



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

“Efecto de las lectinas de tallo de *Ruta graveolens* L. en un modelo murino de cáncer.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

AMAIRANY TORRES ALVAREZ



**FES
ZARAGOZA**

**DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ**

México ., D.F

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Molecular, L-7 Planta Alta de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental (UMIEZ) FES Zaragoza, UNAM; bajo la dirección de la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que la alumna **TORRES ALVAREZ AMAIRANY**, con número de cuenta **411079422**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **03 de noviembre** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** DR. BENNY WEISS STEIDER
- VOCAL** M. en C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ
- SECRETARIO** Dra. LETICIA MORALES LEDESMA
- SUPLENTE** M. en IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ
- SUPLENTE** M. en C. ITZEN AGUIÑIGA SÁNCHEZ

El título de la tesis que presenta es: **Efecto de lectinas de tallo de *Ruta graveolens* L. en un modelo murino de cáncer.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI BAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 19 de octubre de 2015

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

Agradecimientos

A mis padres, por hacer de mí quien soy y quien quiero ser, por seguir apoyándome sin importar que tan difícil fuera el camino y por todos los sacrificios hechos hasta ahora, incluso aquellos que ignoro. Gracias por estar.

A la UNAM y a la FES Zaragoza, que me abrió las puertas a un mundo nuevo lleno de conocimiento y oportunidades de ser mejor día a día, tanto en el ámbito académico, como personal.

A todos mis profesores que en cada paso y nivel educativo me guiaron con paciencia y cuidado, transmitiendo su pasión y conocimientos con el objetivo de formar profesionales capaces de enfrentar retos reales y solucionar cualquier problema con fundamentos y de actuar de forma humana y empática ante el dolor ajeno.

A la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez, por todo el tiempo que amablemente ha dedicado a mi formación, por toda su paciencia y por el conocimiento que me ha transmitido. Gracias por impulsarme a superar mis límites y ser más de lo que creí ser y generarme el deseo de llegar cada vez más lejos, por ayudarme a fortalecer la confianza en mis capacidades y usar mis limitaciones como un pretexto para mejorar.

Al M. en C. Ernesto Mendoza Vallejo, por todos sus consejos, por esa forma tan conciliadora que tuvo de manejarse en los momentos difíciles de la formación, por ayudarme a utilizar mi energía en ocuparme más que en preocuparme y estresarme.

A la Bióloga Laura C. Flores García, por todo su tiempo, su apoyo y sus consejos, que fueron de gran ayuda en el desarrollo de mi trabajo y mi formación como miembro de la comunidad científica.

A mis sinodales, Dr. Benny Weiss Steider, Dra. Leticia Morales Ledesma, M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez y M. en C. Itzen Aguiñiga Sánchez, por el tiempo y conocimiento con el cual contribuyeron a mejorar la calidad y el contenido de mi trabajo.

Dedicatorias

A mis padres, por hacerme ser lo que soy, por apoyarme en todos mis proyectos y ayudarme a llevarlos de forma satisfactoria hasta las últimas consecuencias, de forma satisfactoria siempre. A mi madre por darme ánimos y confiar en mí de la forma en que lo hace, y a mi padre por todo el sacrificio que hace y en el cual encuentra la forma de expresar todo el amor que nos tiene, y por la forma que tiene de hacer saber cuán orgulloso se siente.

A mi hermanito, Raúl, por todo su apoyo, por ser mi compañero de aventuras y de problemas, por acompañarme en todo momento, bueno o malo, sé que en ti tengo un apoyo incondicional y tú lo tienes en mí. Realmente soy afortunada de tener un hermano como tú.

A Alondra, sé que eres muy pequeña aún para entender esto, y que en muchos años estarás indiferente a lo que está escrito aquí, pero quiero que sepas que trataré de ser un ejemplo adecuado para ti, quiero ser fuente de inspiración y deseos de crecer para ti, que eres mi adoración.

A Donovan, gracias por tu cariño, por tu apoyo y comprensión en esto que es el inicio de mi camino profesional, gracias por estar a mi lado y darme consejos, por animarme en mis puntos buenos y motivarme a corregir los malos. Gracias por ayudarme a crecer y crecer a mi lado.

A Yolanda, por ayudarme a poner en perspectiva mis problemas para transformarlos en oportunidades, por guiarme en todo el camino que me ha acompañado, por ayudarme en la construcción de mis opiniones, de mi criterio, mi autoimagen y mi actitud.

A mis amigos Carlos, Alejandro, Karla, que crecieron junto a mí como profesionales y como personas, con quienes pasé de estudiante a un adulto más capaz de enfrentar la vida con todas las herramientas disponibles y de crear las herramientas de ser necesario, y a la vez con quienes puedo tratar cualquier tema con confianza y honestidad, por permitirme disfrutar los momentos agradables con ustedes y hacer más soportables los momentos desagradables.

A mis niñas, Karen, Martha, Eunice y Lupita, gracias por permitirme formar parte de un grupo tan diverso de opiniones y perspectivas, y a la vez, tan sólido que ha soportado el paso del tiempo. Ustedes son la familia a la cual yo he elegido.

A todas esas personas que conviven conmigo fuera de la escuela cotidianamente, especialmente a mis compañeros de entrenamiento, profesor Martín y Lupita, gracias a todos ustedes puedo ver mi vida como algo más allá de lo académico, sin perder de vista que soy el conjunto de todo lo que haga y decida, y que puedo hacer tanto como me proponga, por formarme como un ser competitivo y capaz de forzar los límites de sí.

A mis compañeros de laboratorio que en cada paso me dieron ánimos para seguir adelante, por sus consejos y en general, por toda su ayuda.

Finalmente, y de forma muy especial, a Mateo, desearía no tener que escribir una línea especial para ti, y poder escribirlo junto a los demás. Gracias por haber estado, por compartir parte de tu camino con nosotros y por esos momentos tan llenos de ti, de tu actitud y de tu humor tan contagioso. A partir de aquí nosotros nos encargaremos de lo que tú no lograste concluir. Sé que habrías logrado grandes cosas.

Índice

| | |
|--|----|
| Abreviaturas | 1 |
| Resumen | 3 |
| Marco teórico | 4 |
| 1. Estrés oxidativo | 4 |
| 1.1 Causas | 4 |
| 1.2 Efectos | 5 |
| 1.3 Sistema antioxidante | 6 |
| 2. Cáncer | 10 |
| 2.1 Definición | 10 |
| 2.2 Características | 10 |
| 2.2.1 Marcadores de superficie | 11 |
| 2.3 Clasificación | 12 |
| 2.4 Epidemiología | 12 |
| 2.5 Terapias aplicadas actualmente | 12 |
| 3. Glándula mamaria | 14 |
| 3.1 Embriología de la glándula mamaria | 14 |
| 3.2 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria sana | 14 |
| 3.3 Cáncer de mama | 16 |
| 3.3.2 Factores de riesgo | 17 |
| 3.3.3 Epidemiología | 18 |
| 3.3.4 Tratamiento | 18 |
| 4 Lectinas | 19 |
| 4.1 Características y clasificación | 19 |
| 4.1.1 Lectinas vegetales | 19 |
| 4.1.1.1 Estructura | 19 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1.1.1.1 Lectinas aisladas de leguminosas..... | 20 |
| 4.1.1.1.2 Lectinas con dominios tipo heveína o específicas de quitina..... | 21 |
| 4.1.1.1.3 Lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa..... | 21 |
| 4.1.1.1.4 Lectinas en forma de prisma β o del tipo jacalina..... | 21 |
| 4.1.1.1.5 Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas..... | 21 |
| 4.1.1.1.6 Lectinas tipo amaranto..... | 22 |
| 4.2 Clasificación..... | 22 |
| 4.2.1 Lectinas simples..... | 23 |
| 4.3 Funciones..... | 26 |
| 4.4 Usos..... | 27 |
| 4.4.1 Actividad antioxidante..... | 28 |
| 4.5 Efecto tóxico..... | 28 |
| 5. <i>Ruta graveolens</i> L..... | 29 |
| 5.1 Clasificación sistemática..... | 29 |
| 5.2 Descripción morfológica..... | 30 |
| 5.3 Distribución..... | 30 |
| 5.4 Propiedades medicinales..... | 30 |
| 5.5 Efecto tóxico..... | 31 |
| Planteamiento del problema..... | 32 |
| Justificación..... | 33 |
| Hipótesis..... | 34 |
| Objetivos..... | 35 |
| Objetivo general..... | 35 |
| Objetivos particulares..... | 35 |
| Materiales y Método..... | 36 |
| 1. Extracción salina..... | 37 |

| | | |
|------|---|----|
| 2. | Purificación parcial | 38 |
| 2.1. | Diálisis | 38 |
| 2.2 | Cromatografía de afinidad | 39 |
| 3. | Caracterización bioquímica | 40 |
| 3.1. | Cuantificación de proteínas | 40 |
| 3.2 | Cuantificación de carbohidratos totales y reductores | 41 |
| 3.3 | Termoestabilidad | 43 |
| 3.4 | Estabilidad en cambios de pH | 43 |
| 4. | Ensayo funcional | 44 |
| 4.1 | Hemaglutinación en sistema ABO | 44 |
| 5 | Actividad biológica | 45 |
| 5.1 | Diseño experimental | 45 |
| 5.2 | Inducción de cáncer y seguimiento del proceso | 47 |
| 5.3 | Tratamiento | 48 |
| 5.4 | Obtención de hígado y plasma | 48 |
| 5.5 | Cuantificación de proteínas en hígado y plasma | 49 |
| 5.6 | Actividad enzimática de catalasa en hígado y plasma | 49 |
| 5.7 | Cuantificación de nitritos en hígado y plasma | 51 |
| 5.8 | Cuantificación de peroxidación lipídica (LPO) en hígado y plasma | 53 |
| 6 | Análisis estadístico | 54 |
| | Resultados | 55 |
| 1. | Rendimiento | 55 |
| 2. | Caracterización bioquímica | 56 |
| 2.1 | Cuantificación de proteínas | 56 |
| 2.2 | Cuantificación de azúcares totales y reductores | 57 |
| 2.3 | Termoestabilidad | 58 |

| | | |
|-----|--|-----------|
| 2.4 | Estabilidad en cambios de pH | 62 |
| 3 | Ensayo funcional | 64 |
| 3.1 | Hemaglutinación en sistema ABO | 64 |
| 4 | Actividad biológica..... | 69 |
| 4.1 | Seguimiento del proceso..... | 69 |
| 4.2 | Actividad enzimática de catalasa en hígado y plasma | 71 |
| 4.3 | Cuantificación de nitritos en hígado y plasma..... | 73 |
| 4.4 | Cuantificación de peroxidación lipídica en hígado y plasma | 75 |
| | Discusión | 77 |
| | Conclusiones | 81 |
| | Referencias..... | 82 |
| | Anexo de publicación..... | 89 |
| | Invitación a publicar..... | 89 |
| | Aceptación de artículo..... | 90 |

Abreviaturas

| | |
|------------------|--|
| 4-HNE | 4-hidroxinonenal |
| AGP | Ácidos grasos poliinsaturados |
| AO | Antioxidantes |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| BfL | <i>Bauhinia forficata</i> Lectin/ Lectina de <i>Bauhinia forficata</i> |
| cNOS | Óxido Nítrico Sintasa constitutivo |
| DL | Linfoma de Dalton |
| DNS | Ácido 3,5-dinitrosalisílico. |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| ERN | Especies Reactivas de Nitrógeno |
| ERO | Especies Reactivas de Oxígeno |
| GLUT | Sistemas facilitadores del transporte de glucosa |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| iNOS | Óxido Nítrico Sintasa inducible |
| INF- γ | Interferón gamma |
| KDa | Kilo Daltones |
| LD ₅₀ | Dosis letal media |
| LPO | Peroxidación lipídica, lipoperoxidación |
| MDA | Malondialdehído |
| ML | Lectina de muérdago europeo |

| | |
|---------------|---|
| MUC1 | Mucina-1 |
| MT | Marcador tumoral |
| NED | N-Naftiletildiamina |
| NO | Óxido nítrico |
| NOS | Óxido Nítrico Sintasa |
| PHA | <i>Phaseolus vulgaris</i> Lectin /Lectina extraída de <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| RL | Radicales libres |
| RPM | Revoluciones por minuto |
| SBL | Soy Bean Lectin/ Lectina de frijol de soya |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sodio |
| TBA | Ácido tiobarbitúrico |
| TCA | Ácido Tricloroacético |
| TNF- α | Factor de Necrosis Tumoral- α |

Resumen

El cáncer es un padecimiento que actualmente afecta a un gran número de personas, por lo cual se considera un problema de salud pública mundial. Entre los factores de riesgo más comunes se encuentran aquellos relacionados a la predisposición genética, así como aquellos relacionados con el estilo de vida, de los cuales, la mayoría están ligados a la producción y exposición a radicales libres.

Es importante resaltar que, el cáncer es considerado como un padecimiento único, sin embargo, se comporta de manera muy diferente dependiendo de cuál sea el tejido dañado, y el grado de afectación de éste. Uno de los tipos de cáncer con mayor impacto a nivel mundial es el cáncer de mama, pues es una de las principales causas de muerte en la población femenina (INEGI, 2014).

Diversas estrategias han sido utilizadas para tratar a los pacientes de cáncer de mama desde diferentes enfoques, sin embargo, no sólo resultan poco efectivos, sino que, además, son poco selectivos en cuanto a las células blanco, dañando además células sanas, por lo cual es necesario recurrir a tratamientos alternativos, altamente selectivos, como una forma de mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Se ha reportado que las lectinas se unen de forma selectiva a células cancerígenas respecto a células sanas, e inducen a las primeras a procesos de muerte celular, por lo cual son alternativas potenciales para mejorar el tratamiento de cáncer. En este trabajo se evaluó el efecto de lectinas procedentes de tallo de *Ruta graveolens* L. sobre la regulación del estrés oxidativo.

Se caracterizaron las proteínas extraídas del tallo de *R. graveolens* bioquímicamente y se evaluó la actividad biológica por medio de la selectividad a los azúcares que definen al sistema ABO de grupos sanguíneos. Se evaluó su actividad antioxidante en un modelo murino *in vivo* de cáncer, para con ello valorar su potencial como agente anticancerígeno. Obteniéndose que la fracción de glucosa disminuye de manera significativa la producción de nitritos y MDA, y eleva la actividad de catalasa en hígado de ratón.

Marco teórico

1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como el exceso en la producción de radicales libres (RL) con respecto al sistema antioxidante (AO) (García-Triana *et al*, 2012), ya sea por la producción de éstos debido al metabolismo del organismo, o bien, por fuentes externas.

Un RL representa cualquier especie química de existencia independiente que posee uno o más electrones desapareados girando en sus orbitales atómicos externos. Esta configuración, electroquímicamente muy inestable, le confiere la propiedad de ser una especie química altamente agresiva y de vida corta. Se ha observado que la magnitud de esta reactividad se correlaciona inversamente con su vida media y con su capacidad de difusión en el medio celular. La mayoría de las moléculas en un organismo son no radicales, o sea, sólo contienen electrones pareados en sus orbitales atómicos. Una vez formados, los RL interactúan con otras moléculas a través de reacciones REDOX para con esto lograr una configuración electrónica estable. Cuando un RL reacciona con una molécula no radical puede ceder o captar electrones, o simplemente puede unirse a ella. En cualquiera de estos casos la molécula no radical se convierte en un RL y se desata una reacción en cadena, que se detiene sólo cuando se encuentran dos RL (Chihuailaf *et al*, 2002).

Este proceso se relaciona principalmente con las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN). Las especies reactivas del oxígeno son metabolitos parcialmente reducidos derivados del oxígeno (García-Triana *et al*, 2012). Las ERO pueden ser divididas en dos grupos, radicales y no radicales (Birben *et al*, 2012). Son moléculas muy inestables, lo que les da una vida media extremadamente corta y la capacidad de reaccionar con todas las moléculas de importancia biológica (García-Triana *et al*, 2012).

1.1 Causas

Las ERO se generan en el organismo a partir de fuentes endógenas y exógenas. Una fuente endógena muy importante es la cadena transportadora de electrones. Otra fuente es la defensa antimicrobiana; macrófagos y leucocitos polimorfonucleares liberan estas sustancias, que contribuyen a la eliminación de los microorganismos. El descubrimiento de esto demostró, por primera vez, que estas especies además de ser potencialmente dañinas, podían desempeñar funciones fisiológicas importantes en los organismos vivos. También la vía

metabólica de síntesis de eicosanoides, importantes mediadores inflamatorios, puede liberar ERO. Por otra lado, las fuentes exógenas incluyen radiación, tóxicos que ingresan al organismo por dieta o inhalación y medicamentos (García-Triana *et al*, 2012).

Factores como la inadecuada alimentación, enfermedad, estrés o la inducción de la respuesta inmune, llevan a un incremento en los requerimientos de vitaminas y minerales traza, la mayoría de ellos involucrados en la defensa AO. Es interesante precisar que, como contraparte, se han observado situaciones de estrés oxidativo en las cuales la ingesta de oligoelementos no mejora el estatus AO, hecho que se atribuye a la influencia que ejercen otros factores sobre la expresión de esta capacidad (Chihuailaf *et al*, 2002).

1.2 Efectos

La mayoría de las macromoléculas biológicas pueden ser oxidadas por los RL; sin embargo, las biomoléculas más lábiles son los lípidos. La peroxidación lipídica o lipoperoxidación (LPO) es un proceso que en los sistemas biológicos puede ocurrir bajo control enzimático o no enzimático; esta última forma es la que se relaciona con el estrés oxidativo y el daño celular. La LPO es particularmente destructiva, ya que se desarrolla como una reacción en cadena autopropagante. Los productos finales de la LPO son lípidos peroxidados que al degradarse originan nuevos RL y una amplia variedad de compuestos citotóxicos como los aldehídos, entre ellos 4-hidroxi-nonal (4-HNE) y malondialdehído (MDA), aunque se ha comprobado que este último posee una baja toxicidad. Las consecuencias del daño en la estructura molecular del ácido graso poliinsaturado (AGP) son más evidentes cuando estos lípidos forman parte de las membranas celulares o subcelulares, ya que se altera su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica.

Si bien las proteínas, péptidos y aminoácidos también constituyen un blanco para las ERO, su acción es menos dramática que frente a los lípidos, debido al lento progreso de las reacciones.

Los carbohidratos, como la glucosa y otros monosacáridos relacionados, sufren peroxidación bajo ciertas condiciones y forman compuestos dicarbonílicos y peróxido de hidrógeno. La importancia de este hecho radica en que estas biomoléculas una vez activadas pueden interactuar con otras y conformar nuevas asociaciones moleculares.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) también constituye un blanco de ataque por parte de las ERO, principalmente el ADN mitocondrial. Este ADN, por su localización, se encuentra expuesto a un flujo constante y elevado de ERO provenientes de la cadena respiratoria; además, carece de histonas en su estructura lo que le resta estabilidad. Por otra parte, se ha observado que sus mecanismos de reparación son menos eficientes. En general, dentro del espectro de alteraciones que puede sufrir el ADN se describe la oxidación de desoxirribosas, ruptura y entrecruzamientos de cadenas y la modificación de bases nitrogenadas. Sin embargo, estas alteraciones serán significativas en la medida que sean capaces de eludir los sistemas de reparación antes de que ocurra la replicación (Chihuilaf *et al*, 2002).

Se sabe que el estrés oxidativo puede favorecer, entre otras cosas, la aparición y desarrollo de diabetes mellitus, enfermedades autoinmunes, cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, inflamación, problemas relacionados con el envejecimiento celular y cutáneo, además de cáncer (Dasgupta y De, 2004, Mayor-Oxila, 2010).

Se ha sugerido la implicación de los RL en el desarrollo tumoral; como evidencia de esto se ha demostrado que los RL estimulan el crecimiento de las células musculares lisas, lo que sugiere un papel del estrés oxidativo en la angiogénesis, también se ha observado la activación de algunos genes tempranos que podrían participar en el control de la transcripción de factores de crecimiento necesarios para el desarrollo tumoral y no hay que olvidar que la transformación oncogénica viene condicionada por la presencia de genes mutados u oncogenes que controlan funciones celulares clave, y esto también puede influenciarse por el estado Redox celular. Se han detectado niveles disminuidos de enzimas antioxidantes en diversos tipos de células tumorales, así como alteraciones en el estado de los tioles celulares (Elejalde-Guerra, 2001).

1.3 Sistema antioxidante

Debido a que la producción de ERO y ERN es un proceso inevitable al ser parte del metabolismo de los organismos, es necesaria la existencia de mecanismos antioxidantes.

Estos mecanismos incluyen barreras fisiológicas que confrontan el oxígeno durante su transporte desde el aire hasta las células; enzimas que pueden eliminar las ERO generadas o reparar el daño oxidativo, como son superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y peroxiredoxinas; sistemas transportadores de metales que impiden su

circulación en forma libre y participación en la generación de ERO, por ejemplo, transferrina, hemoglobina, haptoglobina y ceruloplasmina; y compuestos antioxidantes como las vitaminas A, E y C, así como la coenzima Q10 (García-Triana *et al*, 2012).

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de éste (Venereo- Gutierrez, 2002).

Se considera AO a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un RL (Mayor-Oxila, 2010), o bien, moléculas que previenen la formación descontrolada de RL o inhiben sus reacciones con estructuras biológicas (Chihuailaf *et al*, 2002).

1.3.1 Clasificación

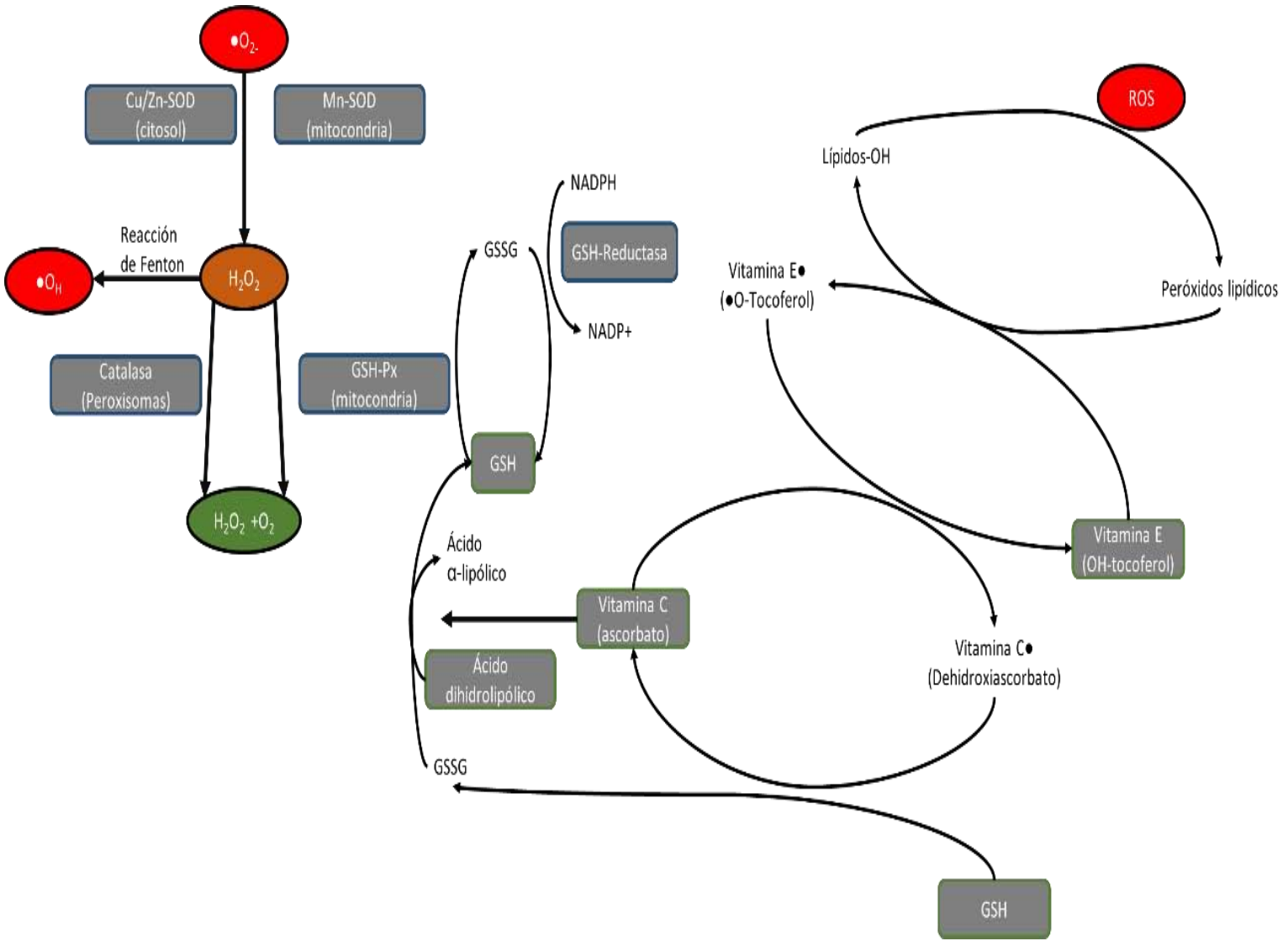
Muchos de los AO son enzimas o nutrimentos esenciales, o incorporan nutrimentos esenciales en la estructura de sus moléculas (Chihuailaf *et al*, 2002). Los AO pueden ser enzimáticos o no enzimáticos, además de poder ser endógenos u obtenidos a partir de la dieta. Es importante mencionar la importancia de ciertos oligoelementos para la correcta síntesis de enzimas AO. Estos son cobre, zinc, selenio, magnesio y hierro (Mayor-Oxila, 2010). Un criterio de clasificación comúnmente empleado se basa en el mecanismo mediante el cual los AO ejercen su acción protectora, agrupándolos en aquellos que cumplen una función preventiva en la formación de los RL y en aquellos que interceptan o capturan los que ya se han producido. También es posible clasificarlos conforme a su localización, ya sea en intra o extracelular (Figura 1).

