



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**IDENTIFICACIÓN DE LECTINAS DE *Ruta graveolens* CON ACTIVIDAD  
CITOTOXICA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA MCF-7**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**FLORES GARCÍA LAURA CECILIA**

TUTOR PRINCIPAL: DR. FRANCISCO MARTÍNEZ FLORES  
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN  
COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM  
DR. JOSÉ SULLIVAN LOPÉZ GONZÁLEZ  
INSTITUTO DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS

**MÉXICO, D.F. ENERO, 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**BIOMEDICINA**

**IDENTIFICACIÓN DE LECTINAS DE *Ruta graveolens* CON ACTIVIDAD**

**CITOTOXICA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA MCF-7**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**FLORES GARCÍA LAURA CECILIA**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. FRANCISCO MARTÍNEZ FLORES**

**INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN**

**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM**

**DR. JOSÉ SULLIVAN LOPÉZ GONZÁLEZ**

**INSTITUTO DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS**

**MÉXICO, D.F. ENERO, 2016**

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 19 de octubre de 2015, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **FLORES GARCÍA LAURA CECILIA** con número de cuenta **304053746**, con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE LECTINAS DE *Ruta graveolens* CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA MCF-7"**, realizada bajo la dirección del **DR. FRANCISCO MARTÍNEZ FLORES**:

Presidente: DRA. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ  
Vocal: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA  
Secretario: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ  
Suplente: DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO  
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de diciembre de 2015



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al CONACYT por la beca otorgado para realizar los estudios de Maestría en Ciencias Biológicas.

Esta tesis deriva de los proyectos científicos financiados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Instituto Nacional de Rehabilitación a través del proyecto:

**“CONACYT-FOSISS-2011-1-161624”**

Agradeciendo al comité tutorial, integrado por el Dr. Francisco Martínez Flores, el Dr. Alejandro Zentella Dehesa y el Dr. José Sullivan López González, por el tiempo y asesoría aportadas para el desarrollo de esta tesis, muchas gracias.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mis padres, por apoyarme incondicionalmente en el camino que he elegido. Porque a pesar de los desacuerdos, siempre han estado conmigo y gracias a ustedes soy la persona que soy.

Agradezco a la maestra Catalina por darme hace tantos años, la oportunidad de formar parte de este proyecto, por darme su tiempo y compartir sus conocimientos para desarrollarme como investigadora. Y sobre todo por brindarme su confianza y dar tantos y tantos consejos que me hicieron crecer como persona.

Muchas gracias al Dr. Martínez por haber fungido como mi tutor, por permitirme trabajar en su laboratorio y darme de su valioso tiempo para concluir con esta tesis.

Gracias profesor Ernesto por tantas palabras de aliento en mis momentos de debilidad.

Poco tiempo, pero agradecida con el personal del Banco de Piel y Tejidos del INR por su asesoría y sus palabras.

Por último, doy gracias a la vida por darme las cosas que merezco, ponerme pruebas que puedo superar y darme la capacidad de comprender que hay cosas que no queremos que sucedan pero que hay que aceptar, cosas que no queremos saber pero que hay que aprender y personas sin las que no podemos vivir pero que es mejor dejarlas ir.

## *Dedicatoria*

Esta tesis está dedicada a mi familia, a la maestra Catalina y a cada una de las personas que han contribuido en mi vida. Gracias por su apoyo.

Para mi mamá, por ser la mamá que necesito y estar siempre conmigo a pesar de todo, tratando de hacer de mí una buena persona. Simplemente por ser mi mamá y darme tu amor incondicionalmente y apoyarme en cada una de mis locuras.

A mi papá por apoyarme, dándome las herramientas para ser una persona independiente y aunque antes no lo entendía, por exigir lo mejor de mí; ahora entiendo que gracias a eso he logrado alcanzar mis metas.

A mis hermanas, a las cuales quiero a pesar de todos los desacuerdos. Sé que siempre vamos a estar juntas apoyándonos.

Aunque fue un camino con algunos tropiezos, hoy puedo decir que con esta tesis termina un tramo muy pequeño para ser la profesionista que quiero ser.

***“La ciencia todavía no nos ha enseñado si la locura es, o no, la sublimidad de la inteligencia”***

*Edgar Allan Poe*



# ÍNDICE

## Página

Índice de Figuras.....	i
Índice de Tablas.....	ii
Índice de Gráficos.....	iii
Índice de Abreviaturas.....	v
Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Antecedentes.....	3
1.1. Anatomía de la Glándula Mamaria.....	3
2. Introducción.....	5
2.1. Cáncer de Mama.....	5
2.1.1 Definición de Cáncer de mama.....	5
2.1.2 Estadísticas del Cáncer de Mama.....	6
2.1.3 Clasificación del Cáncer de Mama.....	7
2.1.4 Signos y Síntomas del Cáncer de Mama.....	11
2.1.5 Factores de Riesgo.....	11
2.1.6 Tratamientos para el Cáncer de Mama.....	14
2.2. <i>Ruta graveolens</i> L.....	16
2.2.1 Clasificación Científica.....	16
2.2.2 Descripción Fisiológica y Morfológica.....	16
2.2.3 Propiedades Medicinales.....	17
2.2.4 Principios Activos.....	17
2.2.5 Efecto Antitumoral de la planta.....	18
2.3. Lectinas Vegetales.....	19
2.3.1. Estructura de Lectinas Vegetales.....	21
2.3.1.1. Dominio de Reconocimiento a Carbohidratos.....	22
2.3.2 Clasificación de Lectinas Vegetales.....	25
2.3.3 Lectinas Vegetales y su función.....	29
2.3.4 Efecto de Lectinas Vegetales en Células Tumorales.....	29
3. Planteamiento del Problema.....	33
4. Hipótesis.....	33
5. Objetivos.....	33
5.1. Objetivo General.....	33
5.2. Objetivos Particulares.....	33
6. Desarrollo Experimental.....	34
6.1. Extracción Salina de Lectinas Vegetales de <i>R. graveolens</i> .....	34
6.2. Procesos de Semipurificación.....	35
6.2.1. Diálisis.....	35
6.2.2. Cromatografía de Afinidad.....	35
6.3. Cuantificación de Proteínas.....	35
6.3.1. Método de Biuret.....	35
6.3.2. Método de UV.....	35
6.4. Cuantificación de Carbohidratos.....	36
6.4.1. Cuantificación de Azúcares Totales.....	36
6.4.2. Cuantificación de Azúcares Reductores.....	36
6.4.3. Cuantificación de Azúcares No Reductores.....	36
6.5. Prueba de Hemaglutinación.....	37
6.5.1. Cinética de Hemaglutinación.....	37
6.5.2. Inhibición de la Hemaglutinación.....	37
6.6. Electroforesis SDS-PAGE.....	38
6.7. Prueba de Citotoxicidad.....	38
6.7.1. Cinética de Citotoxicidad.....	38

