. (1994). **"Mezquite (*Prosopis spp.*): Cultivo alternativo para las zonas áridas y semiáridas de México"**. Instituto Nacional de Ecología. 1ª edición. México. 7-19.
88. Rudinger, H. Rouge, P. (1998). **"Structure and Function of plant lectin"**. *Carbohydrate Eur.* 23:16-22.
89. Rzedowski, J. (1988). **"Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* en Norteamérica"**. *Acta Botánica Mexicana.* 3:7-19.
90. Rzedowsky, G. y Rzedowsky, J. (2010). **"Flora fanerogámica del Valle de México"**. CONABIO. Instituto Nacional de Ecología. 258-259.
91. Sáenz, G. (2002). Hematología. Morfología y Bioquímica hematológica. Editorial Universidad de Talca. 1ª ed. Chile. 19-25 pp.
92. Salnikow, K. Su, W. Blagosklonny, M.V. and Costa, M. (2000). **"Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism"**. *Cancer Res.* 60 (13): 3375–3388.

93. Santoyo, V., Mendiola, E., Blanco, A. y García, T. (2003). **"Afinidad de fracciones concentradas de lectinas de Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) por eritrocitos humanos"**. CINVESTAV-Irapuato. Facultad de Química. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. Departamento de Bioquímica y Biotecnología de Plantas.1-4.
94. Shankarmurthy, P. and Siddiqui, S. (1948). **"Antibiotic activity of leaf extracts of *Prosopis juliflora*"**. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 7: 188.
95. Sharon, N. y Lis, H. (2004). **"History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules"**. *Glycobiology* 14(11): 53-62.
96. Stohs, S.J. and Bagchi, D. (1995). **"Oxidative mechanisms in the toxicity of metal-ions"**. *Free Rad. Biol. Med.* 18 321–336.
97. Tanaka, I. Ishimatsu S. Matsuno, K. Kodama, Y. and Tsuchiya, K. (1985). **"Biological half time of deposited nickel-oxide aerosol in rat lung by inhalation"**. *Biol. Trace. Element. Res.* 8:203-210.
98. Tareq al-Ati, (2001). **"Plant lectins. Poisonous Plants Homepage: Animal Science at Cornell"**. University. <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/lectins.html>.
99. Thannickal, V.J. and Fanburg, B.L. (2000). **"Reactive oxygen species in cell signaling"**. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279:L1005–L1028.
100. Valko, M. Morris, H. and Cronin, M.T.D. (2005). **"Metals, toxicity and oxidative stress"**. *Curr. Med. Chem.* 12:1161–1208.

101. Valko, M., Rhodes C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). **"Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer"**. *Chemico-Biological Interactions* 160: 1–40.
102. Villarrubia, O. Dubet, M. Menéndez, J. De la Fuente, J. y Noa, E. (1995). **"Estudios de 2 preparados de fitohemaglutinina obtenidos por diferentes métodos"**. *Rev. Cienc. Biol.*
103. Viña J. (1990). **"Glutathione: Metabolism and Physiological Functions"**. CRC Pres, Boston. 1-31.
104. Walker, J. (2002). **"The protein protocols handbook"**. Humana Press. 2nd edition. *University of Hertfordshire, Hatfield, UK.* 57-60.
105. Wassel, G.M. Rizk, A.M. Abdel-Bary, E.F. (1972). **"Phytochemical investigation of *Prosopis juliflora* DC. Flavonoids and free sugars"**. *Plant Foods for Hum. Nutri.* 22(1):119-121.
106. Weghorst, C.M. Dragnev, K.H. Buzard, G.S. Thorne, K.L. van Deborne, G.F. Vincent, K.A. and Rice, J.M. (1994). **"Low incidence of point mutations detected in the p53 tumor suppressor gene from chemically induced rat renal mesenchymal tumors"**. *Cancer Res.* 54(1): 215–219.
107. Wiermann, R. Vieth, K. (1983). **"Outer pollen wall, an important accumulation site for flavonoides"**. *Protoplasma* 118: 230–233.
108. Zamacona- Montañez, X. D. y Castro, E. (2010). **"Identificación y obtención de alcaloides en variedades de mezquite (*Prosopis juliflora* y *Prosopis pallida*)"**. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. División de Ciencias

Naturales y Exactas Departamento de Farmacia campus Guanajuato. Universidad
Autónoma de Guanajuato. Memorias del Programa Verano de la Ciencia 2010. 1-4.