Es importante, entre las clasificaciones antes mencionadas, remarcar la importancia de los antioxidantes enzimáticos, debido a que su función puede presentar ventajas frente a los compuestos AO en el sentido de que su actividad es regulada acorde con los requerimientos celulares: pueden ser inducidas, inhibidas o activadas por efectores endógenos.

El grupo de AO enzimáticos cataliza la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los RL. Posteriormente los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos y lo hacen a expensas del NADPH producido en las diferentes vías metabólicas. Frente a una situación de exposición prolongada a ERO, puede

ocurrir una disminución en las concentraciones del NADPH necesario en otros importantes procesos fisiológicos, a pesar de que algunos AO enzimáticos no consumen cofactores (Chihuailaf *et al*, 2002).

Figura 1 función de diferentes componentes del sistema antioxidante, modificado de Lazo-de-la-Vega-Monroy y Fernández-Mejía, 2013



2. Cáncer

2.1 Definición

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo (OMS, 2015). El cáncer es una enfermedad genética compleja que es causada principalmente por factores ambientales (Alison, 2001), caracterizada por la necrosis celular del tejido sano, crecimiento incontrolado de las células cancerosas, angiogénesis y metástasis (Elejalde-Guerra, 2001).

Dado que las células epiteliales cubren la piel, los tractos respiratorio y alimenticio, y metabolizan los carcinógenos ingeridos, resulta poco sorprendente que más de 90% de los cánceres ocurran en epitelios (Alison, 2001).

2.2 Características

Posiblemente una de las características principales que presentan las células cancerígenas se relaciona con su capacidad de mantener su proliferación.

Las células cancerígenas pueden adquirir la capacidad de mantener las señales proliferativas de diversas formas, entre ellas produciendo los ligandos de factores de crecimiento, a los cuales pueden responder por medio de la expresión de los ligandos que se asocian a éstos, lo cual lleva a una estimulación proliferativa autócrina. De forma alternativa, las células cancerígenas podrían enviar señales a células normales cercanas al estroma asociado al tumor para estimularlas proveer varios factores de crecimiento.

La señalización puede ser desregulada también elevando los niveles de proteínas receptoras en la superficie celular, volviendo a estas hiperresponsivas a ligandos de factores de crecimiento, que en otras circunstancias serían limitantes (Hanahan y Weinberg, 2011).

La angiogénesis es un proceso de neovascularización, que entre otras cosas, suele estar asociado a tumores, el cual tiene por finalidad el sustento del tumor en cuanto a oxígeno y nutrientes, así como la evacuación de desechos metabólicos como dióxido de carbono.

Durante la embriogénesis el desarrollo de vasos involucra la proliferación de nuevas células endoteliales y la formación de vasos, lo cual recibe el nombre de vasculogénesis, además de la angiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos a partir de los ya existentes, después de lo cual, la vasculatura resulta básicamente quiescente.

En la vida adulta, como parte de ciertos procesos fisiológicos la angiogénesis se activa, pero sólo temporalmente; en contraste, durante la progresión tumoral la angiogénesis está siempre activada, provocando así que se forme una gran cantidad de vasos que permitirán el crecimiento de las neoplasias (Hanahan y Weinberg, 2011).

La metástasis sigue una secuencia tal que inicia con una invasión local, para posteriormente llevar a cabo una intravasación hacia los vasos sanguíneos y linfáticos, lo cual lleva a estas células del lumen de dichos vasos al parénquima de tejidos distantes, lo cual se denomina extravasación; para formar pequeños nódulos de células cancerosas, llamados micrometástasis. El crecimiento de dichas lesiones micrometastásicas a tumores macroscópicos se denominará colonización; siendo éste el último paso del proceso metastásico (Hanahan y Weinberg, 2011).

El potencial metastásico de las células cancerosas se atribuye a sus propiedades adhesivas y el proceso de adhesión es mejorado por las estructuras glicosiladas alteradas, las cuales son diferentes a las que se encuentran presentes en la superficie de células normales (Silva *et al*, 2014).

2.2.1 Marcadores de superficie

Los marcadores tumorales (MT) son indicadores bioquímicos de la presencia de un tumor. Incluyen antígenos de superficie celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas y hormonas (Coronato *et al*, 2002).

Entre los marcadores más importantes se encuentran aquellos asociados a la glicosilación. Por su gran complejidad y diversidad, los O-glicanos se encuentran participando en funciones tan diversas como en la conformación de la estructura secundaria, terciaria e inclusive de la cuaternaria de algunas proteínas, como en el caso de las mucinas y también participan evitando la agregación de las proteínas. Como consecuencia de la transformación maligna ocurren cambios muy importantes en la glicosilación, sobre todo en la etapa de elongación de los O-glicanos. Esto determina que algunos tipos de núcleos (cores), que en las células normales se encuentran enmascarados por la adición de otros azúcares, queden expuestos en la superficie celular, resultando en la formación de nuevos antígenos asociados al cáncer (Gallegos-Velasco *et al*, 2008).

2.3 Clasificación

Respecto al comportamiento, los tumores se consideran “benignos” o “malignos”. Los tumores benignos generalmente tienen un desarrollo lento y se pueden considerar masas en crecimiento que, más que invadir, comprimen el medio que les rodea, además de poder ser fácilmente removidos quirúrgicamente, sin embargo, varios tumores denominados benignos pueden tener potencial maligno, por lo cual deben ser removidos antes de que se convierta en un tumor maligno. Los tumores malignos generalmente presentan un rápido crecimiento, invaden el tejido cercano y, más importante, invaden órganos distantes. La propiedad de las células tumorales de separarse de la masa original (tumor primario) y desarrollar metástasis (tumor secundario) lejos del primario es señal inequívoca de que se trata de un tumor maligno. Los tumores pueden ser clasificados también de acuerdo a su tejido de origen (Alison, 2001).

2.4 Epidemiología

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer, y se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años (OMS, 2015).

En 2011, de cada 100 egresos hospitalarios por tumores en el país, 56 son por tipo maligno. En los jóvenes representa 71 de cada 100 y para la población adulta, 53.

En 2011, de las personas con cáncer, 24 de cada 100 hombres de 20 años y más lo padecen en los órganos digestivos y 30 de cada 100 mujeres de la misma edad, en mama (INEGI, 2014).

2.5 Terapias aplicadas actualmente

El tratamiento para cáncer usualmente es una combinación de diversas modalidades. Si el tumor puede ser removido quirúrgicamente, se considerará la principal herramienta en el tratamiento. La radioterapia dirigida es otra opción, así como las combinaciones de fármacos anticáncer. La mayoría de estos fármacos han sido diseñados teniendo como blanco la síntesis de ADN, sin embargo, el problema principal con dichos fármacos es que las células tumorales no son las únicas que proliferan en el organismo, las células que recubren el tracto digestivo, las células de la médula ósea y células epidérmicas son altamente proliferativas, por lo tanto,

los pacientes que reciben quimioterapia frecuentemente sufren efectos secundarios que pueden llegar a ser mortales, lo cual limita el tratamiento.

La nueva generación de fármacos tiene como blanco, ya sea las señales que promueven o regulan el ciclo celular, factores de crecimiento y sus receptores, vías de transducción de señales y vías que afectan la reparación de ADN y apoptosis. Cada una de estas vías puede ser afectada activando mutaciones que predisponen al cáncer y por lo tanto, ofrecen el potencial como blanco de inhibición. Otras estrategias se enfocan ya sea en atacar a las células tumorales específicamente conjugando toxinas celulares a anticuerpos específicos para el tumor, o disminuir la progresión cancerígena afectando la adhesión celular, actividad enzimática proteolítica y angiogénesis (Alison, 2001).

Se ha mencionado a las lectinas como un método tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de pacientes con cáncer, señalando que éstas presentan actividad tanto anticarcinogénica como antitumoral, probablemente debido su capacidad para modular el crecimiento, la diferenciación, proliferación y apoptosis mediados por los receptores de superficie (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).

3. Glándula mamaria

3.1 Embriología de la glándula mamaria

Hacia la 4ª semana del desarrollo fetal aparecen unos engrosamientos ectodérmicos que se extienden a ambos lados desde las futuras axilas hasta la región inguinal, constituyendo las líneas mamarias o lácteas. Sobre cada una de ellas aparecen ocho espesamientos a modo de disco biconvexo como representantes del primordio de la glándula mamaria. En el humano sólo se conserva un par de ellas a cada lado de la región pectoral. Hacia la semana 20, una proliferación de las capas más basales de la epidermis forma de 16 a 20 conductos que se introducen en el mesodermo subyacente en forma de cordones sólidos, constituyendo la base del sistema ductal (Díaz-Miguel *et al*, 2015).

3.2 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria sana

Las glándulas mamarias adultas están situadas en la pared anterior del tórax y se extienden verticalmente desde la segunda a la sexta costilla y horizontalmente, desde el esternón (paraesternal) a la línea axilar media. Presentan una prolongación axilar (cola de Spence). En la porción más prominente de la cúpula mamaria se encuentra el pezón, una formación papilar, de superficie irregular y a cuyo vértice van a desembocar los conductos galactóforos. Rodeando al pezón se encuentra la areola, una zona cutánea de 3 a 5 cm de diámetro, de coloración oscura, de aspecto rugoso y con múltiples prominencias redondeadas o tubérculos de Morgagni (glándulas sebáceas), que en el embarazo se hacen más prominentes y se denominan tubérculos de Montgomery.

De dentro hacia fuera la mama está constituida por tres componentes: el tejido glandular, tejido fibroadiposo y la piel (Figura 2).

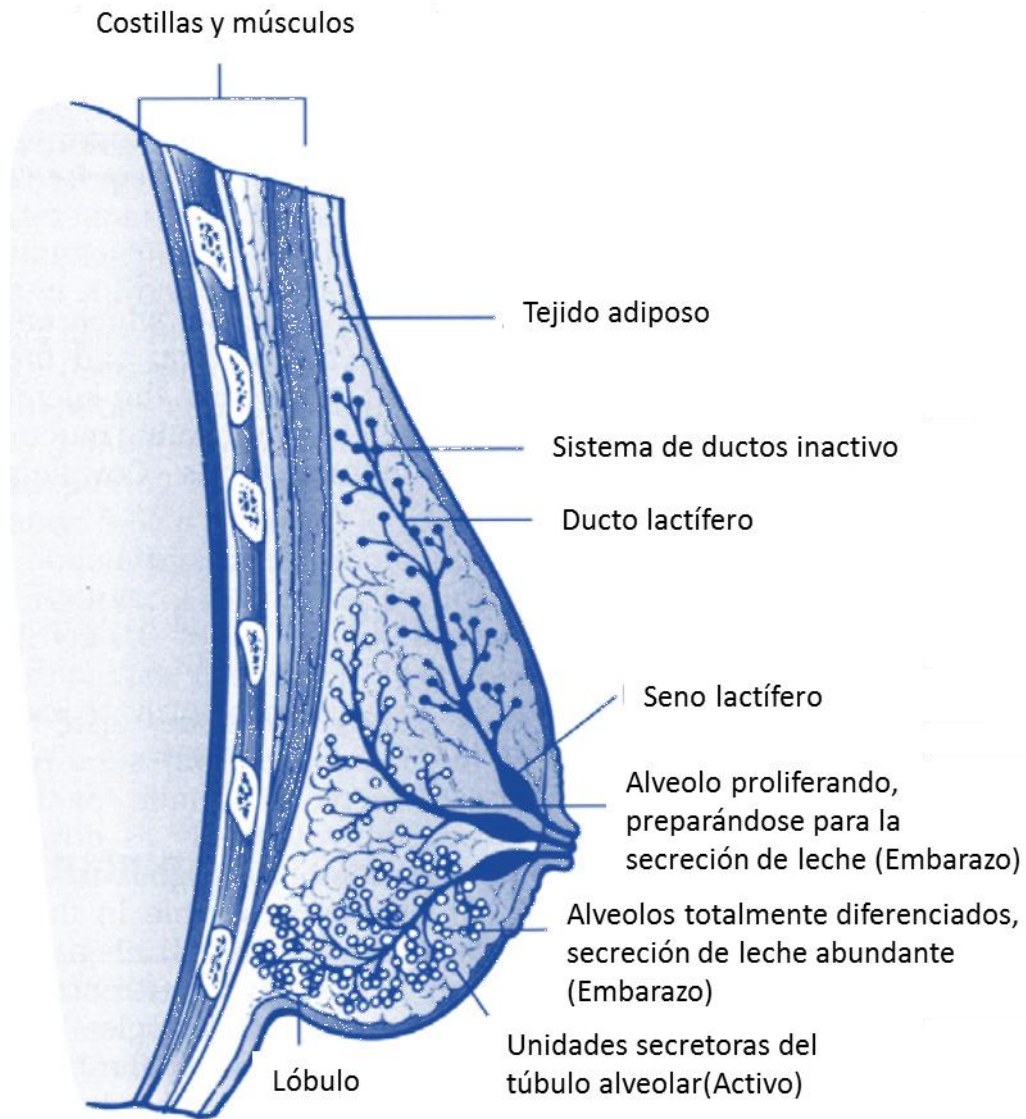


Figura 2. Corte de mama sana en diferentes etapas del embarazo. Modificado de Biblioceop, 2011.

Tejido glandular

La mama es una glándula sudorípara y se presenta como una masa de coloración gris amarillenta, localizada entre las capas superficial y profunda de la fascia torácica superficial. La constituyen de 15 a 20 lóbulos mamarios, cada uno contiene pequeños lobulillos y cada uno de estos contiene acinos glandulares. En la porción superior externa, presenta una prolongación hacia la axila llamada cola de Spence.

Tejido fibroadiposo

La *fascia superficialis* se divide en dos hojas, una anterior, que envía prolongaciones a la cara profunda de la dermis, que son los llamados ligamentos de Cooper o líneas de Sharpey, que delimitan espacios de tejido adiposo conocidos como fosas adiposas de Duret, y otra posterior o ligamento suspensorio, que va por detrás de la cara posterior de la mama y en contacto con la aponeurosis de los músculos pectoral mayor, serrato mayor y oblicuo mayor.

El tejido adiposo subcutáneo, se desdobra también en dos láminas, anterior entre la glándula y la piel y posterior, entre la glándula y el ligamento suspensorio de la mama.

Piel

La piel a nivel de la areola no descansa sobre tejido graso, sino sobre un sustrato de células musculares lisas dispuestas circularmente, cuya contracción origina la erección del pezón y la eyección láctea en la lactancia (Díaz-Miguel *et al*, 2015).

3.3 Cáncer de mama

El cáncer de mama se forma en los tejidos de la mama, por lo general en los conductos y los lobulillos. Puede darse tanto en hombres como en mujeres, aunque el masculino es poco común (Bouche, 2013).

3.3.1 Historia natural del cáncer de mama

El cáncer de mama dentro de sus características biológicas tiene variación en su comportamiento en diferentes pacientes, así como un rango de crecimiento relativamente bajo, comparado con otros tipos de tumores.

Algunos cánceres de mama duplican su tamaño en pocos días, mientras a otros les toma más de 2000. Asumiendo el crecimiento algorítmico preclínico de una masa en la mama, el tiempo de duplicación puede requerir de 8 a 10 años para que el tumor pueda ser palpado.

El cáncer se inicia como una enfermedad localizada. A una “etapa no invasiva”, le sigue una “invasiva”; al principio es “asintomática” y después “sintomática”. Esta última se divide en otras fases: fase localizada, regional y metastásica (Dirección General de Salud Reproductiva, 2002).

3.3.2 Factores de riesgo

Existe una gran cantidad de factores que podrían predisponer a padecer cáncer de mama, algunos de los factores más importantes son los siguientes:

- Pertener al sexo femenino
- Edad avanzada
- Tejido mamario denso en la mamografía
- Antecedentes familiares de cáncer de mama
- Antecedentes personales de cáncer de mama
- Ooforectomía antes de los 35 años
- Menopausia plena tardía (después de los 54 años)
- Consumo de dietilbestrol durante el embarazo
- Obesidad y sobrepeso
- Primer hijo después de los 40 años
- Menarquia antes de los 11 años
- Menos de 16 meses de lactancia materna
- Consumo de alcohol
- Terapia de remplazo hormonal
- Consumo de anticonceptivos orales
- IMC elevado en premenopausia

(Angarita y Acuña, 2008).

3.3.3 Epidemiología

El cáncer más frecuente entre las mujeres es el de mama, que a nivel mundial representa 16% de todos los cánceres femeninos y se estima que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos (INEGI, 2013).

La evidencia global señala que 55% de los nuevos casos provienen de países en vías de desarrollo donde la letalidad por la enfermedad es mayor, pues representa alrededor del 68% de las muertes por esta enfermedad.

El cáncer de mama es una de las enfermedades con mayor incidencia en la mujer adulta de América Latina y el Caribe, donde aproximadamente 40 000 mujeres fallecen de cáncer de mama al año.

En México, el cáncer de mama, es la primer causa de mortalidad por tumores malignos entre las mujeres y constituye la segunda causa de muerte en la población femenina de 30 a 54 años (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2013).

3.3.4 Tratamiento

El tratamiento establecido para aquellos pacientes que padecen cáncer de mama presenta diversas opciones, siendo la principal la cirugía, ya sea para remover el tumor primario o bien, profiláctica, es decir, para remover la mama cuando se considera que el paciente tiene una alta probabilidad de padecerlo y se desea prevenirlo. Se menciona además el tratamiento adyuvante, el cual incluye la quimioterapia, terapia biológica, terapia endócrina y radioterapia, y el tratamiento neoadyuvante, el cual consiste en el tratamiento sistémico (Arce *et al*, 2011) que consiste en hormonoterapia, quimioterapia o medicamentos dirigidos a Her2, esto antes de la cirugía (American Cancer Society, 2015).

4 Lectinas

4.1 Características y clasificación

Las lectinas son glicoproteínas, las cuales se unen de forma reversible y con alta especialidad a determinados oligosacáridos y monosacáridos, otras características importantes de estas proteínas es que son de origen no inmune y carecen de actividad catalítica.

La afinidad de las lectinas a los monosacáridos es relativamente baja, aunque altamente selectiva.

Se considera que la mayoría de las lectinas poseen cuando menos dos sitios de unión a carbohidratos.

Se sabe que las lectinas están presentes en un gran rango de organismos, desde bacterias, pasando por hongos y algas hasta organismos más complejos como plantas y animales (Lis y Sharon, 1998).

4.1.1 Lectinas vegetales

4.1.1.1 Estructura

Se puede encontrar que las lectinas vegetales presentan estructuras muy diversas de acuerdo al grupo en el cual pueda incluirse (figura 3), teniendo así las siguientes estructuras generales:

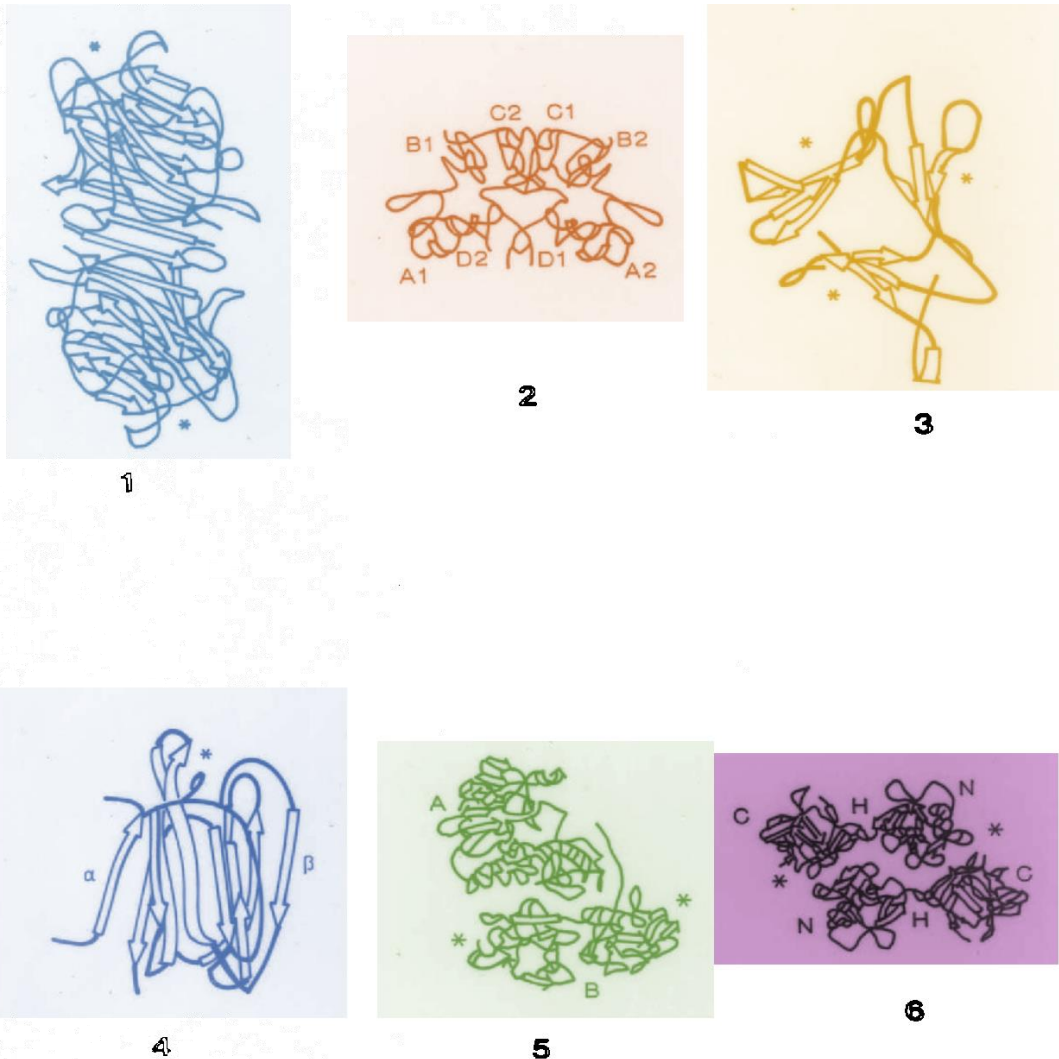


Figura 3 Estructura de algunas lectinas vegetales. Se muestra en orden: 1 Lectinas aisladas de leguminosas. 2 lectinas con dominio tipo heveína 3 lectinas aisladas de monocotiledóneas 4 lectinas con estructura tipo prisma β , 5 lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas 6 Lectinas tipo Amaranto. Modificado de Hernández-Cruz et al, 2005.

4.1.1.1.1 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 α antiparalelas conectadas entre sí mediante bucles, lo que

genera una estructura aplanada en forma de domo, cuatro bucles localizados en la parte superior del monómero forman el sitio de reconocimiento a carbohidratos (Hernández-Cruz *et al*, 2005).

4.1.1.1.2 Lectinas con dominios tipo heveína o específicas de quitina.

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 (Hernández-Cruz *et al*, 2005).

4.1.1.1.3 Lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa.

A este grupo de lectinas pertenecen aquellas extraídas a partir de orquídeas, ajo y amarilis, con secuencias de aminoácidos altamente conservadas. Son tetraméricas, y cada monómero tiene un peso molecular de 12 kDa, así como una secuencia repetida 3 veces de 36 aminoácidos. El sitio de reconocimiento a carbohidrato está constituido por cuatro hojas β antiparalelas unidas entre sí por giros. El conjunto se asocia de manera que forma una corona aplanada, dejando aparecer un gran túnel central (Hernández-Cruz *et al*, 2005).

4.1.1.1.4 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). Lectinas tetraméricas glicosiladas, donde cada sub-unidad contiene una cadena pesada (α) y una cadena ligera (β), y está constituida por tres hojas β antiparalelas arregladas a manera de un prisma triangular (Hernández-Cruz *et al*, 2005).

4.1.1.1.5 Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas.