6.7.2. Inhibición de la Citotoxicidad o Proliferación.....	38
7. Resultados.....	39
7.1. Extracción Salina de Lectinas Vegetales.....	39
7.1.1. Determinación de la concentración de lectinas vegetales en <i>R. graveolens</i> obtenidas por diferente método de extracción.....	39
7.1.2. Determinación de la concentración de carbohidratos presentes en fracciones enriquecidas con lectinas vegetales en <i>R. graveolens</i> obtenidas por diferente método de extracción.....	41
7.1.3. Determinación del Efecto Hemaglutinante de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales en <i>R. graveolens</i> obtenidas por diferentes métodos de extracción.....	42
7.1.4. Determinación del Efecto Citotóxico en células MCF-7 de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales en <i>R. graveolens</i> obtenidas por diferentes métodos de extracción.....	44
7.2. Comparación de Lectinas Vegetales de <i>R. graveolens</i> obtenidas por diferentes métodos de extracción.....	45
7.2.1. Lectinas Vegetales de Hoja de <i>R. graveolens</i> .....	45
7.2.1.1. Comparación de la Concentración de proteínas en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de <i>R. graveolens</i> .....	45
7.2.1.2. Comparación de la concentración de carbohidratos en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de <i>R. graveolens</i> .....	46
7.2.1.3. Comparación de la relación Proteína-Carbohidrato en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de <i>R. graveolens</i> .....	47
7.2.1.4. Comparación del efecto Hemaglutinante en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de <i>R. graveolens</i> .....	47
7.2.1.5. Comparación de la Cinética del Efecto Hemaglutinante en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de <i>R. graveolens</i> .....	50
7.2.1.6. Comparación de la Inhibición del Efecto Hemaglutinante en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de <i>R. graveolens</i> .....	52
7.2.1.7. Comparación del Peso Molecular en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de <i>R. graveolens</i> .....	53
7.2.1.8. Comparación del efecto Citotóxico en células MCF-7 por dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de <i>R. graveolens</i> .....	54
7.2.1.9. Cinética del efecto Citotóxico sobre células MCF-7 de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de Hoja de <i>R. graveolens</i> obtenidas por dos métodos de extracción.....	55
7.2.1.10. Inhibición del efecto Citotóxico/Proliferativo sobre células MCF-7 de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de Hoja de <i>R. graveolens</i> obtenidas por dos métodos de extracción.....	56
7.2.2. Lectinas Vegetales de Tallo de <i>R. graveolens</i> .....	57
7.2.2.1. Comparación de la Concentración de proteínas en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de <i>R. graveolens</i> .....	57
7.2.2.2. Comparación de la concentración de carbohidratos en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de <i>R. graveolens</i> .....	58
7.2.2.3. Comparación de la relación Proteína-Carbohidrato en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de <i>R. graveolens</i> .....	58
7.2.2.4. Comparación del efecto Hemaglutinante en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de <i>R. graveolens</i> .....	59
7.2.2.5. Comparación de la Cinética del Efecto Hemaglutinante en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de <i>R. graveolens</i> .....	62
7.2.2.6. Comparación de la Inhibición del Efecto Hemaglutinante en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de <i>R. graveolens</i> .....	63
7.2.2.7. Comparación del Peso Molecular en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de <i>R. graveolens</i> .....	64
7.2.2.8. Comparación del efecto Citotóxico en células MCF-7 por dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de <i>R. graveolens</i> .....	65

7.2.2.9. Cinética del efecto Citotóxico sobre células MCF-7 de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de Tallo de <i>R. graveolens</i> obtenidas por dos métodos de extracción.....	66
7.2.2.10. Inhibición del efecto Citotóxico/Proliferativo sobre células MCF-7 de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de Tallo de <i>R. graveolens</i> obtenidas por dos métodos de extracción.....	67
7.2.3. Lectinas Vegetales de Raíz de <i>R. graveolens</i> .....	68
7.2.3.1. Comparación de la Concentración de proteínas en tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de <i>R. graveolens</i> .....	68
7.2.3.2. Comparación de la concentración de carbohidratos en tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de <i>R. graveolens</i> .....	69
7.2.3.3. Comparación de la relación Proteína-Carbohidrato en tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de <i>R. graveolens</i> .....	70
7.2.3.4. Comparación del efecto Hemaglutinante en tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de <i>R. graveolens</i> .....	71
7.2.3.5. Comparación de la Cinética del Efecto Hemaglutinante en tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de <i>R. graveolens</i> .....	70
7.2.3.6. Comparación de la Inhibición del Efecto Hemaglutinante en tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de <i>R. graveolens</i> .....	76
7.2.3.7. Comparación del Peso Molecular en tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de <i>R. graveolens</i> .....	76
7.2.3.8. Comparación del efecto Citotóxico en células MCF-7 por tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de <i>R. graveolens</i> .....	78
7.2.3.9. Cinética del efecto Citotóxico sobre células MCF-7 de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de Raíz de <i>R. graveolens</i> obtenidas por tres métodos de extracción.....	79
7.2.3.10. Inhibición del efecto Citotóxico/Proliferativo sobre células MCF-7 de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de Raíz de <i>R. graveolens</i> obtenidas por tres métodos de extracción.....	80
7.3. Resumen de la caracterización Bioquímica Parcial y del Efecto Biológico de Lectinas Vegetales presentes en <i>R. graveolens</i> .....	82
8. Discusión.....	86
9. Conclusiones.....	101
10. Perspectivas.....	102
11. Literatura Citada.....	103
12. Anexos.....	109