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 B, posee la actividad de lectina. La cadena B está constituido por dos dominios que

presentan cuatro sub-unidades, las cuales contienen α hélices y hojas β (Hernández-Cruz *et al*, 2005).

4.1.1.1.6 Lectinas tipo amaranto.

Dentro de este grupo encontramos 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, cada dominio muestra una conformación de trébol β semejante a la conformación observada en la cadena B de la lectina de *Ricinus communis* (Hernández-Cruz *et al*, 2005).

4.2 Clasificación

Se pueden considerar diversos criterios para la clasificación de lectinas, considerando, por ejemplo, su origen, es decir, si provienen de un virus, bacteria, hongo, alga, planta o animal, sin embargo, esto resulta vago y poco práctico en un sentido funcional.

Se ha considerado como criterio para la clasificación de lectinas su afinidad a ciertos monosacáridos u oligosacáridos.

Aquellos glúcidos que se consideran como criterio de clasificación son los siguientes:

- Manosa
- Galactosa/ N-acetilgalactosamina
- N-acetilglucosamina
- Fucosa
- Ácido N-acetilneuramínico.

Cabe mencionar al respecto de estos carbohidratos que son constituyentes típicos de la superficie celular.

También cabe mencionar que existe algunas excepciones respecto al mono u oligosacárido al que es afín la lectina, incluso pudiendo unirse a más de un monosacárido, además de tener diferente afinidad hacia alfa o beta monosacáridos. También se ha observado que las lectinas se unen con mayor facilidad a un glicósido aromático que a uno alifático.

Se puede llegar a considerar que la estructura tridimensional del glúcido tendrá una mayor influencia sobre la afinidad de la lectina que la estructura en sí.

Otro método de clasificación es aquel dependiente de la estructura de la lectina, siendo los grupos de clasificación los siguientes:

- Simples
- Mosaico/ Multidominio
- Montaje macrocelular.

Se debe considerar que en algunos casos, la lectina en cuestión puede no coincidir con ninguno de los criterios de clasificación (Lis y Sharon, 1998).

4.2.1 Lectinas simples

Este grupo incluye a prácticamente todas las lectinas vegetales y a las galectinas, o s-lectinas, suelen tener un peso molecular de menos de 40 KDa y un pequeño número de subunidades, no necesariamente idénticas.

Entre los subgrupos de esta clasificación se puede encontrar a los siguientes:

Leguminosas

Generalmente se puede encontrar gracias a la combinación de diferentes proteínas denominadas isolectinas y constarán de dos a cuatro subunidades, llamadas protómeros, con un peso molecular de 25 a 30 KDa, cada uno con un sitio de unión a carbohidrato con la misma especificidad.

Por cada subunidad tendrá un enlace fuerte con Ca^{2+} y MN^{2+} , lo cual permitirá la unión de las lectinas a carbohidratos.

Las subunidades de las lectinas de leguminosas generalmente están formadas por cadenas polipeptídicas de alrededor de 250 aminoácidos.

Este grupo de lectinas presenta una alta homología, teniendo alrededor de 20 % de aminoácidos idénticos y 20 % de aminoácidos similares, de los cuales la mayoría participa en la formación de puentes de hidrógeno o bien, en interacciones hidrofóbicas con el

monosacárido que se encuentra en el sitio de unión, aunado a esto, casi todos los residuos que combinan a los iones metálicos (Lis y Sharon, 1998).

Cereales

Las lectinas pertenecientes a este grupo generalmente están compuestas por dos subunidades idénticas, generalmente muy ricas en cisteína.

Estas lectinas presentan múltiples sitios de unión debido a la repetición de la estructura interna y a su localización en la interfase entre las subunidades que forman el dímero molecular de la lectina (Lis y Sharon, 1998).

Amarillidaceae y familias relacionadas

Una de las principales características de este grupo es que suelen unirse a residuos de manosa, no a glucosa; además de presentar secuencias con homología de alrededor del 80 y 90%.

Este grupo no es dependiente de la presencia de metales para poder presentar actividad de tipo lectina.

El tamaño de sus monómeros es de alrededor de 12 KDa y presenta repeticiones de aminoácidos, siendo tres las repeticiones de una secuencia de 36 aminoácidos.

Las lectinas de este grupo presentan una baja afinidad por el ligando monosacárido (Lis y Sharon, 1998).

Moraceae

Se considera a la lectina jacalina como el principal representante de este grupo, la cual es una glicoproteína tetramérica de 66 KDa, y cada una de las subunidades que la conforman están a su vez compuestas por una cadena pesada denominada α , con 133 aminoácidos, y una cadena ligera, o cadena β , la cual consta de 20 aminoácidos (Lis y Sharon, 1998).

Euphorbiaceae

En este grupo se incluye a una de las lectinas más relevantes, extraída de *Ricinus*, la cual se ha denominado Ricina. Ésta es letal, reportándose que una molécula de ricina es suficiente para matar a una célula.

Está compuesta por un heterodímero con un peso molecular de 60 KDa y en su estructura presenta dos cadenas, denominadas A y B, que son unidas por puentes S-S.

Se sabe que la cadena A es la que presenta actividad citotóxica, por medio de la inactivación del ARN (Ácido Ribonucleico) durante la síntesis de proteínas, mientras la cadena B presenta dos sitios de unión a carbohidratos específicos para galactosa (Lis y Sharon, 1998).

Galectinas

Es un grupo de lectinas presentes principalmente en mamíferos, algunos otros vertebrados y ocasionalmente en invertebrados, pero nunca en plantas.

Presentan una estructura relativamente simple y comparten un dominio altamente homólogo, el cual es conocido como dominio S-carbohidrato de reconocimiento.

Las lectinas de este grupo son afines a β -galactósidos y a lactosa, algunos pueden ser afines a n-acetil galactosamina (Lis y Sharon, 1998).

Pentraxinas

Son proteínas oligoméricas de plasma, con un arreglo pentamérico en sus subunidades; la unión a carbohidrato por parte de éstas es calcio-dependiente (Lis y Sharon, 1998).

Multidominio

En este grupo se incluyen a las hemaglutininas virales, de las cuales la principal es aquella que se aísla del virus de la influenza, además de hemaglutininas virales de tipo C, P e I.

Las lectinas presentes en este grupo presentan un amplio rango de pesos moleculares, además de consistir en varios módulos de diferentes tipos de proteínas o dominios, de los cuales sólo uno de ellos posee un sitio de unión a carbohidratos (Lis y Sharon, 1998).

Lectinas tipo C

Una de sus principales características es el hecho de que son dependientes de Ca^{2+} para realizar su actividad aglutinante, además de poseer un dominio extracelular de reconocimiento, el cual está formado por alrededor de 130 aminoácidos, 14 de los cuales son idénticos entre sí, mientras 18 aminoácidos están altamente conservados.

Entre las lectinas de este grupo se puede señalar a las colectinas, selectinas y lectinas endocíticas.

De las selectinas puede decirse que en general, se consideran proteínas de membrana, con una distribución asimétrica.

Algo en lo que este grupo difiere enormemente de cualquier otra hemaglutinina es que su afinidad es mayor hacia oligonucleótidos que hacia carbohidratos.

Se conocen tres grupos de selectinas; E-selectina, con un peso molecular de 115 KDa, P-Selectina con 140 KDa y L-selectina con entre 90 y 110 KDa.

Por otro lado, las lectinas endocíticas son lectinas hepáticas y generalmente cuenta con dos subunidades siendo la primera larga y poco abundante, con un peso molecular de 60 KDa, y una mucho más pequeña y abundante, con un peso molecular entre 40 y 46 KDa.

Son específicas para galactosa y N-acetilgalactosamina; y se cree que funcionan como hexámeros (Lis y Sharon, 1998).

Lectinas tipo P

Entre éstas se encuentran aquellas consideradas como lectinas tipo I; y dentro de este grupo se encuentra la superfamilia de las inmunoglobulinas (Lis y Sharon, 1998).

4.3 Funciones

Se sabe que las lectinas juegan un papel importante en diversos procesos biológicos, como son el control del tráfico intracelular de glicoproteínas, la remoción de glicoproteínas del sistema circulatorio y la interacción del sistema inmune en el proceso de carcinogénesis y metástasis, y también juegan un papel importante en lo que respecta al reconocimiento celular.

En plantas, se considera que algunas de las funciones que desempeñan las lectinas son el establecimiento de relaciones simbióticas entre bacterias fijadoras de nitrógeno y leguminosas, como medio de defensa contra depredadores, tanto vertebrados como invertebrados y hongos fitopatógenos, por ejemplo en el caso de PHA (lectina extraída de *Phaseolus vulgaris* L.). Ésta se une a las células del epitelio intestinal, donde es endocitado y causa hipertrofia del intestino delgado. Como consecuencia de lo anterior, el organismo

sufre diarrea, náuseas y vómito, lo cual, en caso de animales experimentales resulta tan molesto que evitan a toda costa consumir de nuevo dicha lectina (Lis y Sharon, 1998).

4.4 Usos

Entre los usos que se puede dar a las lectinas en beneficio de los seres humanos, encontramos que puede emplearse para la precipitación de carbohidratos y aglutinación de células, en la estimulación mitogénica de linfocitos; además de emplearse como marcadores histoquímicos y citoquímicos (Lis y Sharon, 1998).

La glicosilación alterada de las glicoproteínas de la superficie celular se da en la transformación celular a células malignas, dichos cambios pueden identificarse empleando lectinas (Silva *et al*, 2014).

Se pueden emplear también en la purificación de glicoproteínas, glicopéptidos, oligosacáridos y en cromatografía.

La selectividad que presentan también permite la separación de diferentes tipos de células y la identificación de grupos sanguíneos (Lis y Sharon, 1998).

Las lectinas vegetales tienen un gran potencial en el tratamiento contra el cáncer y han sido usadas para diferenciar entre tumores malignos y benignos, además del grado de glicosilación, el cual está asociado a la metástasis tumoral (Silva *et al*, 2014).

Algunos ejemplos de lectinas que han sido probadas en cuanto a su efecto contra células tumorales se encuentran la lectina de frijol de soya (SBL), que se indica induce a muerte por medio de apoptosis y autofagia a células HeLa (Panda *et al*, 2014), la lectina extraída de *Bauhinia forficata* (BfL), que presenta efecto citotóxico e inhibición de la adhesión celular de la línea MCF7 de células de cáncer de mama (Silva *et al*, 2014), lectina del muérdago europeo (ML) induce la producción de TNF α , IL-1 e IL-6; puede activar a la caspasa-8 e inducir apoptosis en las células cancerígenas. Esta respuesta no se observa en células normales (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005), la lectina de *Abrus precatorius*. En estudios *in vitro* ha demostrado tener actividad antiproliferativa selectiva en varias líneas celulares sin presentar ningún efecto citotóxico sobre células normales; además de presentar *in vivo* actividad antitumoral potente sobre el linfoma de Dalton (DL) en ratones. Induce la apoptosis de células cancerígenas a través de la regulación positiva de Bax y activación de la

caspasa-3 (Yoon et al, 2003), PHA, que presenta efectos antiproliferativos sobre líneas celulares de cáncer de hígado (HepG2) y de mama (MCF-7) (Lam yNg, 2010), entre otros.

Algunas lectinas vegetales han sido empleadas como terapias alternativas para pacientes de cáncer de mama (Silva *et al*, 2014).

4.4.1 Actividad antioxidante

La información disponible respecto a la actividad antioxidante de lectinas apunta a que ésta se puede dar de forma dosis-dependiente (Frassinetti *et al*, 2015, Saha *et al*, 2014), sin embargo, algunos autores han considerado que sería prudente no descartar la posibilidad de que el efecto antioxidante sea por medio de la actividad conjunta entre los componentes de la planta (Ozsoy *et al*, 2012) e incluso, una posible actividad antioxidante por medio de quelación de hierro y cobre (Carrasco-Castilla *et al*, 2012), impidiendo así que puedan unirse a otras moléculas y generar un mayor daño oxidativo.

4.5 Efecto tóxico

Se sabe que, en general, los síntomas que caracterizan a la toxicidad aguda de las lectinas en humanos son náuseas, vómito, diarrea y distensión. En animales experimentales alimentados a base de plantas que se sabía contenían lectinas los síntomas evidentes son la pérdida de peso, disminución del apetito y eventualmente la muerte. Esto se debe en parte a la resistencia que tienen la mayoría de las lectinas a ser degradadas durante el proceso de la digestión, conservando éstas su actividad biológica e impidiendo la absorción de nutrientes (Vasconcelos y Oliveira, 2004).

5. *Ruta graveolens* L

5.1 Clasificación sistemática

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae

Subfamilia: Rutoideae

Género: *Ruta*

Especie: *Ruta graveolens* L

Nombre común: Ruda



Figura 4 *Ruta graveolens*.

5.2 Descripción morfológica

Es un arbusto de 50 a 90cm de altura, cuyo tallo está muy ramificado. Tiene hojas carnosas de color verde azulado y aroma fuerte. Las flores de cinco pétalos, amarillas (Figura 4). Los frutos son carnosos y presentan una superficie rugosa (Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana).

5.3 Distribución

R. graveolens es una planta nativa de la región Mediterránea, que posteriormente ha sido distribuida a regiones como Europa y Asia, especialmente en China, India y Japón (Ratheesh *et al*, 2011), hasta ser considerada cosmopolita por su amplia distribución actual.

5.4 Propiedades medicinales

Entre los usos que recibe la ruda, se encuentra el tratamiento de reumatismo, dolor intenso, dolor de cabeza, desordenes gástricos y mareos, lo cual puede sugerir que existe cierta actividad antiinflamatoria (Raghav *et al*, 2006).

Se ha empleado también como emenagogo, ecbólico, anihelmíntico, antiespasmódico, antifúngico, antibacterial e hipotensor, se ha aplicado en tratamiento contra cisticercosis intracraneal y, el uso de ciertas soluciones homeopáticas ha resultado efectivo al inducir muerte a células de cáncer cerebral, aunque se desconoce cuál es el componente activo que genera esta última respuesta. (Preethi *et al*, 2006).

Recientemente se ha descrito que esta planta tiene un efecto protector contra el daño a las cadenas de ADN y mutagénesis, además de inducir la remoción de un grupo amida de la proteína antiapoptótica Bcl-xL en células de cáncer cerebral humano pero no en linfocitos B y T, lo cual aumenta la sensibilidad de las células cancerígenas a señales de muerte, sin afectar a las células normales (Ríos, 2015).

Se ha reportado recientemente la presencia de lectinas en raíz de *Ruta graveolens* en el cual muestra una actividad fagocítica elevada de células tratadas con ésta lectina, sin mencionar algo respecto a su posible actividad antioxidante o anticáncer (Necib *et al*, 2015).

5.5 Efecto tóxico

A pesar de sus múltiples propiedades curativas, resulta contraproducente su uso a dosis altas, ya que puede generar una serie de efectos negativos, pues entre otras cosas se considera que de esta forma pasa de ser un agente AO a uno pro oxidante (Preethi *et al*, 2006).

Se sabe que en ratones, la LD₅₀ del extracto acuoso de ruda es de 219.45 mg/Kg (Lagarto-Parra *et al*, 2001).

En seres humanos, se describe el efecto abortivo y tóxico al ingerir el extracto acuoso de las hojas en grandes dosis y con frecuencia.

El efecto externo de la ruda es tan irritante que el manejo continuo de la planta puede ocasionar ardor, eritema, picazón, y vesicación de la piel. Causa además dermatitis y fotodermatitis. Vía oral, el aceite puede causar un severo dolor de estómago, vómito, confusión y convulsión, y hasta la muerte (Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana).

Planteamiento del problema

Actualmente uno de los principales problemas de salud en el mundo es el cáncer, el cual resulta una de las principales causas de muerte en la población tanto por su agresividad como por su capacidad invasiva. Además, existe la dificultad de establecer un tratamiento adecuado contra este síndrome que sea eficaz y selectivo al reconocer células cancerosas.

En este sentido, la aplicación de lectinas se considera como una alternativa viable en la etapa inicial del cáncer, ya que, limitan el crecimiento de las células malignas en estadios tempranos, además de poseer un efecto antioxidante que impide la producción excesiva de radicales libres, aunado a esto, son capaces de reconocer a aquellas células transformadas de las normales al unirse a los azúcares de membrana que presentan las células malignas e inducir muerte celular en las mismas.

Justificación

En México, 30% de los casos de cáncer en mujeres corresponden al cáncer de mama. Los tratamientos empleados en la actualidad son poco selectivos en cuanto a las células diana, por lo tanto es necesario recurrir a nuevos métodos para contrarrestar este problema de salud. Durante la progresión de la célula sana a maligna, se presentan una gran cantidad de cambios entre los que destacan la síntesis descontrolada de biomoléculas, como los glúcidos de las membranas. Lo anterior afecta tanto a la comunicación como al reconocimiento de las células, así como a su capacidad de evadir señales de muerte celular. Las lectinas son moléculas capaces de reconocer azúcares de forma selectiva, así como de inducir muerte a células cancerígenas vía apoptosis o bien, induciendo a las células cancerosas a autofagia, no ocurriendo esto en células sanas, se presume que esto ocurre gracias a un mecanismo de reconocimiento a azúcares, por lo que estas proteínas a futuro podrían aplicarse en el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Hipótesis

El cáncer está asociado a una producción excesiva de radicales libres, entonces, la administración del extracto de *R. graveolens* enriquecido con lectinas interferirá con el proceso de carcinogénesis, restableciendo la homeostasis en la producción de radicales libres.

Objetivos

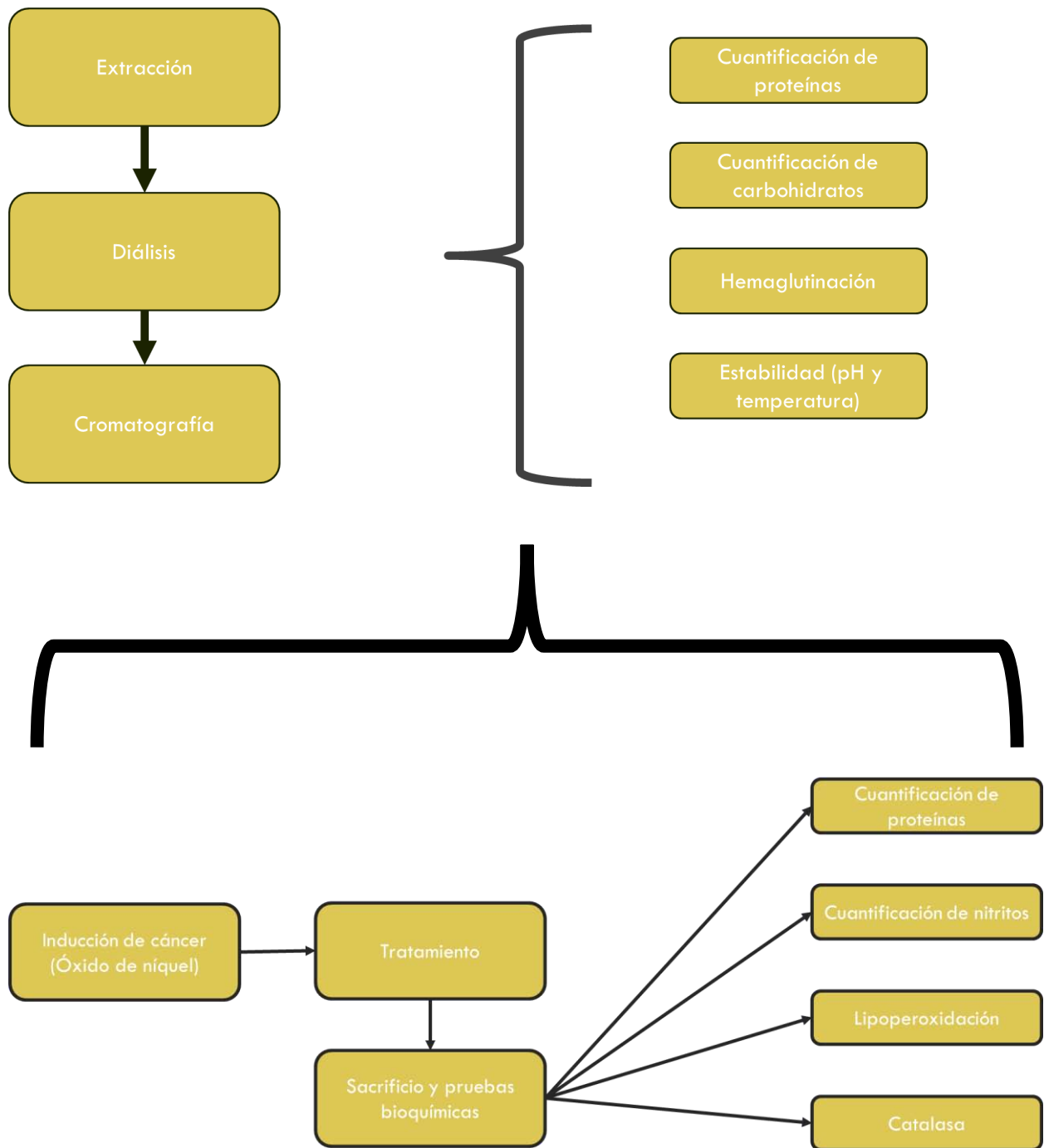
Objetivo general

Evaluar el efecto de las lectinas de *R. graveolens* en un modelo murino de cáncer por medio de marcadores de estrés oxidativo.

Objetivos particulares

- Obtener un extracto salino enriquecido con lectinas de tallo de *R. graveolens*.
- Caracterizar bioquímicamente las lectinas presentes en el extracto enriquecido de forma parcial.
- Generar un proceso de carcinogénesis en ratones hembra de la cepa CD-1 por medio de una administración de NiO.
- Inferir por medio de la cuantificación de nitritos la presencia de óxido nítrico en sangre e hígado de ratón.
- Evaluar la capacidad de detoxificación de peróxido de hidrógeno por la actividad enzimática de catalasa en hígado y sangre de ratón.
- Analizar el daño a membrana celular por medio de la peroxidación lipídica en hígado y sangre de ratón.

Materiales y Método



1. Extracción salina



Figura 5 Extracción de proteínas empleando solución de alto poder iónico

Debido a un aumento en la fuerza iónica del medio disminuye la interacción proteína- agua al eliminarse la capa de solvatación, lo cual genera que las proteínas interactúen entre sí y de esa manera aumenten su densidad y se separen (Mendoza *et al*, 2007). Es importante remarcar que por este método se evita la desnaturalización de las proteínas extraídas.

Se realizó una extracción salina de proteínas de tallo de *R. graveolens* L.

Se emplearon 100 g de material vegetal fresco limpio y se maceraron en una relación 1:3 con solución salina al 10%. Posteriormente se dejó el material vegetal junto con la solución salina empleada y se refrigeró por 24 horas.

El material vegetal fue removido de la mezcla por filtración, obteniendo el mayor volumen de extracto posible. Una segunda filtración se llevó a cabo a vacío utilizando papel cuantitativo Wattman no.1. El

extracto fue centrifugado a 3,500 RPM (Revoluciones por minuto) por 20 minutos, y posteriormente a 4,000 RPM por 10 minutos. Después de ser centrifugado se desechó el botón celular en cada ocasión (Figura 5).

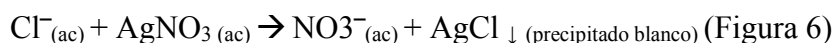
2. Purificación parcial

2.1. Diálisis

Este proceso se realiza con el objetivo de retirar componentes de bajo peso molecular, en especial sales y se basa en las propiedades de una membrana semipermeable que permite el paso a moléculas inferiores a cierto peso molecular, reteniendo en el interior a aquellas mayores, siendo el transporte consecuencia de la diferencia de concentración a ambos lados de la membrana (Sánchez-Ferrer, 1998).

Se colocó el extracto en el interior de una membrana con un poro de 3 KDa, se selló con la finalidad de evitar pérdida de éste y se introdujo en un volumen de agua destilada 10 veces mayor al contenido en el interior de la membrana y se mantuvo en agitación por 24 horas.

Posterior a este lapso se realizó una prueba cualitativa a dicho medio, la cual consistió en colocar 200 μL de medio en un vidrio de reloj y añadir 100 μL de solución de nitrato de plata 0.1 M, de haber cloruro de sodio presente en el medio, se formó un precipitado lechoso, como indica la reacción:



De presentarse dicho precipitado se cambió el medio de diálisis; al no aparecer éste, el extracto se colectó en frascos limpios y se almacenó en refrigeración. A esta fracción se le denominó extracto dializado.

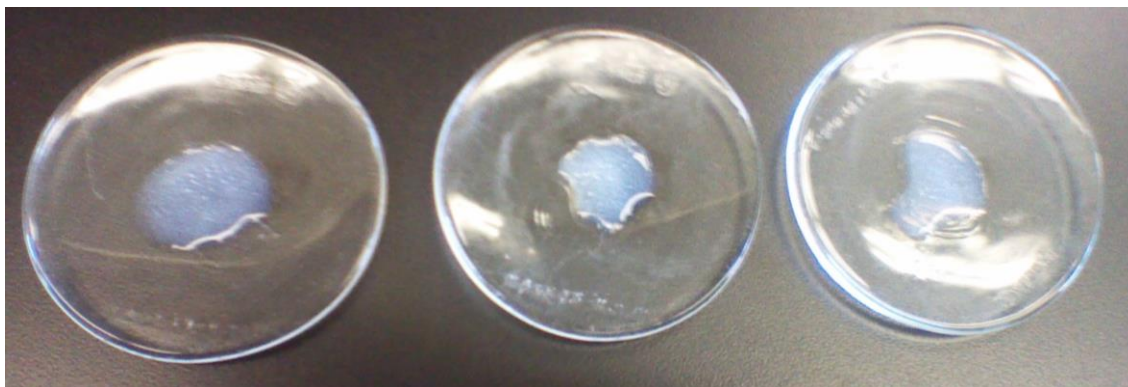


Figura 6 Precipitado de cloruro de plata, positivo a presencia de cloruro de sodio.

2.2 Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad es una variante que permite la purificación de ciertas sustancias al emplear una matriz o fase estacionaria rica en algún compuesto afín a aquella que deseamos purificar, en este caso, proteínas. El ligando afín puede ser algún carbohidrato, inmunoglobulina, antígeno, entre otros, y puede ser específico para una proteína o familia de proteínas (Burden y Whitney, 1995).

La cromatografía de afinidad tiene la ventaja de ser altamente selectiva para la retención de proteínas afines a la columna, para ello, emplean sistemas de baja presión, columnas cortas y un campo restringido para la separación (Química analítica instrumental, 2007).

Se preparó la columna empleando sílica gel, en una bureta de 25 mL, evitando la formación de espacios dentro de ésta, hasta la marca de 5 mL.

Se añadió el extracto dializado con cuidado de no impactar con demasiada fuerza sobre la sílica y se dejó que todo éste pasara al final de la columna, colectándolo en un recipiente limpio.

Con la finalidad de evaluar la afinidad diferencial azúcares de las proteínas contenidas en el extracto dializado, se realizó la elución empleó diferentes con 40 mL de diferentes soluciones 0.1 M de los siguientes azúcares:

- Arabinosa
- Galactosa
- Sorbitol
- Sacarosa
- Manitol
- Lactosa
- Glucosa
- Fructosa

Se colectó cada fracción por separado y se preservaron a una temperatura de 4° C.

Se dializó cada fracción como se señaló anteriormente y para garantizar que el proceso había sido exitoso al extraer los azúcares empleados para la elución, se cuantificó los azúcares presentes en el medio por el método de Dubois (Lugter, 2010).

3. Caracterización bioquímica

3.1. Cuantificación de proteínas

Se realizó por el método de Biuret y por el método directo o UV.

El método de Biuret se basa en la generación de color en presencia de enlaces peptídicos

El ion del cobre forma un complejo planar rectangular entre los cuatro átomos de nitrógeno de los grupos amino de dos cadenas polipeptídicas paralelas, resultando una solución de proteínas azul (Burden y Whitney, 1995).

Para la cuantificación por el método de Biuret se elaboró una curva patrón con BSA (Albúmina sérica bovina), en un rango de 0.1 a 1 mg/mL, teniendo como volumen final 1 mL, a lo cual se añadió 4 mL de reactivo de Biuret. Para la cuantificación de las muestras se tomó 500 μ L de muestra y se completó el volumen a 1 mL, se dio el mismo tratamiento que a la curva patrón y se leyó a 545 nm después de 20 minutos. (Figura 7).

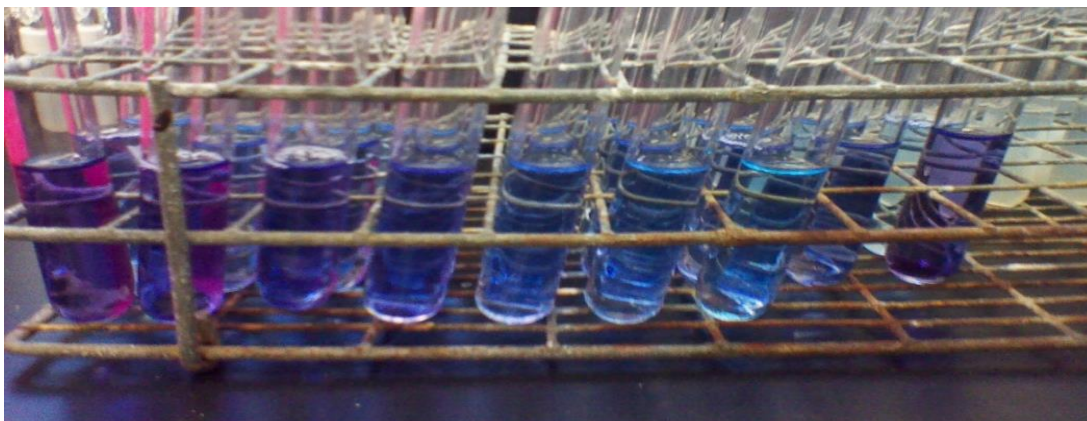


Figura 7 Cuantificación de proteínas por el método de Biuret

El método directo o UV se fundamenta en que ciertos aminoácidos, como el triptófano y tirosina y, en menor medida, fenilalanina, pueden ser leídos en una longitud de onda de 280 nm, sin embargo, dado que no se conoce el coeficiente de extinción molar de las proteínas

presentes en la muestra, se parte del supuesto de que la proporción de estos aminoácidos es similar a la que se puede encontrar en BSA (Burden y Whitney, 1995).

Para la cuantificación por el método directo se precipitó las proteínas presentes en 150 μL de extracto con 75 μL de TCA (Ácido Tricloroacético) al 10%, después de lo cual se centrifugó a 4000 RPM por 15 minutos, se desechó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 mL de solución 1:1 de NaOH 0.8 N y SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) a una concentración de 10%.

Se empleó como blanco la solución de resuspensión y se leyó la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro UV, para conocer la concentración de proteínas presentes en dicha muestra se aplicó la siguiente fórmula:

$$[] (\text{mg/mL}) = (1.55 \times A_{280}) - (0.76 \times A_{260}).$$

3.2 Cuantificación de carbohidratos totales y reductores

Este método propuesto por Dubois *et al* en 1956 se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar, empezando con una deshidratación simple, si se continúa el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para generar compuestos coloridos, producto de la condensación de compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo. Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos. La forma en que procede la reacción no es estequiométrica y depende de la estructura del azúcar, por lo tanto se realiza una curva patrón (Lugter, 2010).

En este método, el azúcar se torna hidroximetilfurfural (HMF) o furfural (F), los cuales serán determinados leyendo la absorbancia a 490 nm (López-Córdoba, 2011).

Se cuantificaron carbohidratos totales por el método de Dubois, el cual se basa en el hecho de que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas.

Para su desarrollo se elaboró una curva patrón de glucosa de 10 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de glucosa, completando a 1 mL, y se añadió 0.6 mL de fenol al 5% y 3.6 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se homogeneizó y se leyó a 480 nm una vez que se hubo enfriado los tubos.

La preparación de las muestras problema se llevó a cabo tomando 100 μL de muestra y completando el volumen a 1 mL; el resto del proceso se llevó a cabo de la misma forma que en el caso de la curva patrón (Figura 8).

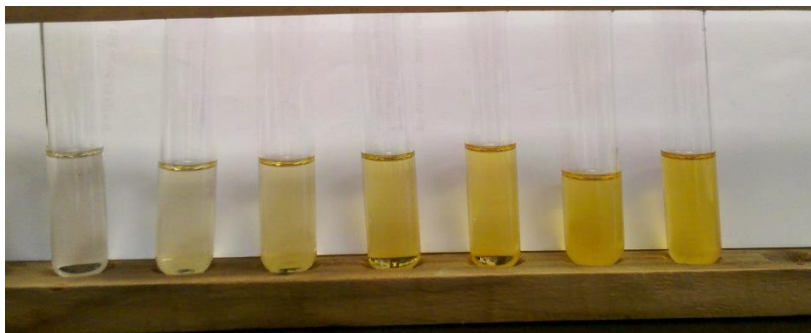


Figura 8 Reacción de Dubois o de Fenol-ácido sulfúrico

Para la cuantificación de azúcares reductores se empleó el método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalisílico).

El método DNS es una técnica colorimétrica que emplea 3,5-ácido dinitrosalicílico para la hidrólisis de polisacáridos presentes en una muestra, seguido de la determinación espectrofotométrica de los azúcares reductores.

El ácido 3,5-dinitrosalicílico en presencia de calor reduce el ácido 3-amino-nitrosalisílico por los azúcares reductores presentes, desarrollándose un color amarillo-café, el cual es estable hasta por 24 horas (Mejía-Giraldo et al, 2007).

Se elaboró una curva patrón de glucosa en un rango de 0.5 a 2 mg/mL de glucosa, completando el volumen a 500 μL . Para la cuantificación de azúcares reductores en las muestras se tomó 500 μL de muestra, y, tanto a los tubos con los cuales se elaboró la curva como a las muestras, se les añadió 500 μL de reactivo DNS, se colocaron a baño maría en ebullición por 5 minutos y se adicionó 5 mL de agua destilada a cada tubo.

Se leyó la absorbancia de cada muestra a 540 nm y se obtuvo la concentración de azúcares reductores contrastando con los valores obtenidos por medio de la curva patrón (Figura 9).



Figura 9 Reacción de DNS

3.3 Termoestabilidad

Se sabe que las proteínas nativas son estables prácticamente de forma exclusiva en condiciones fisiológicas; lo cual las vuelve susceptibles a desnaturalización por alteraciones en el equilibrio de las fuerzas débiles que no forman enlaces y mantienen la conformación nativa.

Al calentar una proteína en solución, sus propiedades sensibles de conformación como la rotación óptica, la viscosidad y la absorción de UV cambian de forma abrupta en un espectro de temperaturas estrecho.

Esta alteración casi discontinua indica que la estructura nativa de la proteína se despliega en una forma cooperativa; cualquier despliegamiento parcial de la estructura desestabilizada la remanente, que debe colapsar en forma simultánea para enrollarse al azar (Voel y Voet, 2006).

Para realizar esta prueba, las proteínas fueron incubadas a temperatura ambiente, 40, 60, 80 y 100 °C durante 30 minutos cada una, para posteriormente someterse al ensayo de hemaglutinación como se realiza normalmente.

3.4 Estabilidad en cambios de pH

Se incluye a los cambios de pH como uno de los motivos de desnaturalización, ya que alteran los estados de ionización de las cadenas laterales de aminoácidos, lo cual cambia la distribución de carga de la proteína y por lo tanto, los requerimientos para la formación de puentes de hidrógeno (Voel y Voet, 2006).

Se incubó las proteínas a pH 5, 8 y 11 por 18 horas, para posteriormente neutralizar con el conjugado del buffer empleado, una vez hecho esto, se sometió a las proteínas a la prueba de hemaglutinación de forma regular.

4. Ensayo funcional

4.1 Hemaglutinación en sistema ABO

Las lectinas son proteínas que se combinan específicamente con moléculas de carbohidratos. Debido a que los carbohidratos están presentes de forma casi universal en la superficie externa de las membranas celulares, las lectinas pueden emplearse para marcar y aglutinar células por medio de éstos (Deyrup – Olsen I, 1994).

La aglutinación consiste en la agregación sistemática de células mediada por macromoléculas específicas (lectinas) que reconocen estructuras moleculares determinadas (antígenos) sobre la superficie celular. Este proceso depende del número de determinantes antigénicos y de su localización sobre la célula.

Los antígenos definidos por estructuras de azúcares, son productos indirectos de genes, entre éstos, se encuentran los de los grupos sanguíneos A, B y O. Cuando las células que se aglutinan son glóbulos rojos, el fenómeno se denomina hemaglutinación. La distribución de los ligandos en la superficie de la membrana es diferente para cada aglutinina utilizada, lo cual depende de la afinidad y del sitio de unión específico. A medida que aumenta el poder aglutinante de la lectina, el aglutinado toma una forma esférica.

La mayoría de las lectinas aglutinan eritrocitos de todos los grupos sanguíneos, actuando a la misma dilución y por lo tanto no son específicas de grupo (Rodríguez *et al*, 2004).

Se empleó sangre de los grupos A, B y O Rh positivo, las cuales se centrifugaron a 3900 RPM por 20 minutos, y se retiró el plasma, posteriormente se lavó con PBS en una proporción de 10:1, posterior a lo cual se centrifugó a 3900 RPM por 20 minutos, repitiendo este proceso dos ocasiones, después de lo cual se preparó una suspensión de eritrocitos al 3%.

Se colocó en una placa de pocillos cóncavos 50 µL de solución de eritrocitos y se añadió extracto con una concentración proteica de 50 µg/mL, 40 µg/mL, 30 µg/mL, 20 µg/mL y 10 µg/mL; se incubó por 1 hora y se examinó cada pocillo tanto de forma macroscópica como

microscópica, resuspendiendo la solución restante y colocando 10 μ L de muestra en un portaobjetos, se observó con aumento de 10X y 40X.

5 Actividad biológica

5.1 Diseño experimental

Se formaron grupos experimentales con seis individuos cada uno, todos ratones hembras de la cepa CD-1, con un mes de edad al momento de la inducción de cáncer, a los cuales se tuvo en observación tres meses después, registrando semanalmente el peso de los individuos, posterior a este lapso se les administró lectinas de tallo de ruda vía oral, dicho tratamiento tuvo una duración de 10 días, posterior a lo cual se sacrificó a los individuos por decapitación. Desde el nacimiento al fin del tratamiento, los ratones se mantuvieron en condiciones de bioterio, con agua y comida *ad libitum*. Se puede observar las características individuales de cada grupo en la tabla 1.

Tabla 1 Diseño experimental

| Grupo | Características |
|-----------|---|
| Control | Los individuos tuvieron un desarrollo normal, sin mayor manipulación que la recibida por el personal de bioterio. |
| Vehículo | Se les inyectó únicamente vehículo en el momento de la inducción (0.05 mL de aceite de oliva), durante el tratamiento se administró solución fisiológica. |
| NiO | Se le administró óxido de níquel vía intradermal (10 mg de NiO en 0.05 mL de aceite de oliva). |
| Control 1 | Se administró la lectina a la dosis establecida más elevada (1.5 mg/kg) posterior al periodo de inducción de cáncer. |
| Tx 1 | Se administró óxido de níquel vía intradermal y posterior al periodo de inducción de cáncer se administró la lectina a la dosis más elevada (1.5 mg/kg). |
| Control 2 | Se administró la lectina a la dosis intermedia (1 mg/kg) posterior al periodo de inducción de cáncer. |
| Tx 2 | Se administró óxido de níquel vía intradermal y posterior al periodo de inducción de cáncer se administró la lectina a la dosis intermedia (1 mg/kg). |
| Control 3 | Se administró la lectina a la dosis más baja (0.5 mg/kg) posterior al periodo de inducción de cáncer. |
| Tx 3 | Se administró óxido de níquel vía intradermal y posterior al periodo de inducción de cáncer se administró la lectina a la dosis más baja (0.5 mg/kg). |

5.2 Inducción de cáncer y seguimiento del proceso

La ingestión del níquel vía alimentos y en menor medida por medio del agua, son la principal vía de exposición para la población no fumadora. También puede darse vía inhalación o por absorción percutánea.

El níquel y sus compuestos son potentes cancerígenos, tanto en los animales como en el hombre (Ortiz Díaz *et al*, 1995).

El mecanismo de acción del óxido de níquel es por medio de factores genéticos y epigenéticos, como son cambios conformacionales y generación de radicales de oxígeno. Además, existen reportes acerca de compuestos de níquel que promueven la proliferación celular; por lo tanto, lo que podrían ser lesiones reparables de ADN pasan a ser mutaciones irreparables (Das *et al*, 2008).

Se ha reportado que parte de la toxicidad de óxido de níquel se debe a la producción de radicales libres, la cual se considera moderada (Cameron *et al*, 2011).

Se administró óxido de níquel vía intradermal debajo de la mama izquierda a una dosis única y una sola aplicación a los grupos de los cuales se mencionó previamente que fueron tratados.

Se aplicó un volumen de 0.05 mL de aceite de oliva, los cuales contenían 10 mg de óxido de níquel.

Se permitió el progreso del proceso carcinogénico y se monitoreó tanto el peso como el desarrollo de abultamientos palpables a lo largo de 3 meses, registrando cambios en peso de forma semanal y parición y progreso de abultamientos conforme éstos aparecieron (Figura 10).



Figura 10 Tumor en ratón hembra de la cepa CD-1 posterior a inducción de cáncer con óxido de níquel

5.3 Tratamiento

Al concluir el periodo de inducción de cáncer en los individuos experimentales, se aplicó a los ratones preestablecidos para ello las tres diferentes dosis de lectinas, habiendo sido seleccionadas aquellas presentes en la fracción de glucosa, y siendo las dosis elegidas 1.5 mg/kg, 1 mg/kg y 0.5 mg/kg, con base en la LD₅₀ (Dosis letal media) del extracto acuoso de *R. graveolens* para ratones, la cual es de 219.45 mg/Kg (Lagarto-Parra *et al*, 2001) y la concentración de proteínas en los extractos, siendo el vehículo para la administración de las proteínas presentes en la fracción seleccionada solución fisiológica.

Las dosis fueron administradas diariamente durante un periodo de 10 días, después de los cuales se procedió a sacrificar a los individuos.

5.4 Obtención de hígado y plasma

Se sacrificó a los individuos por el método de decapitación y se colectó la sangre en tubos de vacutainer con EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético), los cuales de inmediato fueron colocados en hielo.

Se extrajo cuidadosamente el hígado de cada ratón y se colocó debidamente etiquetado en solución fisiológica y en hielo.

Posteriormente se perfundió cada hígado en solución fisiológica hasta que se limpió por completo la sangre y se sumergieron en amortiguador PBS previo a la maceración.

La maceración se realizó en morteros de porcelana siguiendo una proporción de 5 mL de amortiguador de homogenización por cada gramo de hígado de ratón.

Una vez macerado el contenido del mortero se vertió en tubos cónicos, filtrándolo por medio de una doble capa de gasa.

Tanto las muestras de sangre como el homogenado de hígado fueron centrifugados a 5000 RPM por 5 minutos.

Para la realización de las pruebas biológicas se empleó el plasma y el sobrenadante del macerado de hígado.

5.5 Cuantificación de proteínas en hígado y plasma

Se cuantificó proteínas en hígado y plasma de ratón por el método de Biuret (Burden y Whitney, 1995).

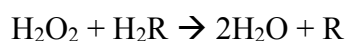
Para su cuantificación se tomaron 50 μ L de muestra y completando a un volumen final de 1 mL.

5.6 Actividad enzimática de catalasa en hígado y plasma

La catalasa es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano, aunque su actividad varía según el tejido, ésta resulta más elevada en el hígado y los riñones, más baja en el tejido conectivo y los epitelios. 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. Consta de 4 subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX y el contenido protohémico y el de hierro representan un 1,1 % y 0,09 % respectivamente del peso molecular total de la enzima.

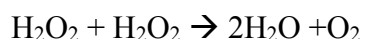
La catalasa como parte del sistema antioxidante está involucrada en la destrucción del H₂O₂ generado durante el metabolismo celular. Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero relativamente poca afinidad por el sustrato. Presenta dos funciones: la catalítica y la peroxidativa.

Ambas se pueden representar por la ecuación:



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 H₂O₂. 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. Esta función se puede realizar con monómeros, dímeros y tetrameros (Céspedes-Miranda *et al*, 1996).

En el rango ultravioleta H₂O₂ muestra un aumento continuo en la absorción con longitud de onda decreciente. La descomposición de H₂O₂ puede ser seguida por el decremento a absorbancia de 240 ($\epsilon_{240} = 0.00394 \pm 0.0002$ litros/mmol mm) diferencia en absorbancia (ΔA_{240}) por unidad de tiempo es una medición de la actividad de la catalasa.

Esta medición puede llevarse a cabo en un rango de 0 a 37 °C, aunque el ideal es 20 °C, mientras el rango de pH puede ir de 6.8 a 7.5, aunque suele hacerse a un pH de 7.0 (Aebi, 1947)

Se utilizó peróxido de hidrógeno 30mM en amortiguador PBS.

Se colocaron 3 mL del sustrato y 25 μ L de muestra, se resuspendió cuidadosamente y se leyó inmediatamente en un espectrofotómetro UV a una absorbancia de 240 nm, registrando la absorbancia obtenida cada 10 segundos por 5 minutos, y empleando la pendiente de la

recta de tiempo contra sustrato degradado para determinar la actividad de la enzima catalasa (Figura 11).



Figura 11 Prueba de actividad de catalasa

5.7 Cuantificación de nitritos en hígado y plasma

El $\text{NO}\bullet$ se sintetiza a partir de la L-arginina, por la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que posee tres isoformas, NOS-I, NOS-II y NOS-III. La NOS-I y la NOS-III son descritas como isoformas constitutivas (cNOS) y pueden ser objeto de regulación génica, mientras que la NOS-II representa la isoforma inducible (iNOS), ya que se expresa en células estimuladas por diferentes citoquinas proinflamatorias como la interleucina-1 (IL-1), interferón gamma ($\text{INF-}\gamma$) y el factor de necrosis tumoral- α ($\text{TNF-}\alpha$). La NOS-II produce concentraciones mucho más elevadas de $\text{NO}\bullet$ con respecto a la actividad de NOS-I y NOS-III.

La cuantificación de NO• es difícil en medios biológicos, debido a su corta vida media (de 6 a 10 segundos) y a sus bajas concentraciones y por eso se cuantifican sus metabolitos estables: nitrito y nitrato (Adarmes *et al*, 2009).

Se ha establecido una fuerte correlación entre la producción endógena de NO y los niveles de nitrito y nitrato en plasma, suero y orina, por lo tanto, la medición de estos niveles provee de una fuente cuantitativa confiable de la producción de NO in vivo (Miranda *et al*, 2001).

Se llevó a cabo siguiendo el método de Griess, en la cual, el nitrito se trata primero con un reactivo diazotizante como la sulfanilamida en medio ácido para formar una sal de diazonio, la cual a su vez se hará reaccionar con N-naftiletilendiamina (NED) para formar un compuesto azo estable. El color púrpura del producto permite leer muestras con concentraciones desde 0.5mM. La absorbancia de este aducto a 540 nm es linealmente proporcional a la concentración de nitritos en la muestra (Sun *et al*, 2003).

Se tomó 100 μ L de muestra y se completó el volumen a 1 mL con agua desionizada y se añadió 1 mL de Sulfanilamida 5 %, se incubó en oscuridad por 15 minutos y posteriormente se añadió NED y se incubó por 15 minutos más, posteriormente se leyó a una absorbancia de 540 nm.

Se calculó la concentración de nitritos presentes en la muestra calculando por medio de una curva patrón de nitrito de sodio elaborada previamente, la cual fue de un rango de concentración de 0 a 100 μ M (Figura 12).

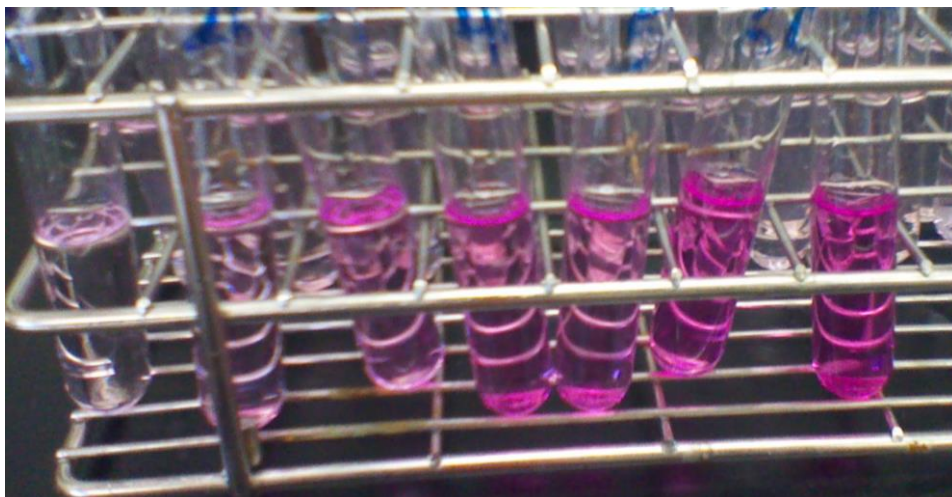


Figura 12 Cuantificación de nitritos por el método de Griess

5.8 Cuantificación de peroxidación lipídica (LPO) en hígado y plasma

La LPO es un proceso complejo que, se sabe, ocurre tanto en plantas como en animales. Este proceso involucra la formación y propagación de radicales lipídicos, absorción de oxígeno, reordenamiento de dobles enlaces en lípidos insaturados y la eventual destrucción de membranas lipídicas, produciendo varias sustancias de desecho, incluyendo alcoholes, cetonas y aldehídos. Las membranas biológicas son ricas en ácidos grasos insaturados y bañadas en un fluido rico en oxígeno con contenido metálico, por lo cual es de esperarse que las membranas lipídicas sean susceptibles a ataques peroxidativos. Generalmente este proceso inicia con la extracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado, lo cual conduce a la formación de un radical lipídico, luego, el nuevo arreglo de los dobles enlaces resulta en la formación de conjugados dieno. El ataque por oxígeno molecular produce un radical peroxi, el cual puede ya sea tomar un átomo de hidrógeno de algún lípido cercano para formar un hidroperóxido lipídico o formar un endoperóxido lipídico.