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1- Anatomía de la glándula mamaria y su conexión con los músculos pectorales.....	3
Fig. 2- Anatomía interna de la mama.....	4
Fig. 3- Desarrollo del Cáncer de Mama, a partir de la transformación de células normales hasta la formación de un tumor y su posterior metástasis.....	5
Fig. 4- Tasa estandarizada de Mortalidad por cáncer de mama en la población femenina mayor a 25 años de México.....	7
Fig. 5- Etapa 0 del desarrollo del cáncer de mama.....	8
Fig. 6- Etapa 1 del desarrollo del cáncer de mama.....	9
Fig. 7- Etapa 2 del desarrollo del cáncer de mama.....	9
Fig. 8- Etapa 3 del desarrollo del cáncer de mama.....	10

Fig. 9- Etapa 4 del desarrollo del cáncer de mama.....	10
Fig. 10- Síntomas frecuentes del cáncer de mama.....	11
Fig. 11- Morfología de <i>Ruta graveolens</i> .....	16
Fig. 12- Distribución Taxonómica de lectinas vegetales presente en diferentes familias.....	20
Fig. 13- Estructura de lectinas de muérdago.....	21
Fig. 14- Monosacáridos reconocidos por lectinas vegetales, mostrando conformaciones en los carbonos 3 y 4.....	22
Fig. 15- N-glicanos reconocidos por las lectinas de Con A y LCA.....	23
Fig. 16- Representación esquemática de las interacciones proteína-carbohidrato en el complejo PNA-T.....	24
Fig. 17- Representación esquemática de Merolectinas, Hololectinas, Chimerolectinas y Superlectinas.....	26
Fig. 18- Representación esquemática de las estructuras tridimensionales en lectinas vegetales.....	28
Fig. 19- Red de señalización de muerte celular programada (PCD) por lectinas vegetales.....	32
Fig. 20- Patrón Electroforético de Fracciones enriquecidas del extracto de hoja de <i>R. graveolens</i> extraído con NaCl.....	53
Fig. 21- Patrón Electroforético de Fracciones enriquecidas del extracto de hoja de <i>R. graveolens</i> extraído con Tris-HCl.....	53
Fig. 22- Patrón Electroforético de Fracciones enriquecidas del extracto de tallo de <i>R. graveolens</i> extraído con NaCl.....	64
Fig. 23- Patrón Electroforético de Fracciones enriquecidas del extracto de tallo de <i>R. graveolens</i> extraído con Tris-HCl.....	64
Fig. 24- Patrón Electroforético de Fracciones enriquecidas del extracto de raíz de <i>R. graveolens</i> extraído con NaCl.....	72
Fig. 25- Patrón Electroforético de Fracciones enriquecidas del extracto de raíz de <i>R. graveolens</i> extraído con Tris-HCl.....	76
Fig. 26- Patrón Electroforético de Fracciones enriquecidas del extracto de raíz de <i>R. graveolens</i> extraído con PBS.....	77
Fig. 27- Distribución de Lectinas vegetales en <i>R. graveolens</i> .....	99
Fig. 28- Mecanismos de Acción ejercidos por lectinas vegetales de <i>R. graveolens</i> .....	100

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1- Magnitud de los Factores de Riesgo conocidos para el cáncer de mama....	14
Tabla 2- Clasificación de Lectinas Vegetales según su estado de maduración.....	25
Tabla 3- Clasificación de Lectinas Vegetales según su especificidad a Monosacáridos.....	26
Tabla 4- Clasificación de Lectinas Vegetales por unión a carbohidratos y estructura.....	28
Tabla 5- Mecanismos de acción de lectinas vegetales en diferentes líneas celulares de cáncer.....	31
Tabla 6- Concentración de Proteínas de <i>Ruta graveolens</i> presentes en cada uno de los procesos de semipurificación y fracciones enriquecidas con lectinas vegetales	40
Tabla 7- Actividad Hemaglutinante de Lectinas de <i>Ruta graveolens</i> extraídas de diferente órgano por diferente método de extracción.....	43
Tabla 8- Comparación de la Relación Proteína-Carbohidrato de fracciones enriquecidas de hoja de <i>Ruta graveolens</i> extraídas con NaCl y Tris-HCl.....	47

Tabla 9- Comparación de la Actividad Hemaglutinante de Fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de hoja de <i>Ruta graveolens</i> extraídas con NaCl y Tris-HCl....	49
Tabla 10- Inhibición de la Hemaglutinación de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de hoja de <i>Ruta graveolens</i> (NaCl).....	52
Tabla 11- Inhibición de la Hemaglutinación de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de hoja de <i>Ruta graveolens</i> (Tris-HCl).....	52
Tabla 12- Comparación de la Relación Proteína-Carbohidrato de fracciones enriquecidas de tallo de <i>Ruta graveolens</i> extraídas con NaCl y Tris-HCl.....	59
Tabla 13- Comparación de la Actividad Hemaglutinante de Fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de tallo de <i>Ruta graveolens</i> extraídas con NaCl y Tris-HCl.....	61
Tabla 14- Inhibición de la Hemaglutinación de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de tallo de <i>Ruta graveolens</i> (Tris-HCl).....	63
Tabla 15- Comparación de la Relación Proteína-Carbohidrato de fracciones enriquecidas de raíz de <i>Ruta graveolens</i> extraídas con NaCl, Tris-HCl y PBS.....	70
Tabla 16- Comparación de la Actividad Hemaglutinante de Fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de raíz de <i>Ruta graveolens</i> extraídas con NaCl, Tris-HCl y PBS.....	72
Tabla 17- Características bioquímicas de lectinas vegetales presentes en fracciones enriquecidas del extracto con NaCl de hoja de <i>R. graveolens</i> .....	82
Tabla 18- Características bioquímicas de lectinas vegetales presentes en fracciones enriquecidas del extracto con Tris-HCl de hoja de <i>R. graveolens</i> .....	83
Tabla 19- Características bioquímicas de lectinas vegetales presentes en fracciones enriquecidas del extracto con NaCl de tallo de <i>R. graveolens</i> .....	83
Tabla 20- Características bioquímicas de lectinas vegetales presentes en fracciones enriquecidas del extracto con Tris-HCl de tallo de <i>R. graveolens</i> .....	84
Tabla 21- Características bioquímicas de lectinas vegetales presentes en fracciones enriquecidas del extracto con NaCl de raíz de <i>R. graveolens</i> .....	84
Tabla 22- Características bioquímicas de lectinas vegetales presentes en fracciones enriquecidas del extracto con Tris-HCl de raíz de <i>R. graveolens</i> .....	85
Tabla 23- Características bioquímicas de lectinas vegetales presentes en fracciones enriquecidas del extracto con PBS de raíz de <i>R. graveolens</i> .....	85

## INDICE DE GRAFICOS

	Página
Gráfico 1- Concentración de Proteínas Totales de <i>R. graveolens</i> obtenidas por diferentes Métodos de extracción.....	41
Gráfico 2- Proporción de proteínas tipo lectina presentes en <i>R. graveolens</i> obtenidas por diferente método de extracción.....	41
Gráfico 3. Concentración de Azúcares en Fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de <i>Ruta graveolens</i> .....	42
Gráfico 4. Hemaglutinación de lectinas vegetales de <i>R. graveolens</i> en el sistema ABO+.....	43

Gráfico 5. Efecto Citotoxico de Lectinas Vegetales de <i>R. graveolens</i> en células MCF-7 de cáncer de mama.....	44
Gráfico 6. Comparación de la concentración de proteínas de hoja de <i>R. graveolens</i> extraídas con NaCl y Tris-HCl.....	45
Gráfico 7. Comparación de azúcares de lectinas vegetales de hoja de <i>R. graveolens</i> .....	46
Gráfico 8. Comparación de la Relación entre la concentración de proteína y carbohidratos totales en fracciones de hoja de ruda extraídas con NaCl y Tris-HCl.....	47
Gráfico 9. Comparación de la Actividad hemaglutinante en extractos de hoja de ruda hechos con NaCl y Tris-HCl.....	49
Gráfico 10. Cinética de Hemaglutinación de Lectinas de Hoja de <i>R. graveolens</i> (NaCl) en el sistema ABO+.....	50
Gráfico 11. Cinética de Hemaglutinación de Lectinas de Hoja de <i>R. graveolens</i> (Tris-HCl) en el sistema ABO+.....	51
Gráfico 12. Comparación del efecto citotoxico de lectinas vegetales de hoja de <i>R. graveolens</i> en células MCF-7.....	50
Gráfico 13. Cinética del efecto citotoxico de lectinas vegetales de hoja de <i>R. graveolens</i> (NaCl).....	55
Gráfico 14. Cinética del efecto citotoxico de lectinas vegetales de hoja de <i>R. graveolens</i> (Tris-HCl).....	55
Gráfico 15. Inhibición del Efecto Citotoxico o Proliferativo de lectinas vegetales de hoja de <i>R. graveolens</i> (NaCl).....	56
Gráfico 16. Inhibición del Efecto Citotoxico de lectinas vegetales de hoja de <i>R. graveolens</i> (Tris-HCl).....	56
Gráfico 17. Comparación de la concentración de proteínas de tallo de <i>R. graveolens</i> extraídas con NaCl y Tris-HCl.....	57
Gráfico 18. Comparación de azúcares de lectinas vegetales de tallo de <i>R. graveolens</i> .....	58
Gráfico 19. Comparación de la Relación entre la concentración de proteína y carbohidratos totales en fracciones de tallo de ruda extraídas con NaCl y Tris-HCl	59
Gráfico 20. Comparación de la actividad hemaglutinante en extractos de tallo de ruda hechos con NaCl y Tris-HCl.....	61
Gráfico 21. Cinética de Hemaglutinación de Lectinas de Tallo de <i>R. graveolens</i> (NaCl) en el Sistema ABO+.....	62
Gráfico 22. Cinética de Hemaglutinación de Lectinas de Tallo de <i>R. graveolens</i> (Tris-HCl) en el Sistema ABO+.....	63
Gráfico 23. Comparación del efecto citotoxico de lectinas vegetales de tallo <i>R. graveolens</i> en células MCF-7.....	65
Gráfico 24. Cinética del efecto Citotoxico de lectinas vegetales de tallo de <i>R. graveolens</i> (NaCl).....	66
Gráfico 25. Cinética del efecto Citotoxico de lectinas vegetales de tallo de <i>R. graveolens</i> (Tris-HCl).....	66
Gráfico 26. Inhibición del Efecto Citotoxico o Proliferativo de lectinas vegetales de tallo de <i>R. graveolens</i> (NaCl).....	67
Gráfico 27. Inhibición del Efecto Citotoxico de lectinas vegetales de tallo de <i>R. graveolens</i> (Tris-HCl).....	67
Gráfico 28. Comparación de la concentración de proteínas de raíz de <i>R. graveolens</i> extraídas con NaCl, Tris-HCl y PBS.....	68
Gráfico 29. Comparación de azúcares de lectinas vegetales de raíz de <i>R. graveolens</i> .....	68

Gráfico 30. Comparación de la Relación entre la concentración de proteína y carbohidratos totales en fracciones de raíz de ruda extraídas con NaCl, Tris-HCl y PBS.....	70
Gráfico 31. Comparación de la actividad hemaglutinante en extractos de raíz de ruda hechos con NaCl, Tris-HCl y PBS.....	73
Gráfico 32. Cinética de Hemaglutinación de lectinas de raíz de <i>R. graveolens</i> (NaCl) en sistema ABO+.....	74
Gráfico 33. Cinética de Hemaglutinación de Lectinas de Raíz de <i>R. graveolens</i> (Tris-HCl) en el sistema ABO+.....	75
Gráfico 34. Cinética de Hemaglutinación de Lectinas de Raíz de <i>R. graveolens</i> (PBS) en el Sistema ABO+.....	76
Gráfico 35. Comparación del efecto citotoxico de lectinas vegetales de raíz de <i>R. graveolens</i> en células MCF-7.....	79
Gráfico 36. Cinética del efecto Citotoxico de lectinas vegetales de raíz de <i>R. graveolens</i> (NaCl).....	79
Gráfico 37. Cinética del efecto Citotoxico de lectinas vegetales de raíz de <i>R. graveolens</i> (Tris-HCl).....	80
Gráfico 38. Inhibición del efecto citotoxico o proliferativo de lectinas de raíz de <i>R. graveolens</i> (NaCl).....	80
Gráfico 39. Inhibición del efecto citotoxico o proliferativo de lectinas de raíz de <i>R. graveolens</i> (Tris-HCl).....	81
Gráfico 40. Inhibición del efecto proliferativo de lectinas de raíz de <i>R. graveolens</i> (PBS).....	81