La formación de endoperóxidos lipídicos en ácidos grasos insaturados que contienen al menos tres dobles enlaces metilados puede llevar a la formación de malondialdehído como producto de lisis (Buege y Aust, 1978).

Se realizó la cuantificación de LPO por el método de TBARS, para lo cual se tomó 0.1 mL de muestra, 0.1 mL de buffer TRIS-HCl, 0.1 mL de FeSO₄ y 0.1 mL de ácido ascórbico y se completó el volumen a 1 mL empleando agua destilada; se incubó por 15 minutos a 37 °C.

Posteriormente se añadió 1 mL de TCA y 2 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico), se cubrieron y se incubaron a 100 °C por 15 minutos, posteriormente se centrifugaron a 3000 RPM por 10 minutos y se leyó el sobrenadante a 532 nm (Figura 13).

Para obtener la concentración de MDA (malondialdehído) en las muestras se empleó el coeficiente de extinción molar de dicho compuesto.



Figura 13 Cuantificación de MDA por el método de TBARS.

6 Análisis estadístico

La concentración de Malondialdehído y nitritos, así como la actividad enzimática de catalasa fueron analizadas por la prueba de ANDEVA de una vía seguida por la prueba de tukey. $P < 0.05$ se consideró como significativo.

Resultados

1. Rendimiento

En la tabla 2 se muestra el rendimiento obtenido en cada una de las etapas de purificación del extracto de tallo de *R. graveolens*.

Tabla 2 Rendimiento de proteínas de tallo de R. graveolens a través de los diferentes pasos de semipurificación

| Fracción | Volumen (mL) | Concentración de proteínas (mg/mL) | Proteínas totales (mg) | Porcentaje |
|---------------------------|---------------------|---|-------------------------------|-------------------|
| Extracto crudo | 300 | 5.9 | 1770 | 100% |
| Extracto dializado | 175 | 0.98 | 171.5 | 9.68% |
| Arabinosa | 39 | 1.63 | 63.57 | 3.59 % |
| Galactosa | 40 | 0.14 | 5.60 | 0.31 % |
| Sorbitol | 46 | 0.19 | 8.74 | 0.49 % |
| Sacarosa | 39 | 0.19 | 7.41 | 0.41 % |
| Manitol | 40 | 0.08 | 3.20 | 0.18 % |
| Lactosa | 41 | 0.65 | 26.65 | 1.50 % |
| Glucosa | 42 | 0.42 | 17.64 | 0.99% |
| Fructosa | 42 | 0.77 | 32.34 | 1.82% |
| TOTAL | | | 165.15 | 9.29% |

Posteriormente se muestra en la tabla 3 el rendimiento con respecto a la actividad hemaglutinante que se presentó en los diferentes pasos de semipurificación.

Tabla 3 comparación de rendimiento respecto a la actividad hemaglutinante

| Fracción | Porcentaje | Actividad hemaglutinante (Grupo sanguíneo A+ y B+ a 50 mg/mL) |
|---------------------------|-------------------|--|
| Extracto crudo | 100% | 0/1 |
| Extracto dializado | 9.68% | 3/2 |
| Arabinosa | 3.59 % | 0/2 |
| Galactosa | 0.31 % | 3/2 |
| Sorbitol | 0.49 % | 3/2 |
| Sacarosa | 0.41 % | 3/3 |
| Manitol | 0.18 % | 3/2 |
| Lactosa | 1.50 % | 3/0 |
| Glucosa | 0.99% | 3/3 |
| Fructosa | 1.82% | 2/0 |

2. Caracterización bioquímica

2.1 Cuantificación de proteínas

Se observó un decremento muy marcado de la concentración proteica al pasar por cada fase de semipurificación, siendo mayores las concentraciones de proteínas de las fracciones de arabinosa, fructosa y lactosa, siendo notablemente pequeña la concentración de proteínas en la fracción de manitol y galactosa (Gráfico 1).

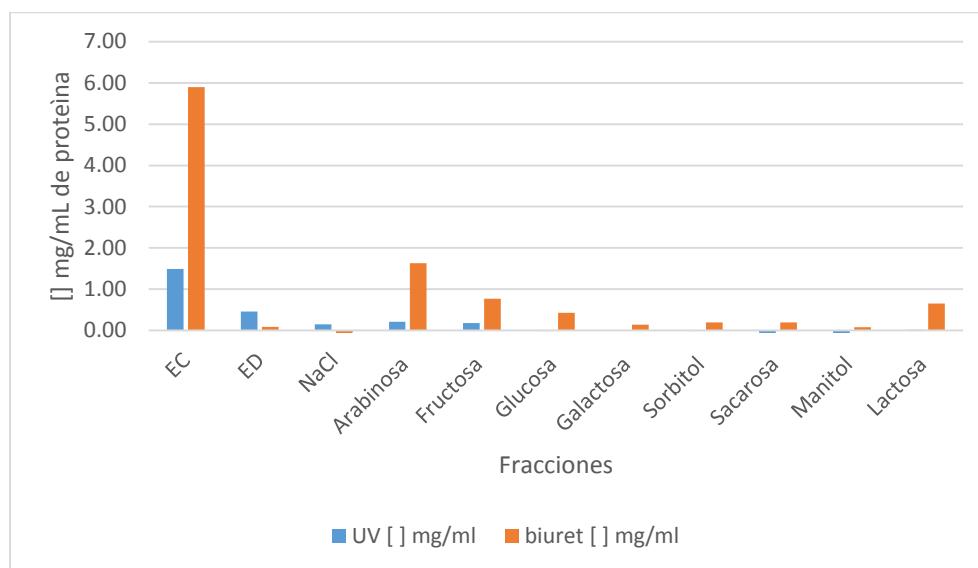


Gráfico 1 Concentración de proteínas por los métodos de Biuret y UV de las diferentes fracciones obtenidas.

2.2 Cuantificación de azúcares totales y reductores

Se cuantificó azúcares totales únicamente en las fracciones de arabinosa, sacarosa y maltosa, siendo los azúcares reductores imposibles de detectar (Gráfico 2).

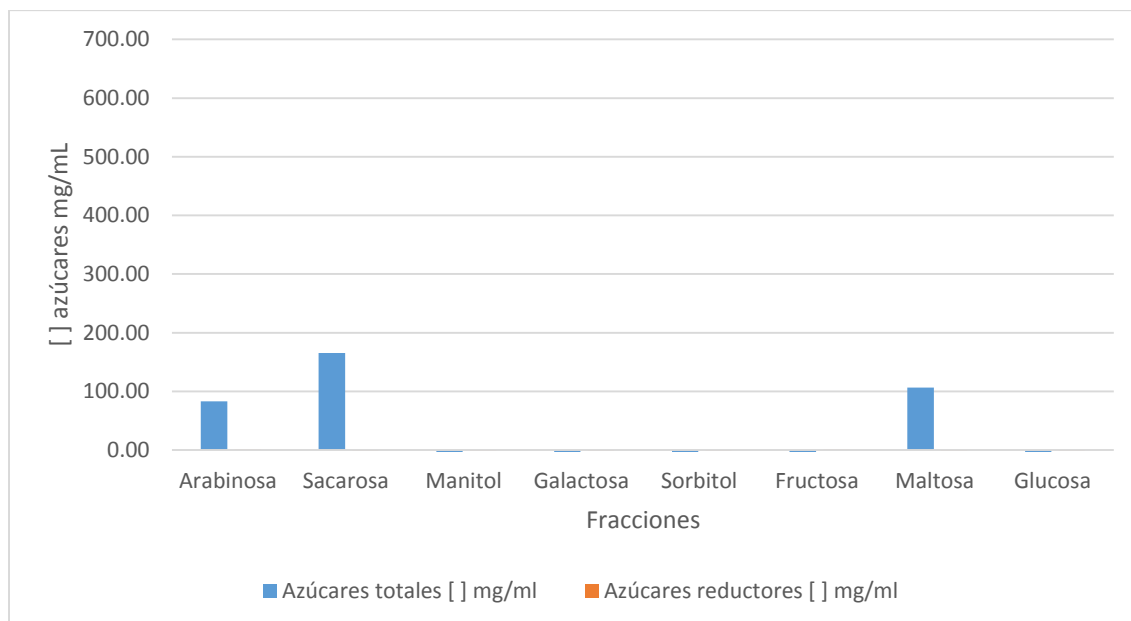


Gráfico 2 Concentración de azúcares totales y reductores de las diferentes fracciones de tallo de Ruta graveolens.

2.3 Termoestabilidad

Se observó al finalizar el tiempo establecido de incubación, en el caso del grupo sanguíneo B+, pérdida en la actividad hemaglutinante a partir de los 40 °C en las fracciones de glucosa y sacarosa, a partir de los 60 °C de extracto dializado, galactosa, sorbitol y arabinosa, y en el caso de 80 °C se detectó pérdida de la actividad hemaglutinante del extracto crudo y fracción eluída con manitol (Figura 14).

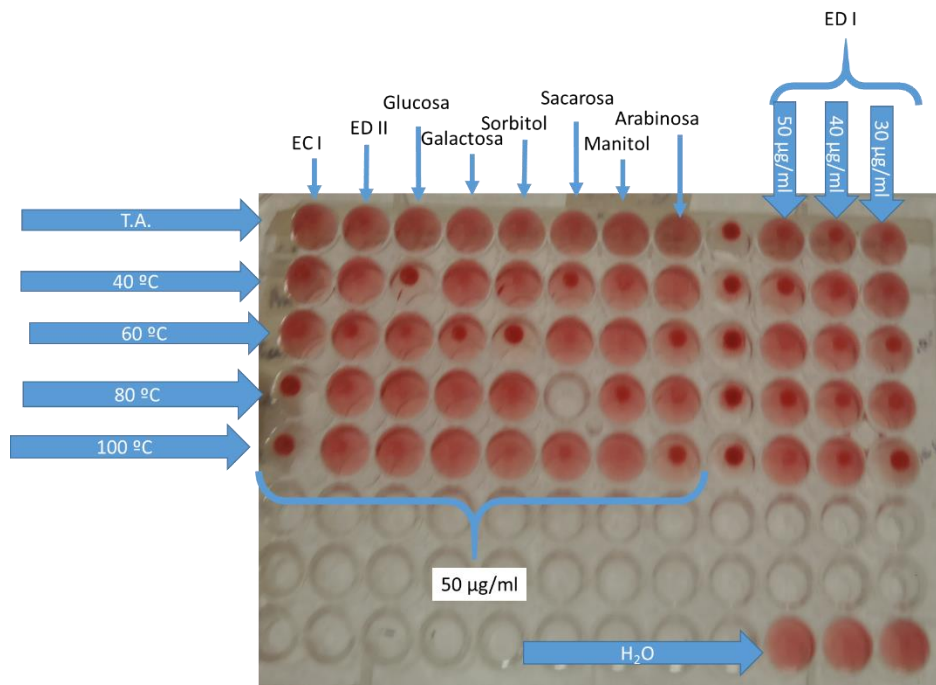


Figura 14 Prueba de termoestabilidad en grupo sanguíneo B+.

En las fracciones probadas para el grupo sanguíneo A+, se observó disminución en la actividad hemaglutinante a 40 °C para lactosa a 50 µg/mL y galactosa a 40 µg/mL, pudiendo observarse esto de nuevo en 100 °C y 80 °C respectivamente. A 60 °C se observa pérdida de la actividad en la fracción de sorbitol, sin embargo, a 80 °C se observa actividad hemaglutinante de nuevo en dicha fracción, sin embargo, a la misma temperatura, la fracción de sacarosa muestra descenso en su actividad. Por otro lado el extracto dializado presenta disminución en su actividad de forma muy tenue a 100 °C (Figura 15).

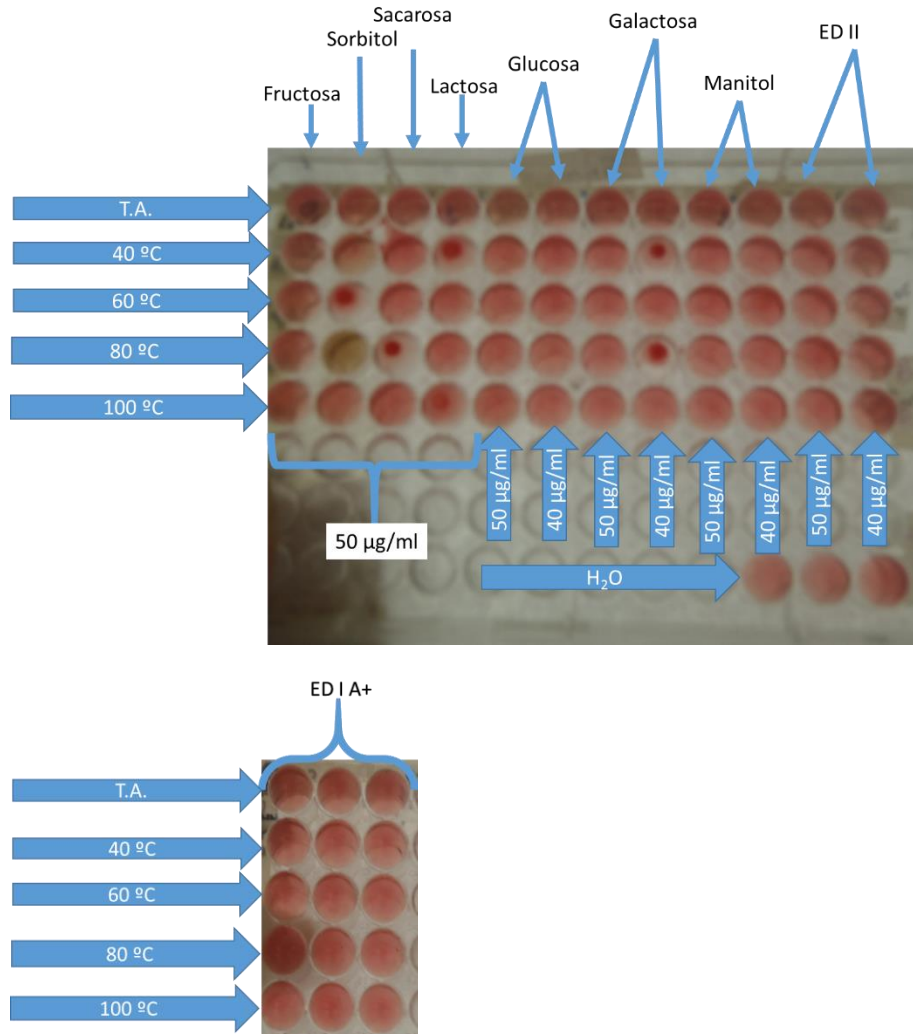


Figura 15 Prueba de termoestabilidad en grupo sanguíneo A+

Para el caso del grupo sanguíneo O +, se encontró cambios relevantes a temperaturas de 100°C para sorbitol y glucosa a 30 µg/mL y sacarosa a 40 µg/mL (Figura 16 y 17).

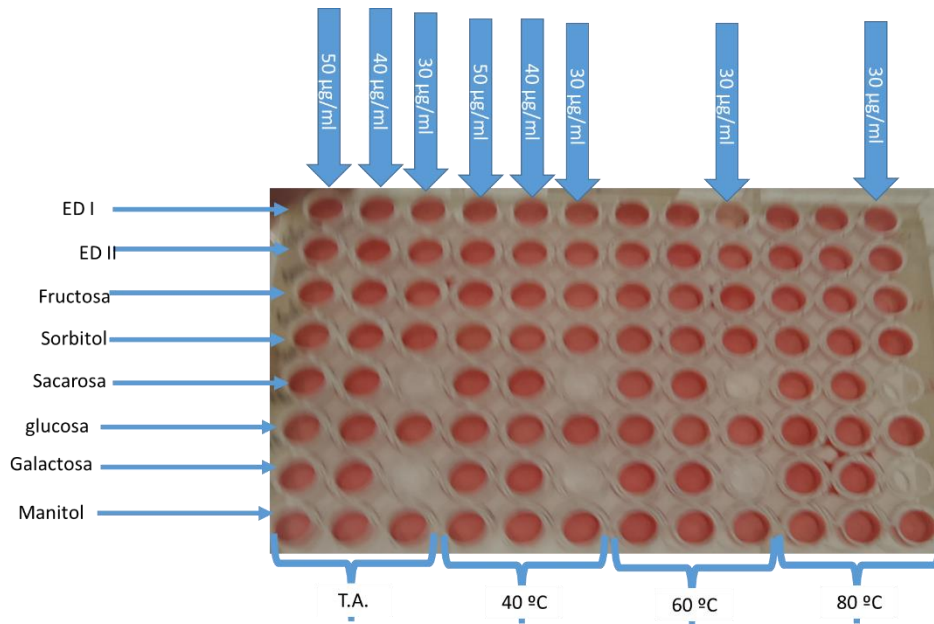


Figura 16 Prueba de termoestabilidad en grupo sanguíneo O+ de temperatura ambiente a 80 °C

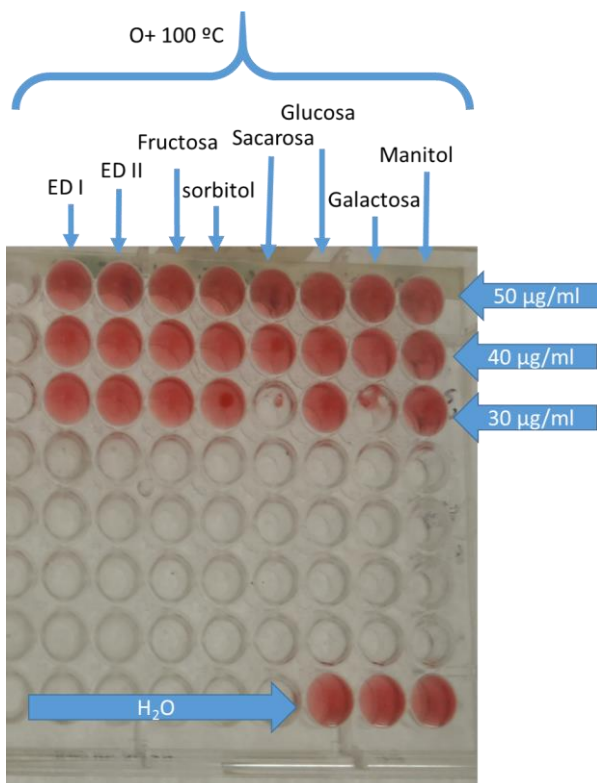


Figura 17 Prueba de termoestabilidad en grupo sanguíneo B+ a 100 °C

2.4 Estabilidad en cambios de pH

Para el grupo sanguíneo B+, la actividad hemaglutinante se pudo observar únicamente en el rango de pH de 8, siendo más notoria la actividad en las fracciones de galactosa y manitol a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 18).

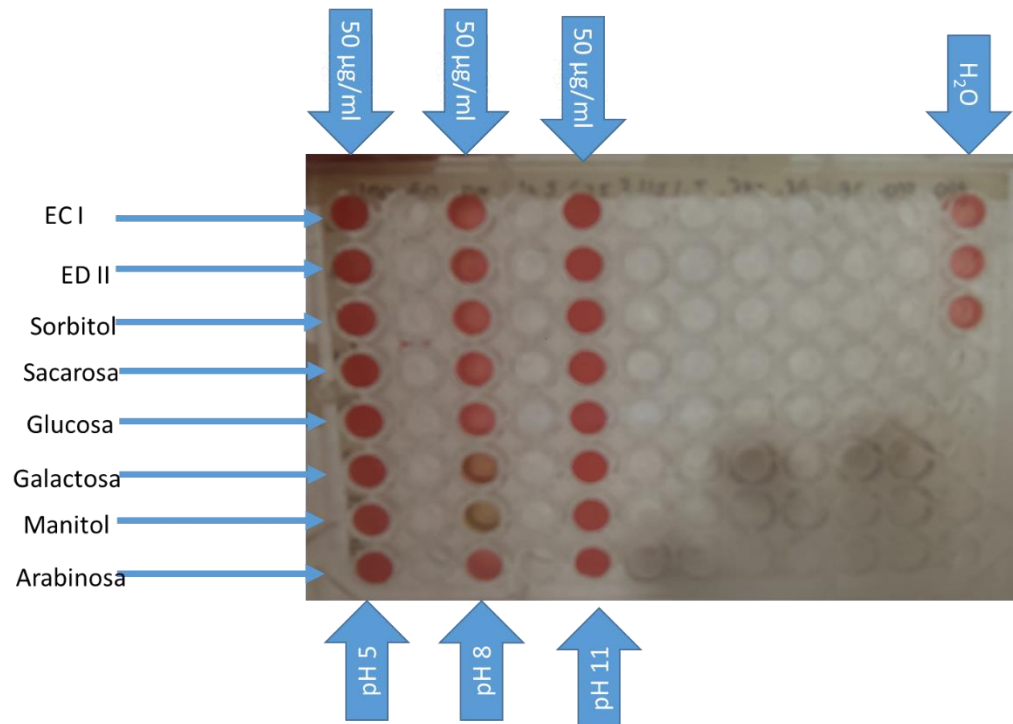


Figura 18 Prueba de estabilidad a cambios de pH en grupo sanguíneo B+.

Para el grupo sanguíneo A+, se puede señalar que sólo hubo actividad hemaglutinante a pH 8, siendo destacable la actividad en las fracciones de lactosa a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 19).

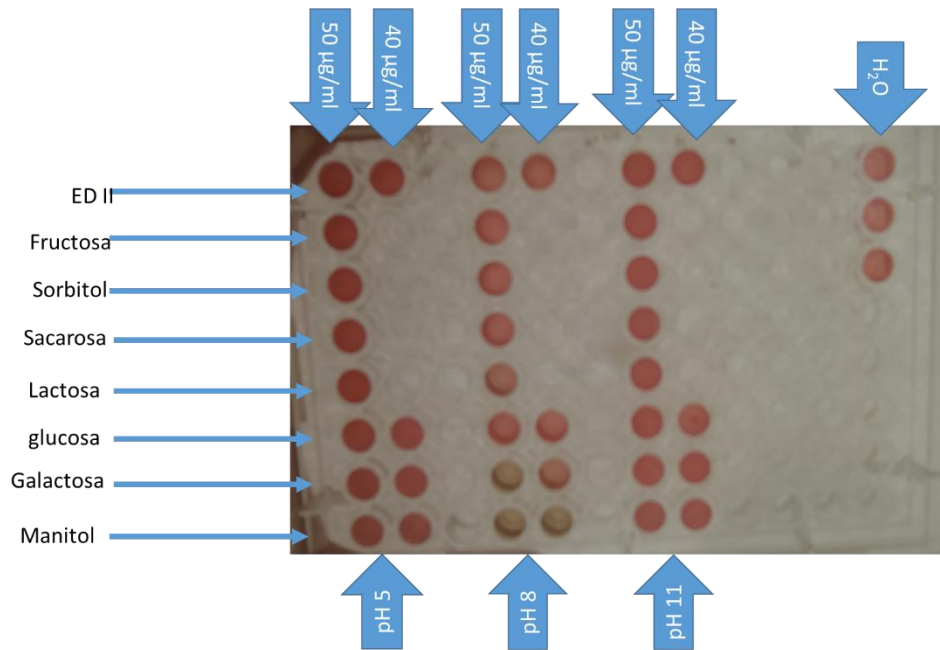


Figura 19 Prueba de estabilidad a cambios de pH en grupo sanguíneo A+.

Para el caso del grupo sanguíneo O+, se puede observar que sólo se dio hemaglutinación a pH 8, con excepción del extracto dializado a las concentraciones de 50 y 40 µg/mL, siendo, por otro lado galactosa a 50 µg/mL y manitol con 50 y 40 µg/mL la que presentaron una mejor actividad hemaglutinante en dichas condiciones (Figura 20).