## Índice de Abreviaturas

a.	C.	Antes de Cristo
AAL		Lectina de <i>Agrocybe aegerita</i>
ABL		Lectina de <i>Agaricus bisporus</i>
ADN		Ácido Desoxirribonucleico
AGC		Proteínas cinasas dependientes de calcio
ALL		Lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i>
AMPK		Proteína cinasa activada por AMP
APA		Lectina de abrina
Ara		Arabinosa
Asp		Asparagina
ATM		Proteína ataxia-telangiectasia mutada
ATP		Adenosin trifosfato
ATR		Proteína ataxiatelangiectasia
Bax		Bcl-2 associated X protein
Bcl-2		B-cell lymphoma 2
BLM		DNA helicasa de Bloom
BRCA1		Breast Cancer 1
C		Carboxilo
Ca <sup>2+</sup>		Calcio 2+
Cdc42		Cell división control protein 42 homolog
Con A		Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
CPL		Lectina de <i>Cucurbitaceae pholoem</i>
CRA		Lectina relacionada con quitinasa
CV-N		Lectina N-Cyanovirina
DBA		Lectina de <i>Dolichos biflorus</i>
DSA		Lectina de <i>Datura stramonium</i>
EEA		Lectina <i>Euonymus europaeus</i>
EGF		Epidermal growth factor
epCAM		Moléculas de Adhesión de la superficie
ERE		Elemento de Respuesta a Estrógeno

FGF	Fibroblast growth factors
FLICE	FADD como interleucina-1 beta de la enzima convertidora
Fru	Fructosa
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GalAcet	Galactosa Acetilada
GlcNac	N-acetil glucosamina
Glu	Glucosa
GS-1	Lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i>
GTPasas	Cinasas de Guanosín Trifosfato
HCl	Ácido clorhídrico
HER2	Receptor 2 de factor de factor epidérmico humano
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
JAC	Lectina de jacalina
KML-C	Lectina de <i>Viscum álbium coloratum</i>
Lac	Lactosa
LacNac	N-acetil-lactosamina
LCA	Lectina de <i>Lens culinaris</i>
LKB1	interacting protein-1
LPA	Lectina de <i>Limulus polyphemus</i>
LTA	Lectina de <i>Lotus tetragonolobus</i>
Mal	Maltosa
Man	Manitol
Man	Manosa
MCF-7	Michigan Cancer Foundation 7
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
ML-I	Lectina de muérdago europeo
MLH1	mutL Homology 1
Mn <sup>2+</sup>	Manganeso
MSH	MutS, homolog
N	Amino
NaCl	Cloruro de Sodio
NANA	N-acetilgalactosamina
NLS	nuclear localization signal
Orp150	Oxygen-regulated Protein 150
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa
PBS	phosphate buffered saline
PCD	Muerte Celular Programada Dirigida
PCL	Lectina <i>polygonatum cyrtonema</i>
PH	Pleckstrin Homologo
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
RAD51	DNA repair protein 51
RCA	Lectina de <i>Ricinus communis</i>
RE	Receptores de estrógeno
RHD	Dominio de homología rel
Rib	Ribosa
RTK	Receptores tirosina kinasa
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA pol	Ribonucleic Acid polimerase
RP	Receptores de progesterona
Sac	Sacarosa
SBA	Lectina de <i>Glycine max</i>
Ser	Serina
Sor	Sorbitol
STL	Lectina de <i>Solanum tuberosum</i>
TAD	Dominio de activación transcripcional
Thr	Treonina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano



TMA I	Lectina de <i>Tricholoma mongolicum</i> I
TMA II	Lectina de <i>Tricholoma mongolicum</i> II
UEA-I	Lectina de <i>Ulex europaeus</i> I
UV	Ultravioleta
VCA	Lectina de <i>Viscum álbium</i>
VFA	Lectina de <i>Vicia faba</i>
WGA	Lectina de <i>Triticum vulgare</i>
Xyl	Xylosa

## Resumen

El cáncer de mama se define como la proliferación de células malignas en el tejido mamario que produce una tumoración con capacidades de invasión de otros tejidos. Esta enfermedad representa la primer causa de mortalidad para las mujeres al presentar una incidencia de 60.4 mujeres por cada 100 000 mujeres mayores a 35 años, así como una tasa de mortalidad del 18 %; lo anterior pone de manifiesto la necesidad de generar nuevas terapias alternativas que ejerzan un mayor efecto antineoplásico en células tumores y disminuir los efectos secundarios producidos por los quimioterapéuticos. Dentro de estas nuevas alternativas para el tratamiento del cáncer se encuentran las lectinas vegetales, las cuales presentan una alta capacidad de reconocimiento y citotoxicidad en células tumorales. Este estudio tuvo como objetivo realizar una comparación de los métodos de obtención de lectinas vegetales de la *Ruta graveolens*, así como la caracterización bioquímica parcial y del efecto citotóxico presentado en células MCF-7. Se obtuvieron fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de diferentes órganos de la *Ruta graveolens* extraídas con dos de los principales métodos de extracción; demostrando que la ruda presenta una diversidad de proteínas tipo lectina con afinidad a diferentes carbohidratos, así como la extracción con un buffer de alta fuerza iónica presenta un mayor rendimiento en la obtención de lectinas vegetales; sin embargo se encontraron diferencias en los efectos biológicos obtenidos con cada método de extracción. De los cuales las extracciones con NaCl presentan un mejor efecto aglutinante respecto a la extracción con Tris-HCl, contrario al efecto citotóxico que para las fracciones de tallo extraídas con Tris-HCl presentan una disminución del 58% de células MCF-7 de cáncer de mama, así como su transformación en agentes proliferativos en presencia de un azúcar al que presentan alta afinidad.

## Abstract

Breast cancer is defined as proliferation of malignant cells in breast tissue that produces a tumor with able to invade other tissues. This disease represents the first cause of mortality in women, it has on incidence of 60.4 women for each 100 000 women over 35 years, as well as a mortality rate of 18 %. Such a data shows the necessity to generate new therapies that exercise greater antineoplastic effect in tumor cells and reduce the secondary effects produced by chemotherapeutics. Within these new alternatives for cancer treatment are plant lectins, which feature a high recognition capacity and cytotoxicity in tumor cells. The objective of this study was the comparison of different methods to obtain plant lectins from *Ruta graveolens*, so as biochemical partial characterization and cytotoxic effect on MCF-7 cells. Enriched fractions with plant lectins were obtained of different *Ruta graveolens* organs extracted with two of the principal extraction methods. Here we demonstrated that rue has diver lectin proteins with affinity to different carbohydrates, also the extracts with high ionic strength buffer showed a higher yield in plant lectins obtained. However, were found differences in biological effects with each extraction method. The NaCl extractions have a better hemagglutination effect with respect to Tris-HCl, contrary to cytotoxic effect that for stem fractions extracted with Tris-HCl showed effect of 58% in MCF-7 breast cancer cells, so like their transformation in proliferative agents in presence of sugar to which display high affinity.