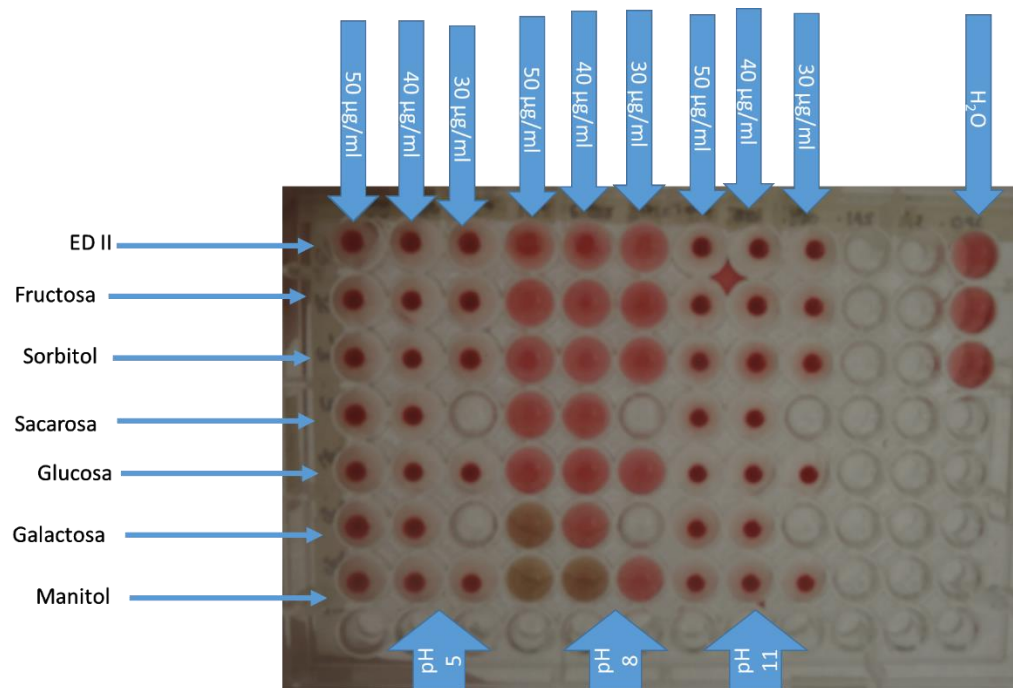


Figura 20 Prueba de estabilidad a cambios de pH en grupo sanguíneo O+

3 Ensayo funcional

3.1 Hemaglutinación en sistema ABO

Se observó al finalizar el tiempo de incubación, de forma macroscópica aglutinación de eritrocitos del grupo B+ en las fracciones de extracto crudo de tallo I a la concentración de 50 µg/mL de forma casi imperceptible, extracto dializado de tallo I en las concentraciones de 50, 40 y 30 µg/mL, siendo más notoria la actividad de la muestra de 40 µg/mL. En extracto dializado de tallo II sólo en la concentración de 50 µg/ mL, con una actividad baja. De las fracciones obtenidas por medio de la elución en columna del extracto se obtuvo aglutinación en las fracciones de glucosa, galactosa, sorbitol, sacarosa, manitol y arabinosa, todas a una concentración de 50 µg/mL, siendo especialmente notorio en el caso de glucosa y sacarosa (Figura 21).

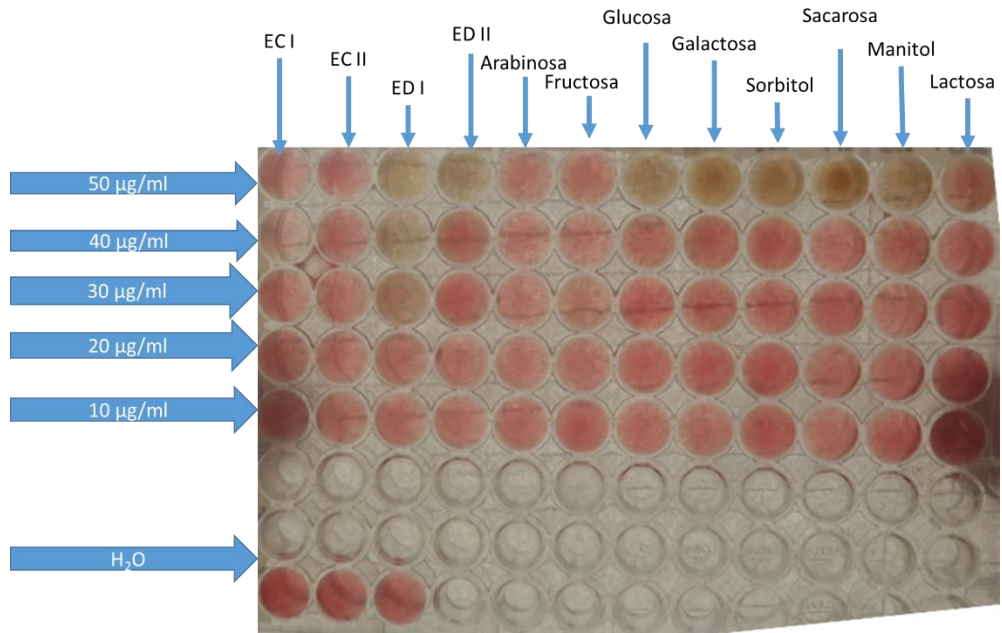


Figura 21 Prueba de hemaglutinación en grupo sanguíneo B+

En el grupo A+ se identificó en la fracción de extracto dializado de tallo I que a 50 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tenía una aglutinación moderada, mientras a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ una aglutinación muy ligera. El extracto dializado de tallo II presentó aglutinación moderada a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y muy ligera a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las fracciones que tuvieron actividad aglutinante fueron fructosa, sorbitol, sacarosa y lactosa, todas a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo fructosa muy ligera y el resto moderadas. También se encontró actividad en las fracciones de glucosa, galactosa y manitol, a 50 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, conservando manitol en ambas concentraciones una actividad moderada, y el resto mostraron una actividad moderada en la dosis mayor y muy ligera en la dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 22).

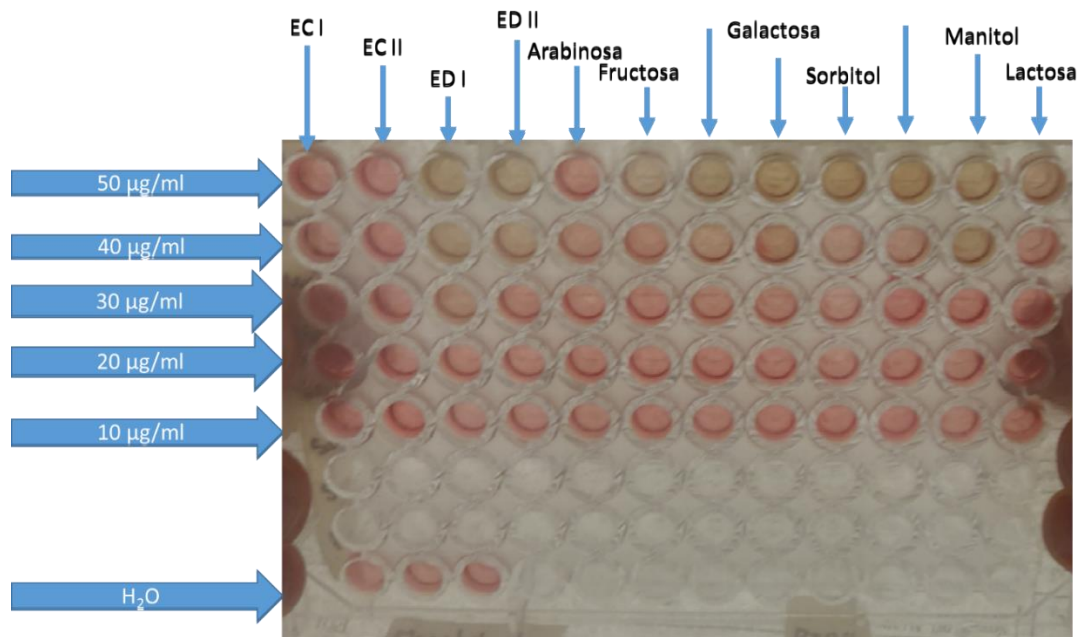


Figura 22 Prueba de hemaglutinación en grupo sanguíneo A+.

En el grupo O+ se observó actividad de ambos extractos de tallo dializados en las concentraciones de 50, 40 y 30 µg/mL siendo ésta moderada, al igual que en la fracción de fructosa y manitol. En el caso de la fracción de glucosa se presentó actividad en las mismas concentraciones de proteínas, siendo la actividad de 30 µg/mL muy ligera. Sorbitol presentó actividad en las mismas concentraciones aunque de forma muy ligera. Galactosa y sacarosa presentaron actividad en las concentraciones de 50 y 40 µg/mL de forma moderada, y finalmente, lactosa sólo presentó actividad a la concentración de 50 µg/mL de forma moderada (Figura 23).

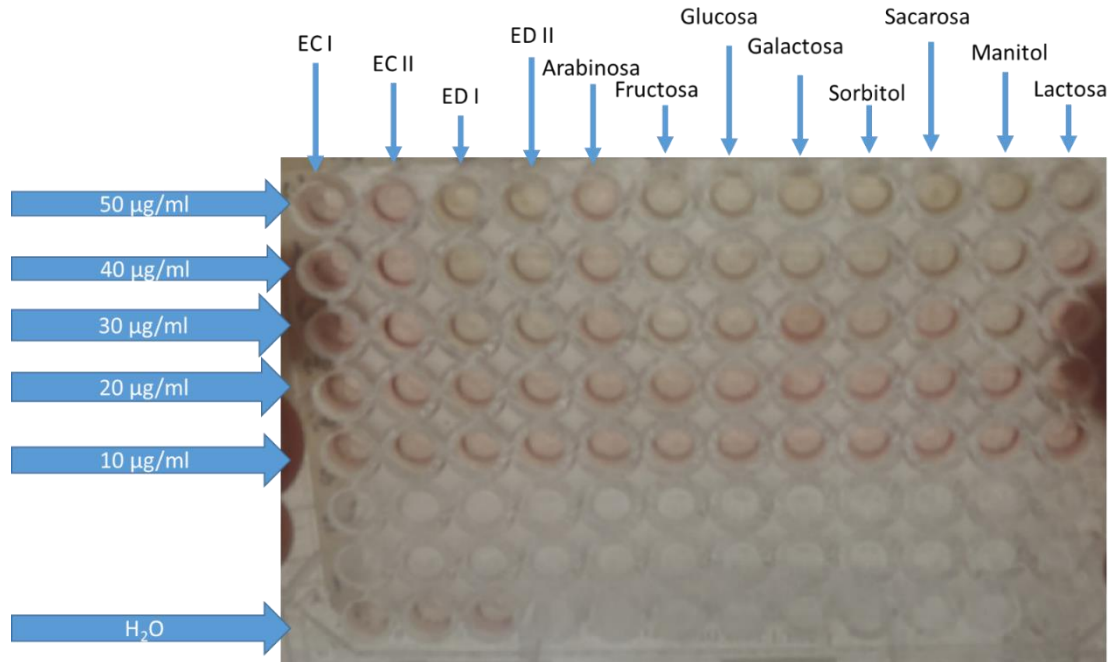


Figura 23. Prueba de hemaglutinación en grupo sanguíneo O+

Se pudo observar en las diferentes placas que la actividad hemaglutinante se dio principalmente en los grupos A+ y B+, pudiendo observarse que en el caso de las muestras aplicadas al grupo sanguíneo A+ existe actividad a concentraciones más bajas que en el caso de B+, sin embargo, esta última presentó actividad en un número mayor de fracciones.

Se presentan ejemplos de diferentes grados de hemaglutinación observados durante éste ensayo (Figura 24).

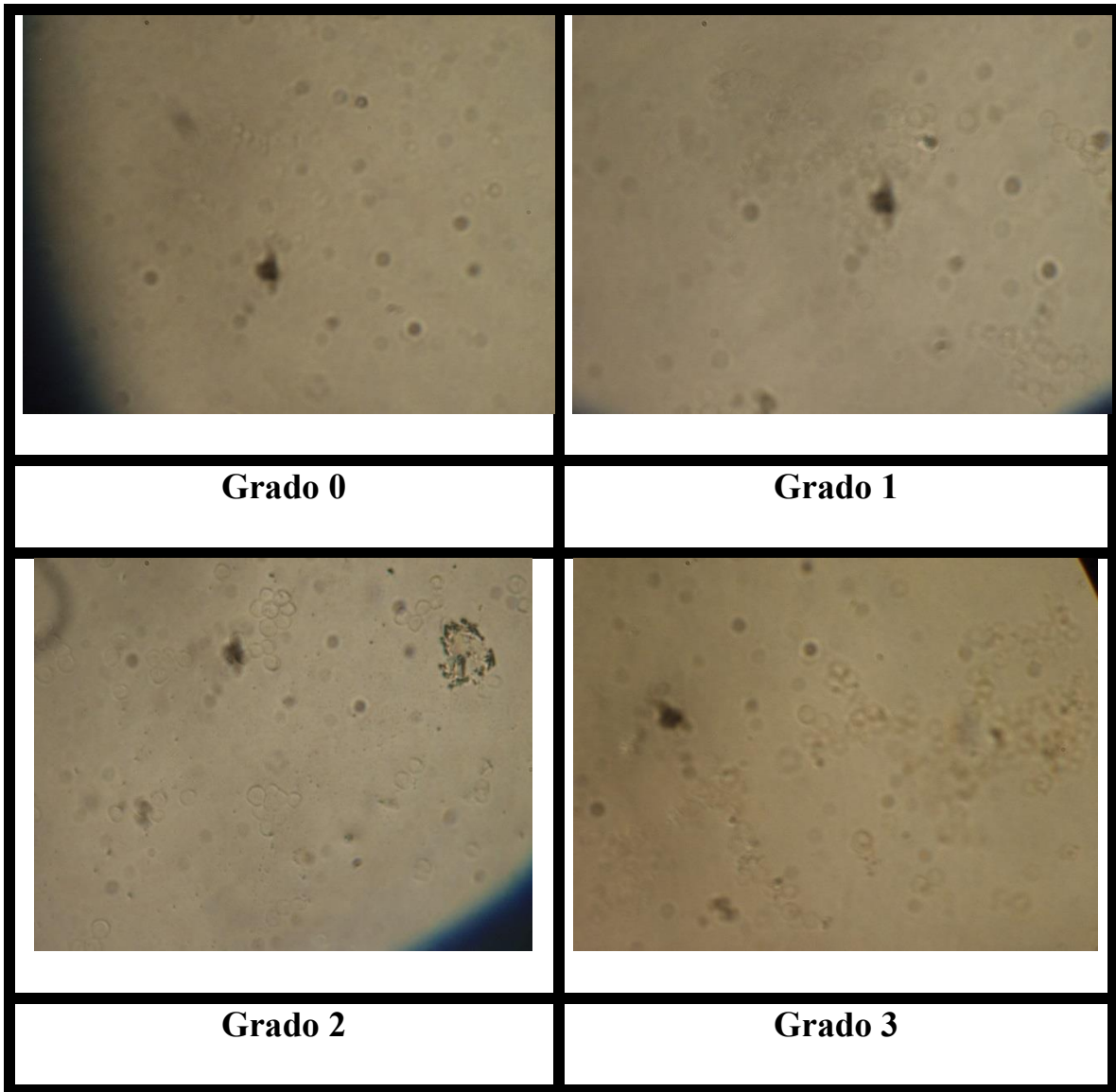


Figura 24. Ejemplo de grados de hemaglutinación observados con un aumento de 40X.

4 Actividad biológica

4.1 Seguimiento del proceso

Se observa en todos los grupos de ratones un aumento constante de peso, sin embargo, en aquellos grupos que funcionaron como controles de dosis se observa que éste resulta incluso más bajo que el de aquellos grupos que recibieron tratamiento a las dosis señaladas (Gráficos 3, 4 y 5).

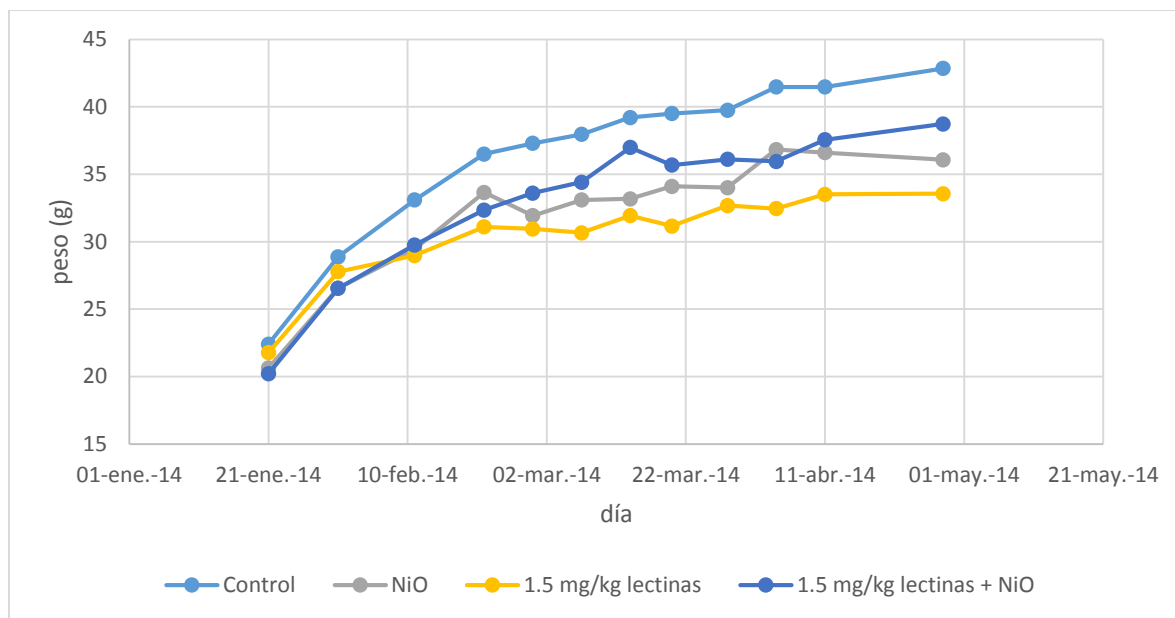


Gráfico 3. Peso corporal de ratones tratados con óxido de níquel (NiO), lectinas a una dosis de 1.5 mg/kg o la combinación de ambas, siendo sacrificados 3 meses posterior a la aplicación de NiO.

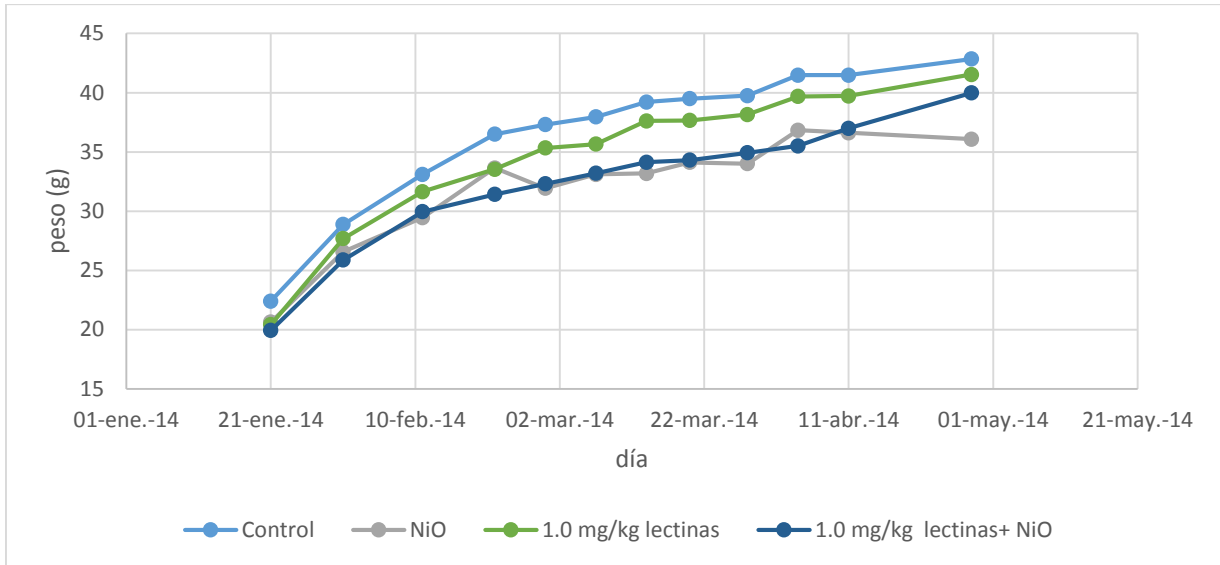


Gráfico 4. Peso corporal de ratones tratados con óxido de níquel (NiO), lectinas a una dosis de 1.0 mg/kg o la combinación de ambas, siendo sacrificados 3 meses posterior a la aplicación de NiO.

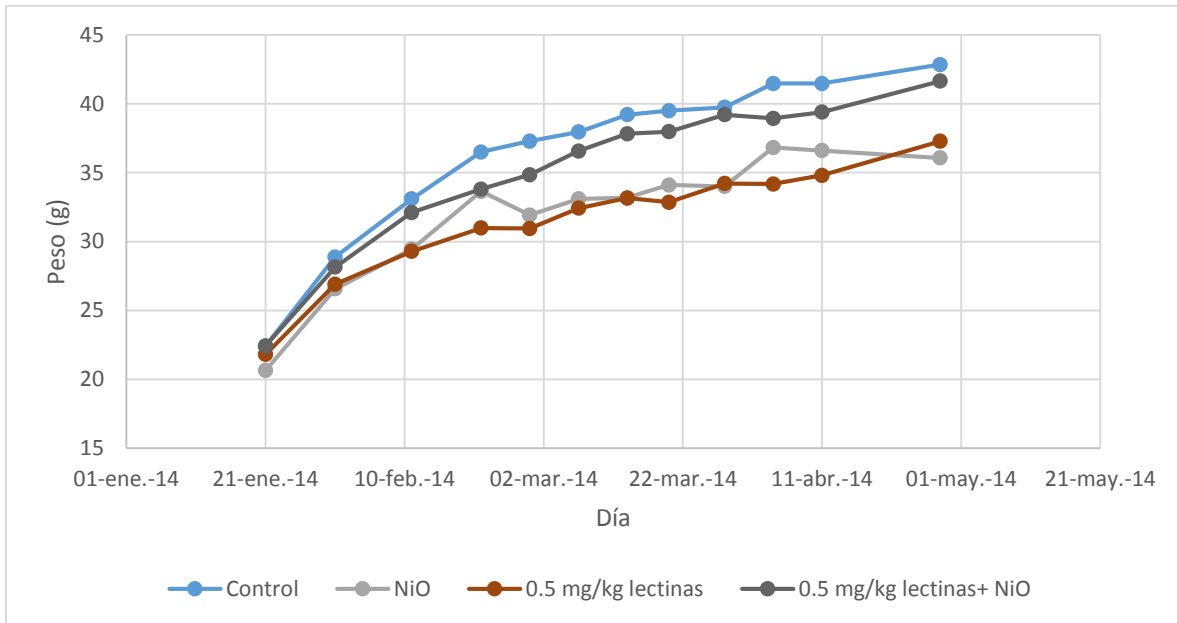


Gráfico 5. Peso corporal de ratones tratados con óxido de níquel (NiO), lectinas a una dosis de 0.5 mg/kg o la combinación de ambas, siendo sacrificados 3 meses posterior a la aplicación de NiO.

4.2 Actividad enzimática de catalasa en hígado y plasma

En plasma se obtiene una diferencia estadísticamente no significativa entre los grupos. (Gráfico 6).

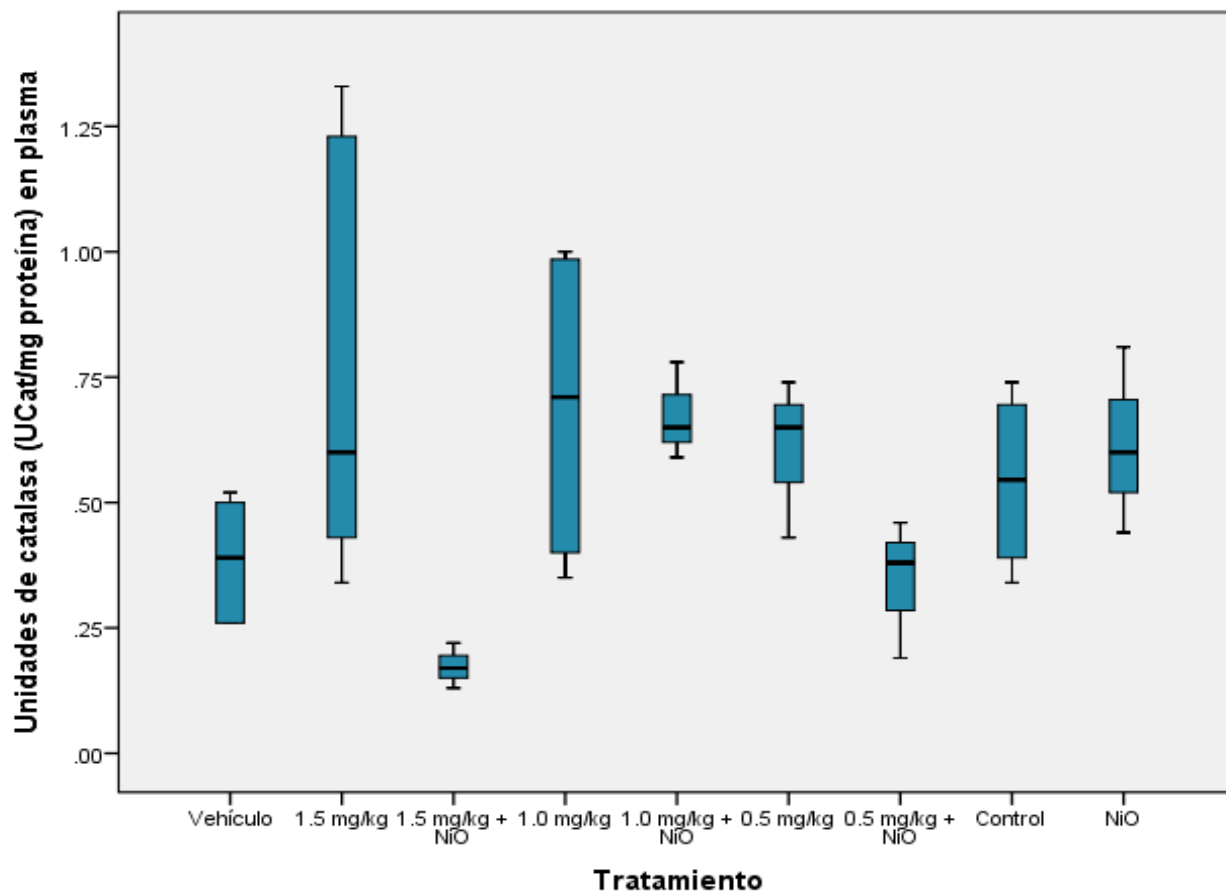


Gráfico 6. Actividad de Catalasa en plasma de ratones de la cepa CD-1. *P* con valor de 0.068, siendo $p > 0.05$.

En hígado de ratón, la actividad de catalasa es mayor en aquellos grupos tratados con lectinas después de haber sido administrados con NiO, que aquellos tratados únicamente con lectinas. Resulta significativa la diferencia entre los grupos de 1.0 mg/kg + NiO y 1.0 mg/kg (Gráfico 7).

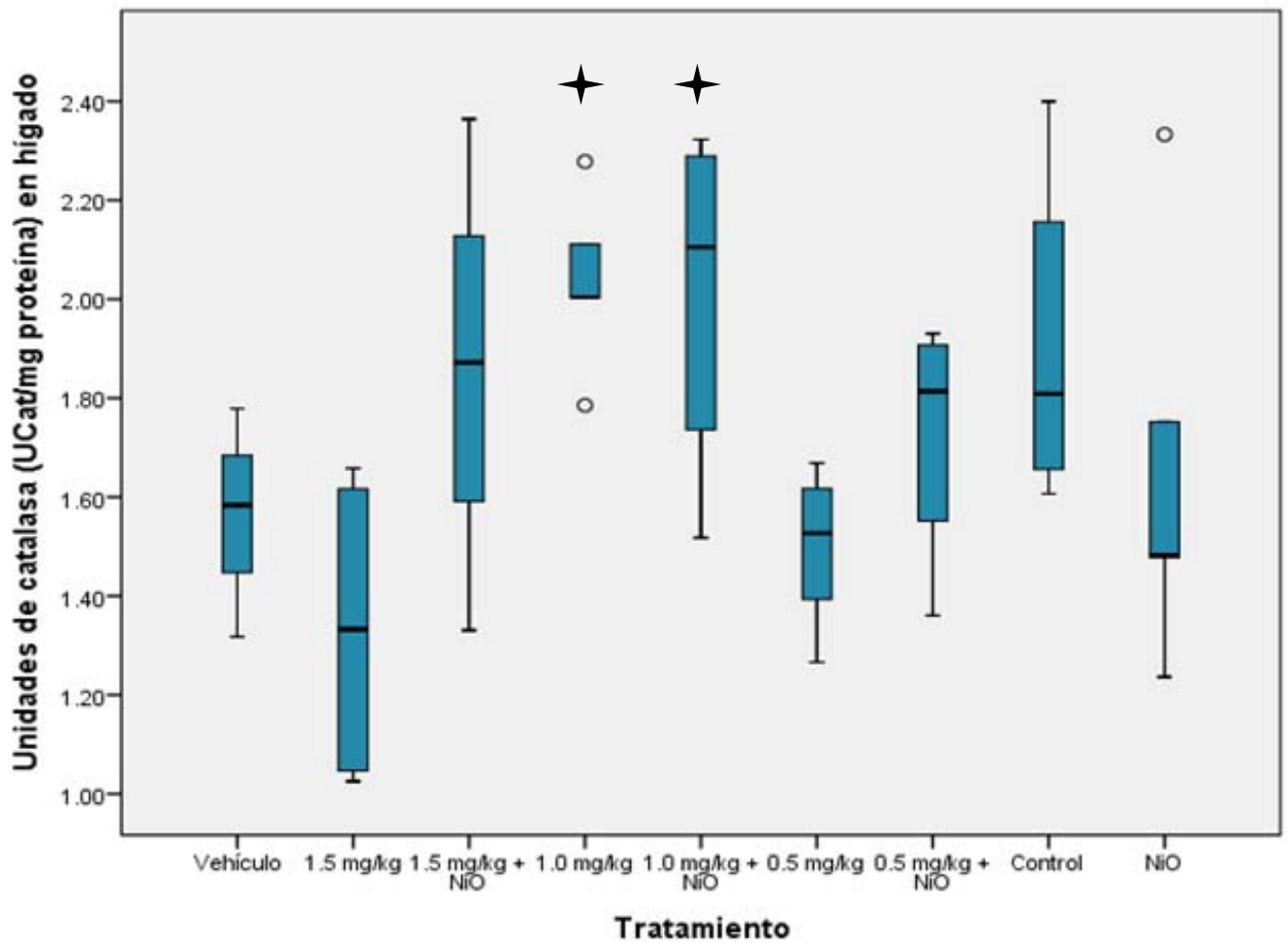


Gráfico 7. Actividad de Catalasa en hígado de ratones de la cepa CD-1. P con valor de 0.025, siendo $p < 0.05$.

4.3 Cuantificación de nitritos en hígado y plasma

La concentración de nitritos resultó ser estadísticamente no significativa. (Gráfico 8).

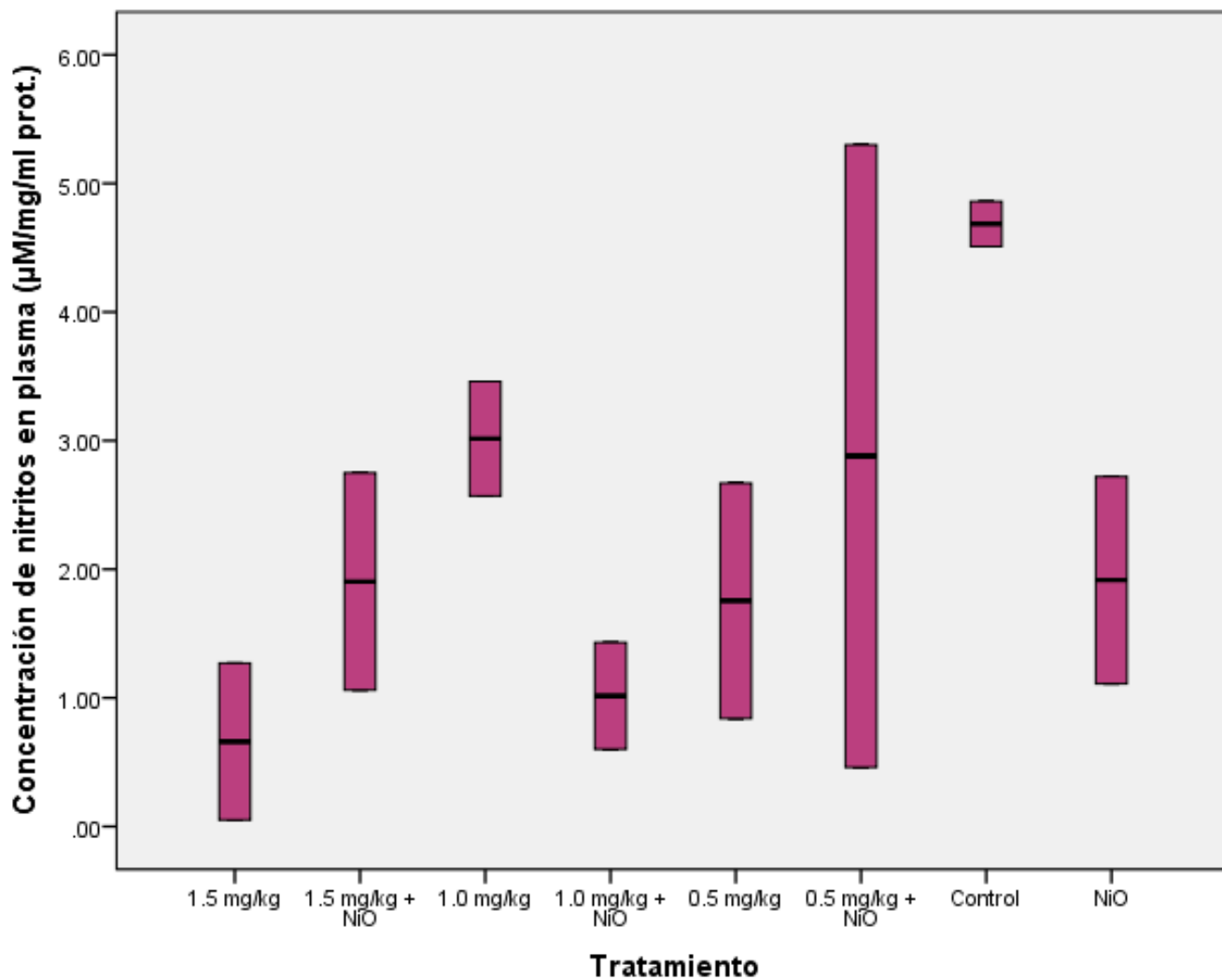


Gráfico 8. Concentración de nitritos en plasma de ratones de la cepa CD-1. P con valor de 0.102, siendo $p > 0.05$.

La concentración de nitritos en hígado de ratón es significativamente menor en el tratamiento de 1.0 mg/kg + NiO y significativamente mayor en la dosis de 1.0 mg/kg (Gráfico 9).

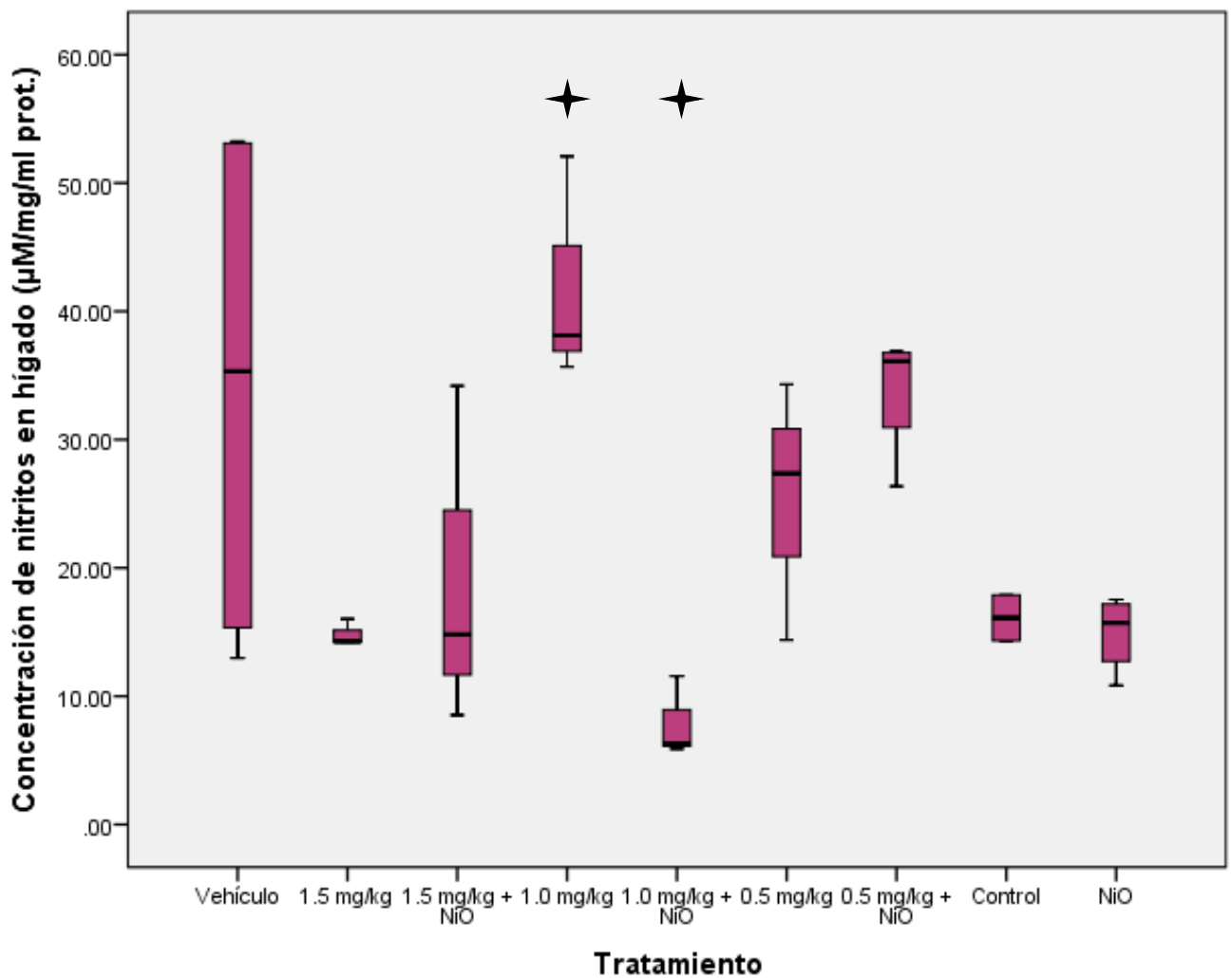


Gráfico 9. Concentración de nitritos en hígado de ratones de la cepa CD-1. P con valor de 0.009, siendo $p < 0.05$.

4.4 Cuantificación de peroxidación lipídica en hígado y plasma

Se observa que el tratamiento con lectinas en todas las dosis probadas disminuye la concentración de MDA respecto al control positivo. Por otro lado, las lectinas no muestran daño significativo a membrana lipídica por sí solas. Resulta significativa la diferencia que presenta la dosis de 1.0 mg/kg + NiO (Gráfico 10).

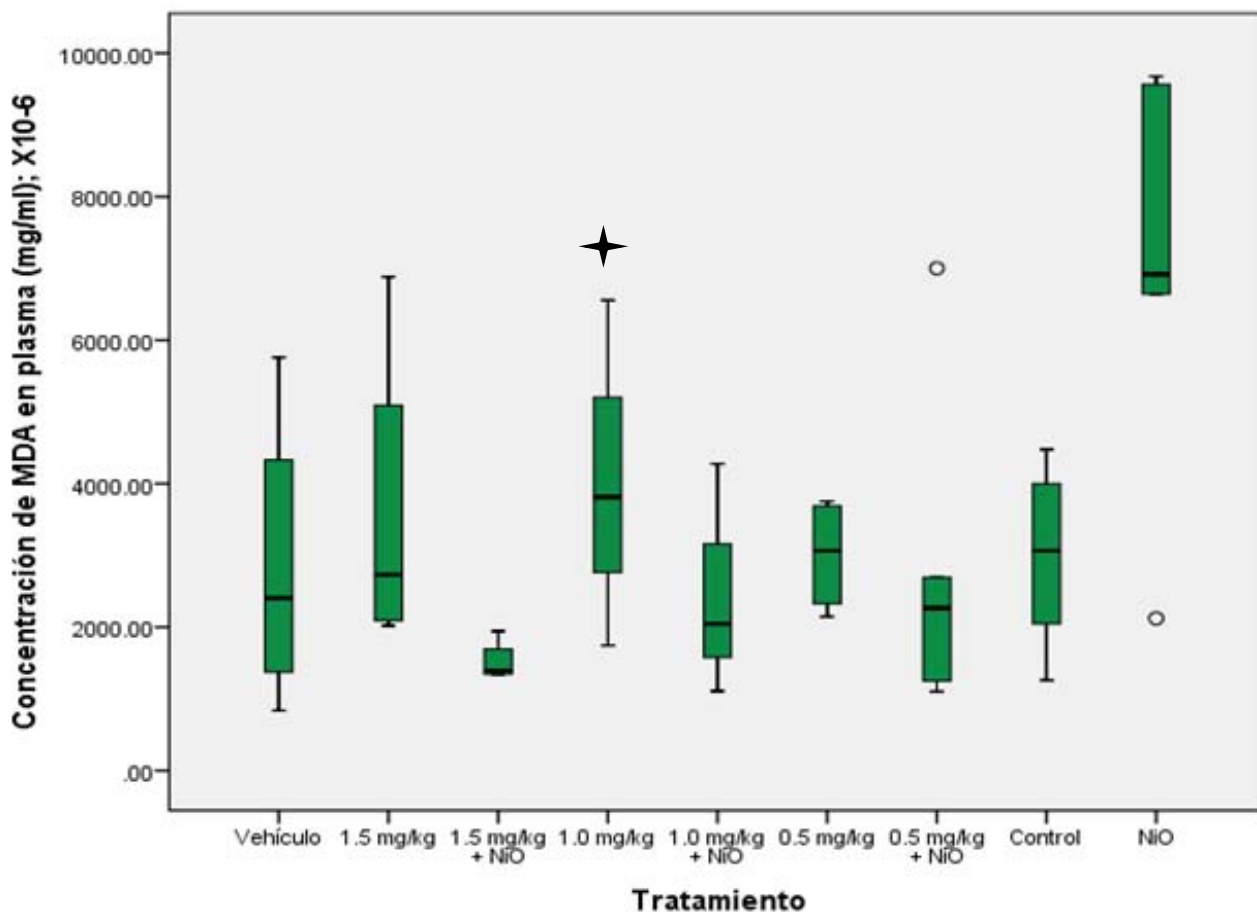


Gráfico 10. Concentración de MDA en plasma de ratones de la cepa CD-1. *P* con valor de 0.023, siendo $p < 0.05$.

Con respecto al control positivo (NiO), en hígado, se observa una disminución en la concentración de MDA estadísticamente significativa al tratarse con la dosis de lectinas de 1.5 mg/kg. Los tratamientos con lectinas a todas las dosis en ausencia de NiO no muestran daño a las membranas lipídicas (Gráfico 11).

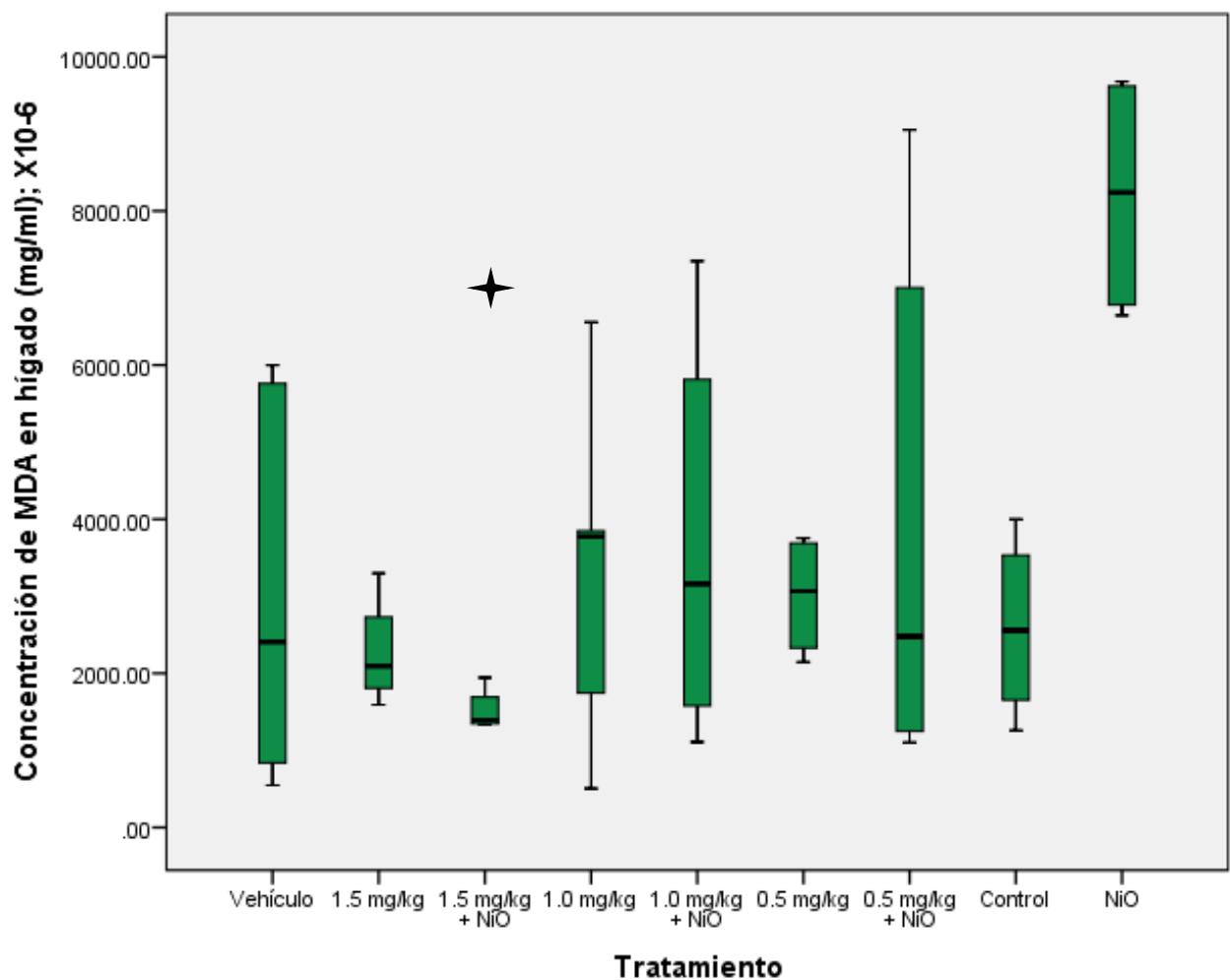


Gráfico 11. Concentración de MDA en hígado de ratones de la cepa CD-1. P con valor de 0.008, siendo $p < 0.05$.

Discusión

El rendimiento de proteínas tipo lectina fue de 9.29% respecto al extracto crudo, Hernández-Díaz *et al*, en 1999 reporta un porcentaje de lectinas de 2 a 10% respecto a proteínas totales, lo cual resulta alto, comparado con el porcentaje de proteínas obtenido al purificar Conavalina A, que es de 2.2% (Ganem-Báez y Martín González, 2000).

Es importante resaltar que se obtuvieron varias fracciones hemaglutinantes, lo cual puede reflejar que existe más de una lectina presente en tallo de *R. graveolens*, teniendo diferente comportamiento durante el ensayo funcional.

Se encontró una baja concentración de azúcares reductores respecto a la alta concentración de azúcares totales, lo cual puede señalar que la estructura de las lectinas no tiene azúcares reductores expuestos, o incluso, como un caso excepcional, podría no tenerlos como parte de su estructura (Goldstein *et al*, 1980).

Se observa hemaglutinación en los tres grupos sanguíneos para la fracción de glucosa, siendo más marcada en los grupos A+ y B+; por otro lado galactosa presenta actividad tanto en A+ como en el grupo O+; y sacarosa en los grupos B+ y O+ (Tabla 3).

Se debe resaltar a la glucosa como un azúcar muy importante a considerar, pues se encuentran ampliamente relacionada con la progresión tumoral como una molécula de alta demanda por parte de las células cancerosas debido a su elevado metabolismo, habiendo una sobreexpresión de moléculas transportadoras en este tipo de células, específicamente del grupo de sistemas facilitadores del transporte de glucosa (GLUT), las cuales son glicoproteínas transmembranales, y se encuentran sobreexpresadas en tumores, en cáncer de mama se encuentra de manera particular GLUT-12, y su producción se ve estimulada por el estradiol (Castrejón *et al*, 2007; Macheda *et al*, 2005; Morani *et al*, 2014).

También es necesario considerar la relevancia que tienen los diferentes azúcares en el reconocimiento de células cancerosas, pues entre otras características, suelen estar sobreexpresados o bien, al sintetizarse de forma inadecuada algunas moléculas de membrana quedan azúcares expuestos, como el caso de galactosa en la secuencia incompleta de mucina-1 (MUC1) (Rambaruth y Dwek, 2011).