# 1. Antecedentes

## 1.1. Anatomía de la Glándula Mamaria

La mama se localiza desde el borde del esternón a la línea anterior de la axila y de la primera a la sexta costilla, el resto descansa en la aponeurosis profunda que cubre el pectoral mayor, siendo que toda la mama está incluida en una aponeurosis superficial y su contorno depende de un soporte aponeurótico, con algunas digitaciones de los músculos serrato mayor y oblicuo mayor en la zona superior de la vaina de los rectos mayores del abdomen (Fig. 1) (Secretaría de Salud, 2002).



Fig. 1- Anatomía de la glándula mamaria y su conexión con los músculos pectorales.  
Tomado y modificado de Sánchez *et al*, 2008.

La glándula mamaria presenta entre seis y diez sistemas principales de conductos o lóbulos, que a su vez están divididos en 10 a 20 lobulillos, que son las unidades funcionales del parénquima mamario y que a su vez se dividen en alvéolos secretorios; los cuales convergen hasta un sitio debajo del pezón formando los conductos lactíferos (Secretaría de Salud, 2002). En su mayoría está constituida por tejido conectivo denso y fibras musculares lisas en donde se encuentran los conductos galactóforos (Sánchez *et al*, 2008). Antes de la pubertad, el sistema de conductos ramificados terminan en fondos ciegos, pero al comienzo de la menarquía se presenta una proliferación distal formando alrededor de treinta conductillos o

ácinos revestidos de epitelio; en donde cada conducto terminal y su conductillo componen las unidades lobulillares ductales terminales (Fig. 2) (Secretaría de Salud, 2002).

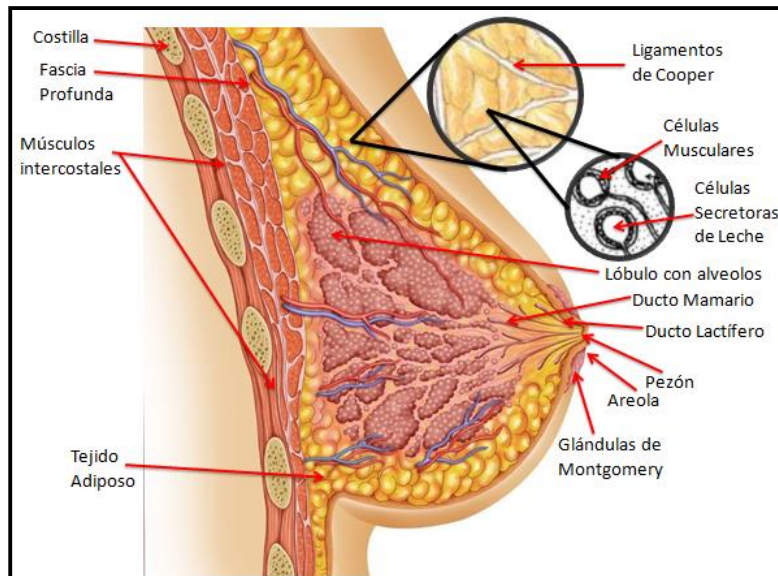


Fig. 2- Anatomía interna de la mama. Modificado de Moreno, 2009.

Por otra parte la areola, el pezón y las desembocaduras de los conductos galactóforos principales están revestidos de epitelio escamoso estratificado. Mientras que el revestimiento de los conductos mamarios principales se convierte en un epitelio columnar pseudoestratificado y después en epitelio cuboidal de dos capas. Por debajo del epitelio de revestimiento se encuentra una capa baja de células aplanadas o mioepiteliales que contienen miofilamentos orientados paralelamente al eje del conducto; en el contorno de los conductos y conductillos se localiza una membrana basal, además los lobulillos se encuentran en un estroma laxo y mixomatoso que contiene linfocitos dispersos o tejido conectivo intralobulillar (Secretaría de Salud, 2002).

## 2. Introducción

### 2.1 Cáncer de Mama

#### 2.1.1. Definición de Cáncer de Mama

El cáncer de mama se define como la proliferación de células malignas en el tejido mamario debido a fallas en el balance hormonal y en la capacidad de respuesta del tejido mamario, originando una división celular descontrolada produciendo un tumor que puede tener la capacidad de generar metástasis (Fig. 3) (Moreno, 2009). Estas tumoraciones pueden manifestarse desde un desorden mamario benigno, hasta los que pasan por condiciones premalignas a microinvasión, extensión local y dispersión nodal, o bien presentar diseminación de células tumorales a otros órganos como pulmón, riñón, aparato digestivo, hueso y cerebro.

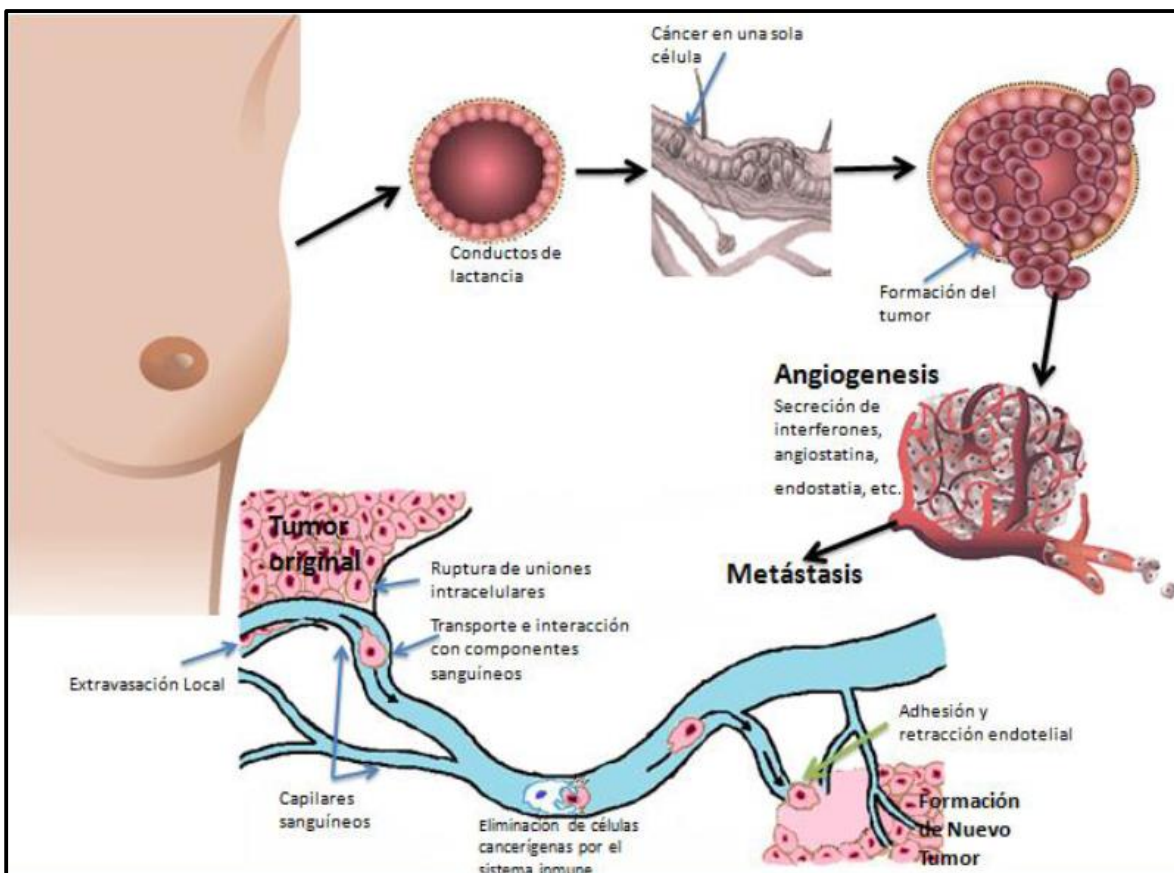


Fig. 3- Desarrollo del Cáncer de Mama a partir de la transformación de células normales hasta la formación de un tumor y su posterior metástasis. Modificado de Moreno, 2009.

### 🔗 2.1.2. Estadísticas del Cáncer de Mama

Se estima que el riesgo que presenta una mujer de desarrollar cáncer de mama es 1 de cada 8, mientras que la probabilidad de morir por la misma es de 1 de cada 36 mujeres (American Cancer Society, 2013).

Actualmente a nivel mundial, el cáncer de mama representa el mayor problema de salud para la población femenina, ya que para el 2008 se reportaron 1 380 300 casos nuevos que representan el 23 % de los cánceres en mujeres; de los cuales 692 000 casos fueron diagnosticados en países desarrollados y 691 000 en países en vías de desarrollo. Así pues la enfermedad tiene una incidencia de 34.9 por cada 100 000 mujeres mayores a 15 años y 60.4 por cada 100 000 mujeres mayores a 35 años, lo cual incrementa con la edad y tiene sus picos de máxima incidencia entre los 35-45 años y después de los 55 años; además de presentar diferencias por raza, ya que las mujeres caucásicas presentan una mayor incidencia de desarrollar la enfermedad, mientras que las mujeres con ascendencia africana son más propensas a morir por la misma (Beltrán, 2010; Sánchez, 2008; American Cancer Society, 2013 y Torres *et al*, 2006).

En México para el año 2006 el cáncer de mama pasó a ocupar el primer lugar como causa de enfermedad y mortalidad entre la población femenina, y para el año 2009 se reportó una incidencia de 13 987 casos nuevos, lo que representa el 26.1% de mujeres en una edad promedio de  $53.64 \pm 11.87$  años; observando una incidencia para la población femenina entre 60-64 años de 61 caso nuevos por cada 100 000 mujeres, seguida de las mujeres de 50-59 con 51 casos por cada 100 000 mujeres y el grupo de 45-49 con 45 casos nuevos. Lo anterior indica que se ha modificado la distribución de casos nuevos por grupos etarios, teniendo que la edad de aparición es más temprana ya que se aprecia un aumento del 45.5 % del total de casos nuevos a la edad de 35 años. Se estima que en México para el año 2020 se alcanzarán 38.8 millones de mujeres con la enfermedad (Knaul *et al*, 2009; Robles *et al*, 2011; INEGI, 2013; Maza y Vecchi, 2009).

Por su parte las tasas de mortalidad reportadas para 2010 indican la muerte de 18.7 por cada 100 000 mujeres mayores a 25 años lo que representa el fallecimiento de una mujer cada dos horas, mostrando un incremento del 49.5 % en los últimos 20 años; mientras que del total de defunciones el grupo de edad con un mayor número de muertes fue de 45-54 años. Haciendo un análisis de la mortalidad por área geográfica se obtiene que los estados que concentraron la mitad de las muertes por

cáncer de mama en 2010 fueron: Distrito Federal con 13.4 %, Estado de México con 12.4 %, Jalisco 8.2 %, Veracruz 6.4 %, Nuevo León 6 % y Guanajuato con 3.8 %; además de que los estados que presentaron un incremento del 200 % en sus tasas de mortalidad son Chihuahua, Coahuila y Guerrero (Fig.4) (IMSS, 2012; Knaul *et al*, 2011 y Torres *et al*, 2006).

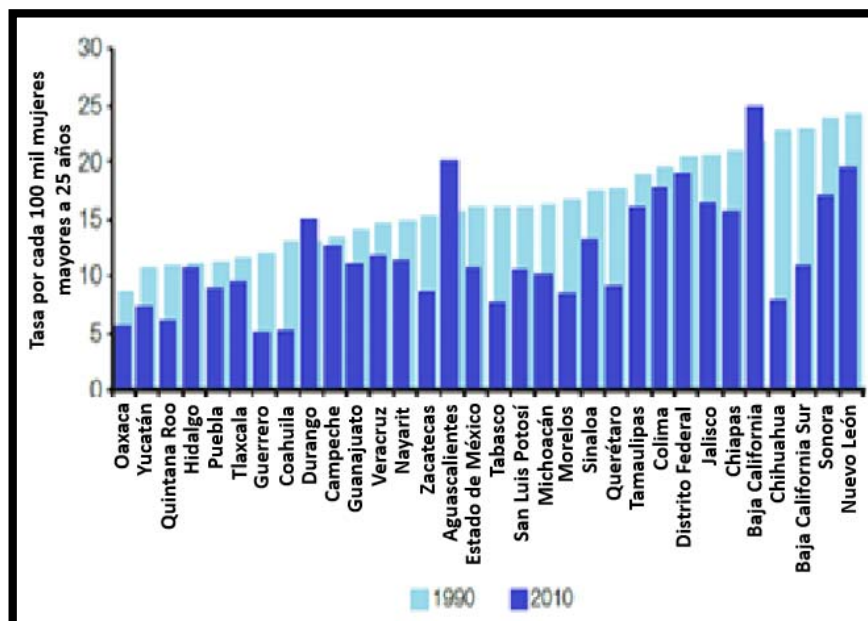


Fig. 4- Tasa estandarizada de Mortalidad por cáncer de mama en la población femenina mayor a 25 años de México. Modificado de IMSS, 2012.