Cabe resaltar que en concentraciones menores se presenta mayor actividad hemaglutinante en el grupo sanguíneo A+, aunque en el grupo sanguíneo B+ se presentan un mayor número de fracciones con actividad hemaglutinante (Figura 21 y 22).

Se pudo observar que la concentración mínima a la cual se dio hemaglutinación fue a 30 µg/mL, lo cual resulta elevado respecto al valor de concentración mínima aglutinante para lectinas de *Caesalpinia spinosa* en el sistema ABO, siendo de 7.73 µg/mL para el grupo sanguíneo A+ y O+ (Mendoza *et al*, 2007), o 1.3 µg/mL para los grupos A+ y B+ (Mendoza-Blanco *et al*, 2012), lo cual permite suponer que, si bien, existen proteínas de tipo lectina en este extracto, es necesario llevar a cabo métodos de purificación más eficaces.

De manera general se observó que la actividad hemaglutinante se mantiene hasta 100 °C para la fracción de glucosa, manitol y fructosa en los tipos A+ y O+; y para la fracción de sacarosa persiste su actividad hemaglutinante hasta los 80 °C. No se observó actividad hemaglutinante para el grupo sanguíneo B+ cuando las fracciones se sometieron a temperaturas diferentes a la ambiente., con excepción de la fracción de manitol, la cual mantiene su actividad biológica hasta los 60 °C (Figura 14-17). Para *Pisum sativum* L se reporta actividad hemaglutinante entre 40 y 60 °C, perdiéndose al aumentar la temperatura más allá de este límite (Kabir *et al*, 2013).

Respecto al efecto del cambio de pH sobre la actividad biológica de las fracciones obtenidas, observamos que la actividad hemaglutinante se perdió en todas las fracciones en pH de 5 y 11, resultando relativamente estable a pH 8 (Figura 20), sin llegar a la actividad hemaglutinante original, lo cual concuerda con lo reportado para la lectina de *Pisum sativum* L., la cual se señala que mantiene actividad en un rango de pH de 6 a 10, señalando pérdida de actividad total a pH 3, y a pH 11, con una drástica reducción en el margen de pH de 4 y 5 (Kabir *et al*, 2013). Esto puede significar que el margen al cual pueden funcionar adecuadamente las proteínas es a pH cercanos a la neutralidad.

En lo que respecta al seguimiento dado a los sujetos de estudio, durante el periodo de tratamiento, Se observó que los ratones tratados con la dosis de 1.5 mg/kg de lectinas presentan menor peso, lo cual puede ser causado por el efecto antinutricio que se ha reportado respecto a las lectinas (Duranti y Gius, 1997, Vasconcelos y Olivieira, 2004, Gonzalez-de Mejía y Prisecaru, 2005), y se sabe que las lectinas son capaces de resistir el paso por el tracto

digestivo aun estando desnaturalizadas (Lajolo y Genovese, 2002). Por otro lado, se observa que las dosis de 0.5 mg/kg y 1.0 mg/kg no tienen efecto en la variación de peso respecto al grupo control.

La actividad de catalasa en plasma no resulta estadísticamente significativa. Por otro lado, el comportamiento en hígado es diferente, reestableciéndose valores similares al grupo control en la dosis de 1.0 mg/kg + NiO. Resaltando la disminución en la actividad enzimática de catalasa para la dosis de 1.5 mg/kg de lectina. Esto puede asociarse a un efecto pro oxidante de las lectinas a dosis elevadas (Carrasco-Castilla *et al*, 2012).

En plasma la concentración de nitritos no resultó estadísticamente significativa. En hígado, se observa de manera general que el comportamiento de la dosis de 1.0 mg/kg tiende a ser diferente en un sistema sano de uno comprometido; ya que en el primero se incrementa la concentración, mientras en el segundo disminuye, lo cual refleja que las lectinas en un sistema sano tienden a actuar como prooxidantes, mientras en un sistema comprometido pueden disminuir la concentración de nitritos en el sistema.

La producción de nitritos se relaciona directamente con la concentración de óxido nítrico producido por NOS, especialmente iNOS (Óxido Nítrico Sintasa inducible), la cual se relaciona con el estrés oxidativo (Lechner *et al*, 2005) y el proceso de carcinogénesis, como una molécula que promueve la carcinogénesis y la angiogénesis (Floriano-Sánchez *et al*, 2009). Esta molécula, al ser un radical libre; resulta muy inestable, sin embargo, como parte de su proceso de estabilización, se une a moléculas de oxígeno, formando nitratos y nitritos (Benavides-Trujillo y Pinzón-Tovar, 2008), siendo éstos mucho más estables que el óxido nítrico, por lo tanto, al verse reducidos los niveles de nitritos, se puede inferir que la producción de óxido nítrico también se ha reducido, lo cual es un reflejo de la disminución en la producción de radicales libres, y el proceso carcinogénico sea regulado de manera más eficiente.

Se presentó en plasma una reducción en la concentración de MDA en todos los tratamientos, siendo significativo en la dosis de 1.0 mg/kg + NiO. En hígado se reestablecen los valores normales de MDA en la dosis de 1.5 mg/kg +NiO, sin presentarse daño a nivel de membrana al aplicarse lectinas por si solas. Este comportamiento es similar al reportado en otros trabajos donde se evalúa estrés oxidativo por medio de la concentración de MDA (Alvarado-Fravua *et al*, 2005, Favari *et al*, 2014), en cuanto a la relación proporcional que sigue el estrés

oxidativo con la concentración de MDA, además, se ha relacionado el aumento en la concentración de MDA en hígado al administrar óxido de níquel en hígado de ratón (Das *et al*, 2008). Estos resultados reflejan el daño oxidativo que afecta, entre otras moléculas, a aquellos lípidos que conforman a la membrana plasmática (Chihuilaf *et al*, 2002); así como la disminución en las concentraciones de MDA al someterse a los tratamientos anteriormente señalados, se puede interpretar que el efecto protector de los diferentes tratamientos de proteínas tipo lectina fue eficaz en cuanto a su actividad antioxidante a dosis muy específicas y en condiciones tales que la célula tuviera un proceso de estrés oxidativo.

Conclusiones

- Se presentó un rendimiento final de 9.29%, lo cual concuerda con el margen de porcentaje para lectinas vegetales, que es del 2 al 10% del total proteico.
- Todas las fracciones presentaron actividad hemaglutinante en diferentes grupos sanguíneos del sistema ABO.
- Las fracciones de Galactosa, Sorbitol, Sacarosa y Glucosa presentaron actividad hemaglutinante en los tres grupos sanguíneos.
- Las fracciones de Glucosa y Sacarosa fueron aquellas que presentaron una mejor actividad hemaglutinante.
- Se reporta ausencia de azúcares reductores en las diferentes fracciones evaluadas, pudiendo esto significar ausencia de éstos o bien, que no se encuentran expuestos dentro de la estructura de la lectina.
- La concentración mínima de proteínas para generar respuesta hemaglutinante fue de 30 µg/mL.
- Se encontró actividad hemaglutinante para proteínas incubadas a pH 8, perdiéndose ésta a pH 5 y 11.
- La temperatura a la cual se perdió la actividad hemaglutinante de las diferentes fracciones osciló entre 40 y 60 °C, llegando en algunos casos a mantener actividad a 100 °C.
- El peso de los ratones tratados con lectinas fue menor al del control, pudiendo inferirse posible efecto antinutricio por parte de las lectinas.
- La fracción de glucosa de lectinas de tallo de *Ruta graveolens* L. presenta actividad antioxidante reflejado por medio de actividad enzimática de catalasa y concentración de malondialdehído y nitritos.
- Se considera no viable la aplicación del tratamiento preventivo empleando estas lectinas, dado el incremento en las pruebas de actividad enzimática de catalasa, cuantificación de nitritos y malondialdehído dado el efecto desfavorable que tiene.
- Se estima que la dosis ideal de lectinas de tallo de *R. graveolens* para generar una respuesta antioxidante en ratones hembra de la cepa CD-1 se encuentra en el rango de 0.5 a 1 mg/kg.
- La actividad prooxidante de estas lectinas se encuentra en dosis de 1.5 mg/kg.

Referencias

1. Adarmes, H., Solís, J.P., Müller, A., y Galleguillos, M. 2009. “Determinación de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en el líquido sinovial de articulación metacarpofalángica equina.” *Archivos de Medicina Veterinaria* 41 (3): 255-259.
2. Aebi, H. 1984. “Catalase in Vitro.” *Methods in enzymology* 105: 121-126.
3. Alison, M.R. 2001. Cancer in *Encyclopedia of life sciences* (U.K: Nature Publishing Group, 2001): 1-8.
4. Alvarado-Fradua, C., Álvarez-Cifuentes, P., Guayerbas-Valero, N., Puerto-Cantero, M., Jiménez, L., y de la Fuente Del Rey, M. 2005. “El daño peroxidativo en leucocitos peritoneales de ratones viejos disminuye si se suplementa la dieta con galletas enriquecidas con antioxidantes. Relación con la supervivencia.” *Revista Española de Geriátria y Gerontología*, 40 (6): 351,356.
5. Arce, C., Bargalló, E., Villaseñor, Y., Gamboa, C., Lara, F., Pérez-Sánchez, V., y Villarreal, P. 2011. “Oncoguía cáncer de mama.”, *Cancerología* 6: 77-86.
6. “American cancer society”. Consultado marzo de 2015.
<http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-tratamiento-por-etapa>.
7. Angarita, F.A., y Acuña S.A. 2008. “Cáncer de seno: de la epidemiología al tratamiento.” *Universidad médica de Bogotá (Colombia)*, 49 (3): 344- 372.
8. Universidad Nacional Autónoma de México. “biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana.” Consultado Enero de 2015.
http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Ruta_graveolens&id=7464.
9. Benavides-Trujillo, M.C., y Pinzón-Tovar, A. 2008. “Óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas.” *Revista Colombiana de Anestesiología*, 36 (1): 45-52.
10. Biblioceop. 2011. “Glándula mamaria.” *Escuela de Obstetricia y puericultura, Universidad Austral de Chile* 2 (15): 1-5.
11. Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., y Kalayci, O. 2012. “Oxidative stress and antioxidant defense” *World Allergy Organization journal* 5(1): 9-19.
12. Bouche, G. 2013. “Cáncer de mama: una guía para pacientes.” *European Society for Medical Oncology* 1: 1-44.

13. Buege, J.A., y Aust, S.D. 1978. "Microsomal Lipid Peroxidation." *methods in enzymology* 52: 302-310.
14. Burden, D.W., y Whitney, D.B. 1995. *Biotechnology: Protein to PCR*. USA: Birkhäuser.
15. Cameron, K.S., Buchner, V., y Tchounwou, P.B. 2011. "Exploring the Molecular Mechanisms of Nickel-Induced Genotoxicity and Carcinogenicity: A Literature Review." *Reviews on environmental health* 26 (2):81-92.
16. Carrasco-Castilla, J., Hernández-Álvarez, A.J., Jiménez-Martínez, C., Jacinto-Hernández, C., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Vioque, J., y Dávila-Ortiz, G. 2011. "Antioxidant and metal chelating activities of Phaseolus vulgaris L. var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates." *Food Chemistry* 131 (4) :1157-1164.
17. Castillo-Villanueva, A., y Abdullaev, F. 2005. "Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer." *Revista de Investigación Clínica* 57 (1): 55-64.
18. Castrejón, V., Carbó, R., y Martínez, M. 2007. "Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa." *Revista de Educación Bioquímica* 26 (2): 49- 57.
19. Céspedes-Miranda, E.M., Hernández-Lantigua, I., y Llopiz-Janer, N. 1996. "Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa." *Revista Cubana de Investigación Biomédica* 15 (2).
20. Chihuailaf, R.H., Contreras, P.A., y Wittwer, F.G. 2002. "Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal." *Veterinaria México* 33(1): 265-283.
21. Coronato, S., Laguens, G.E., Spinelli, O.M., y Di-Girolamo, W. 2002. "Marcadores tumorales en cáncer de mama", *Medicina* 62: 73-82.
22. Das, K.K., Das, S.N., y Dhundasi, S.A. 2008. "Nickel, it's adverse health effects and oxidative stress." *Indian Journal of medical research* 128 (4): 412- 425.
23. Dasgupta, N., y De, B. 2004. "Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract in vitro." *Food chemistry* 88 (2): 219-224.
24. Deyrup-Olsen, I. 1994. The Use of Lectins (Agglutinins) to Study Cell Surfaces. En lectins and cell surfaces: *Association for biology laboratory education*.
25. Díaz-Miguel, V., Gago-Gago, I., y Escribano-Tortola, J.J. "Anatomía y funcionalidad de la mama." en *Ginecología y atención primaria* ed. Escribano-Tortola, J.J. (España: Bayer. 2015), 21-26.

26. -Dirección General de Salud Reproductiva. 2002. Compendio de Patología mamaria: *Secretaría de Salud*.
27. Duranti, M., y Gius, C. 1997. "Legume seeds: protein content and nutritional value." *Field Crops Research*, 53 (1-3): 31-45.
28. Elejalde-Guerra, J.I. 2001. "Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes." *anales de medicina interna* 18(6): 326-335.
29. Favari, L., Arce-Díaz, C., Ortíz-Martínez, J., Pablo-Pérez, S., Soto, C., y Meléndez-Camargo, M.E. 2013. "Efectos hepatoprotector y antioxidante de *Taraxacum officinale* en el daño hepático agudo inducido por el tetracloruro de carbono en la rata." *Revista mexicana de ciencias farmaceuticas* 44(4): 53-61.
30. Floriano-Sánchez, E., Castro-Marín, M., y Cárdenas-Rodríguez, N. 2009. "Marcadores moleculares relacionados con cáncer de próstata: 3-nitrotirosina y expresión génica y protéica de la Mn-Superóxido dismutasa (Mn-SOD)." *Archivos españoles de Urología* 62 (9): 702-711.
31. Frassinetti, S., Gabriele, M., Caltavuturo, L., Longo, V., y Pucci, L. 2015. "Antimutagenic and Antioxidant Activity of a Selected Lectin-free Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Two Cell-based Models." *Plant foods for Human nutrition* 70 (1): 35-41.
32. Gallegos-Velasco, I.B., Coutiño, R., Martínez, G., y Hernandez-Cruz, P. 2008. "Marcadores glicosilados en cáncer de mama." *Revista de Educación Bioquímica* 27 (2): 52-59.
33. Ganem-Báez, F.A., y Martín-González, O. 2000. "Lectina concanavalina A: obtención y purificación." *Universo diagnóstico* 1(1): 24-28.
34. García-Triana, B. E., Sardaña-Bernabeu, A., y Sardaña-García, L. 2012. "El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer." *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 12(2): 187-196.
35. Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Toshiaki, O., y Sharon, N. 1980. "What should be called a lectin?." *Nature* 285 (66)
36. González-de Mejía, E., y Prusecaru, V.I. 2005. "Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45 (6): 425-445.

37. Hanahan, D. y Weinberg, R.A. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next generation." *Cell* 144 (5): 646 -674.
38. Hernández-Cruz, P., Perez-Campos, E., Martínez-Martínez, L., Ortiz, B., y Martínez, G. 2005. "Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato." *Revista de Educación Bioquímica* 24 (1): 21-27.
39. Hernández-Díaz, P. Martín-González, O., Rodríguez de Pablos-Vélez, Y., y Ganem-Báez, F.A. 1999. "Aplicaciones de las lectinas." *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 15(2): 91-95.
40. INEGI .2013. Estadísticas a propósito del día internacional contra el cáncer de mama. México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía Aguascalientes.
41. INEGI .2014. Estadísticas a propósito del día internacional contra el cáncer de mama. México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía Aguascalientes.
42. Kabir, S.R., Nabia, M., Haqueb, A., Zamanc, R.U., Mahmudc, Z.H., y Rezada, A. 2013. "Pea lectin inhibits growth of Ehrlich ascites carcinoma cells by inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest in vivo in mice." *Phytomedicine* 20 (14):1288-1296.
43. Lagarto-Parra, A., Silva-Yhebra, R., Guerra-Sardiñas, I., e Iglesias-Buela, L. 2001. "Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts." *Phytomedicine* 8(5): 395-400.
44. Lajolo, F.M., y Genovese, M.I. 2002. "Nutritional Significance of Lectins and Enzyme Inhibitors from Legumes." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (22): 6592-6598.
45. Lam, S.K., and Ng, T.B. 2010. "Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield." *Phytomedicine*. 17(6): 457-462.
46. Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L., y Fernández-Mejía, C. "Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions," En *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants* Ed. Morales-Gonzalez J.A. (Ciudad: InTech, 2013), p. 209-232.

47. Lechner, M., Lirk, P., y Rieder, J. 2005. "Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin." *Seminars in Cancer Biology* 15 (4): 277-289.
48. Lis, H., y Sharon, N. 1998. "Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition." *Chemical reviews* 98(2): 637-674.
49. "Análisis de carbohidratos, Tecnicatura Superior en Alimentos, *escuela MEH*" López-Córdoba, A.F. Consultada en Mayo de 2014.
<https://analisisinstrumentalmeh.files.wordpress.com/2011/04/analisis-de-carbohidratos.pdf>.
50. "Análisis de alimentos, fundamentos y técnicas" Lugter, 2010. Consultado en mayo de 2014.
<http://es.scribd.com/doc/42854211/ManualdeFundamentosyTecnicasdeAnalisisdeAlimentos-6501#scribd>.
51. Macheda, M.L., Rogers, S., y Best, J.D. 2005. "Molecular and Cellular Regulation of GlucoseTransporter (GLUT) Proteins in Cancer." *Journal of Cellular Physiology* 202 (3): 654-662.
52. Mayor-Oxila, R. 2010. "Estrés oxidativo y Sistema de defensa antioxidante." *Revista del Instituto de Medicina Tropical* 5(2): 23- 29.
53. Mejía-Giraldo, L.F., Martínez-Correa, H.A., Betancourt-Gutiérrez, J.E., y Castrillón-Castaño, C.E. 2007. "Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica* L.) en la obtención de azúcares fermentables." *Ingeniería y ciencia* 3 (6): 41-62.
54. Mendoza-Blanco, W., Ponce-Soto, L., y Maragnoni, S. 2012. "Purification and primary structure of a lectin from *Buddleja coriacea* seeds" *Sciéndo* 15(1):81-88.
55. Mendoza, W., Gandolfo, L., Ponce, L., Novello, J., y Marangoni S. 2007. "Estudios estructura y función de una lectina aislada de semillas de *Caesalpinia spinosa* Kuntze (Tara)." *IDESIA*, 25 (2): 49-58.
56. Miranda, K.M., Espey, M.G., y Wink, D.A. 2001. "A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite, Nitric oxide." *Biology and Chemistry* 5 (1): 62–71.
57. Morani, F., Phadngam, S., Follo, C., Titone, R., Aimaretti, G., Galetto, A., Alabiso, O., e Isidoro, C. 2014. "PTEN regulates plasma membrane expression of glucose transporter

1 and glucose uptake in thyroid cancer cells.” *Journal of Molecular Endocrinology* 53 (2): 247-258.

58. Necib, Y., Bahi, A., Merouane, F., Bouadi, H., and Boulahrouf, K. 2015. “Comparative study of a new lectin extracted from roots of plants: *Cyperus rotundus*, *Pistacia lentiscus* and *Ruta graveolens*.” *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4 (1): 1720-1733.

59. “Cáncer, nota descriptiva.” OMS. Consultado en Marzo de 2015.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

60. Ortiz-Diaz, A.R., Castillo-Méndez. R., y Beausoleil-Delgado, I. 1995. “Carcinogénesis por óxido de Níquel en dos líneas de ratones cosanguíneas.” *Revista cubana de oncología* 11(1).

61. Ozsoy, N., Candoken, E., y Akev, N. 2012. “Purification and antioxidant activity of Aloe vera leaf lectin.” *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul* 42(1):1-11.

62. Preethi, K.C., Kuttan, G., y Kuttan, R. 2006. “Anti-tumour effect of *Ruta graveolens* L. extract.” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 7 (3): 439-443.

63. “Química analítica instrumental II Técnicas cromatográficas.” *Universidad Nacional Autónoma de México* consultada en marzo de 2014.

http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf

64. Raghav, S.K., Gupta, B., Agrawal, C., Goswami, K., y Das H.R. 2006. “Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells.” *Journal of Ethnopharmacology* 104: 234–239.

65. Rambaruth, N.D.S., y Dwek, M.V. 2011. “Cell surface glycan-lectin interactions in tumor metastasis.” *acta histochemica* 113 (6): 591-600.

66. Ratheesh, M., Shyni, G.L., Sindhu, G., y Helen, A. 2011. “Inhibitory effect of *Ruta graveolens* L. on oxidative damage, inflammation and aortic pathology in hypercholesteromic rats.” *Experimental and Toxicologic Pathology* 63 (3): 285-290.

67. Ríos, J.L. “Apoptotic activities of mediterranean plant species.” En *The Mediterranean diet* ed. Preedy, V., y Watson, R.R. (Países Bajos: Elsevier , 2015), 65-72.

68. Rodríguez, M.V., Riquelme, B., Valverde, J., y Gattuso, S. 2004. “Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las fabáceas sobre los eritrocitos humanos mediante el análisis de imágenes.” *Anales de la Asociación Física Argentina* 16:247-248.

69. Saha, R.K., Tuhin, S.H.M., Jahan, N., Roy, A., y Roy, P. 2014. "Antibacterial and Antioxidant Activities of a Food Lectin Isolated from the Seeds of Lablab purpureous" *American Journal of Ethnomedicine* 1(1):8-17.
70. Sánchez-Ferrer, A. "Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático." (Tesis doctoral, Universidad autónoma de Barcelona, Programa de doctorado Biotecnología, 1998). p. 13.
71. Silva, M.C.C., de Paula, C.A.A., Ferreira, J.G., Paredes-Gamero, E.J., Vaz, A.M., Sampaio, M.U., Correia, M.T., y Oliva, M.L. 2014. "Bauhinia forficata lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells." *Biochimica et Biophysica Acta* 1840 (7): 2262-2271
72. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2013. México: numeralia de cáncer de mama. México: Boletín epidemiológico.
73. Sun, J., Zhang, X., Broderick, M., y Fein, H.2003. "Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay." *Sensors*, 3 (8): 276-284.
74. Vasconcelos, I.M., y Oliveira, J.T.A. 2004. "Antinutritional properties of plant lectins." *Toxicon* 44 (4): 385-403.
75. Venereo-Gutierrez, J.R. 2002. "Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes." *Revista de Medicina Cubana Militar* 31(2): 126-133.
76. Voel, D., y Voet, J.G. *Bioquímica* (Uruguay: Editorial Médica Panamericana, 2006), páginas. 2006, , 267, 273, 274.
77. Yoon, T.J., Yoom Y.C., Kang, T.B., Song, S.K., Lee, K.B., Her, E., Song, K.S., and Kim, J.B. 2003. "Antitumor activity of the Korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells." *Archives of Pharmacal Research*. 26 (10): 861-867.

Anexo de publicación

Invitación a publicar

Dear Machuca Rodríguez C,

This is Journal of Life Sciences (ISSN 1934-7391), a professional journal published across the United States by David Publishing Company, 1840 Industrial Drive, Suite 160, Libertyville, IL 60048, USA.

Recently, we found one of your papers, titled "OXIDATIVE STRESS EVALUATION IN CANCER-INDUCED MICE TREATED WITH RUTA GRAVEOLENS L. LECTINS" in The V MEETING OF THE FREE RADICALS AND OXIDATIVE STRESS BRANCH OF THE MEXICAN BIOCHEMICAL SOCIETY, 2015. We found it may help us achieve our goals in this research field. This would make a really positive contribution to our work. The abstract makes your paper sound very interesting.

We are very interested in your research fields and would like to publish the full text of your unpublished paper in our journal. If you have the idea of making our journal a vehicle for your research interests, please send the electronic version of your papers or books to us in MS word format via email attachment. [...]

Best Regards,

Beata

Editorial Office

Journal of Life Sciences

David Publishing Company

Aceptación de artículo

Paper Acceptance Notice of **JLS15092412** from Journal of Life Sciences

Dear Amairany Torres-Alvarez, Ernesto Mendoza-Vallejo and Catalina Machuca-Rodríguez,

We are pleased to inform you that your paper titled “Oxidative stress evaluation in cancer-induced mice treated with *Ruta graveolens* L. stem lectins” submitted for consideration for Journal of Life Sciences, has been processed utilizing a two person referee process and upon their recommendation your paper has been accepted for publication. [...]

Please contact us as soon as possible so as to let us arrange the following work.

Looking forward to hearing from you soon!

Best Regards,

Sincerely,

Amy Gleit

Journal of Life Sciences (ISSN 1934-7391), USA

David Publishing Company, <http://www.davidpublisher.org>

Address: 1840 Industrial Drive, Suite 160, Libertyville, IL 60048, USA.