### 🔗 2.1.3. Clasificación del Cáncer de Mama

El cáncer de mama se puede clasificar por el lugar donde se originan las células tumorales y el aspecto de las que lo conforman:

- ❖ Lobular: se origina a partir de células de las glándulas que fabrican leche.
  - Carcinoma lobular infiltrante: comienza en las células que recubren las glándulas productoras de leche, creciendo a través de la pared de los lobulillos y pudiendo diseminarse a ganglios linfáticos u otras partes del cuerpo cercanas. Aproximadamente 1 de cada 10 casos son de este tipo.
- ❖ Ductal: la transformación maligna se da en células del revestimiento de un conducto de la mama y puede ser:
  - Carcinoma ductal in situ: las células anormales comienzan en el recubrimiento de los conductos, estas células no se propagan a los ganglios linfáticos u otros órganos a través de las paredes de los conductos hacia el tejido de la mama.



- Carcinoma ductal infiltrante: es el cáncer de mama más común, el cual comienza en las células que recubren el conducto, rompiendo la pared e invadiendo el tejido de la mama, desde donde es capaz de propagarse a los ganglios linfáticos u otras partes del cuerpo cercanas. Representa aproximadamente 8 de cada 10 casos de cáncer de mama invasivo.
- ❖ Inflamatorio: las células tumorales bloquean los vasos linfáticos de la piel, produciendo una inflamación en la mama. Es un tipo de cáncer invasivo poco frecuente con aproximadamente 1-3 % de todos los casos. En su mayoría no se presenta una protuberancia, pero genera cambios en la piel de la mama con una coloración roja, engrosamiento, incremento del tamaño, duro, sensible o irritado. Con una mayor probabilidad de propagación y peor pronóstico.
- ❖ Enfermedad de Paget: es poco frecuente de 1-3 %, se presenta como una lesión del pezón y de la areola, pruriginosa, con erosiones eccematosas (Roche, 2011; National Cancer Institute, 2012; Lloret *et. al*, 2004).

El cáncer de mama se puede clasificar por la etapa de desarrollo en la que se encuentra la enfermedad, tomando en consideración el tamaño del tumor y el grado de diseminación a ganglios linfáticos u otras partes del cuerpo (Roche, 2011; National Cancer Institute, 2012):

- ❖ Estadio 0: células cancerosas que no presentan carácter invasivo y están localizadas únicamente en el interior de los conductos mamarios, denominado carcinoma in situ (Fig. 5).

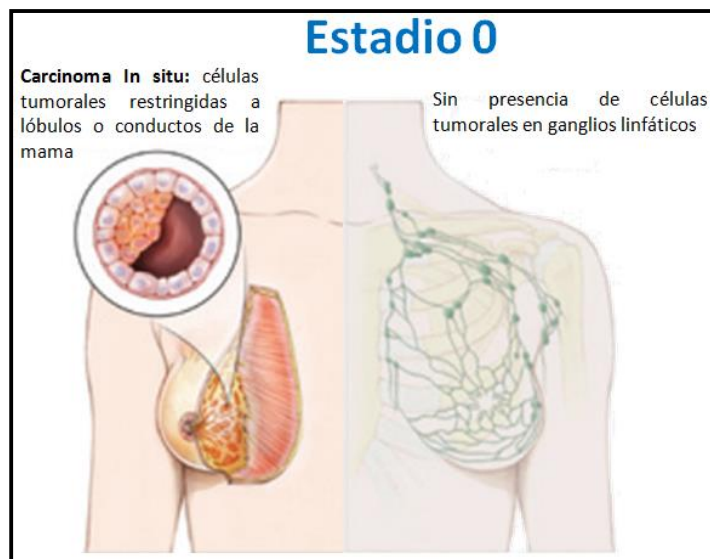


Fig. 5- Etapa 0 del desarrollo del cáncer de mama. Modificado de American Society of Clinical Oncology, 2011.

- ❖ Estadio 1: las células tumorales se concretan en un nódulo inferior a los 2 cm de diámetro (Fig. 6).
  - Estadio IA: el tumor es menor a 2 cm de ancho y no se ha diseminado a ganglios linfáticos.
  - Estadio IB: tumor menor a 2 cm de diámetro y presencia de células cancerosas en ganglios linfáticos.

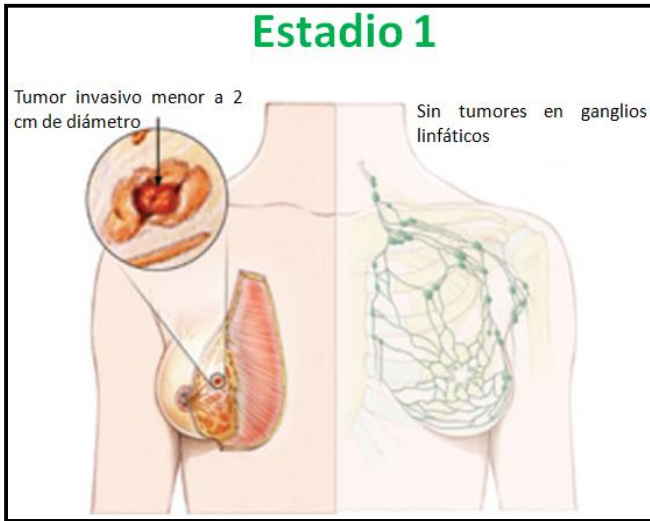


Fig. 6- Etapa 1 del desarrollo del cáncer de mama. Modificado de American Society of Clinical Oncology, 2011.

- ❖ Estadio 2: El tumor sigue siendo inferior a 2 cm con diseminación axilar (Fig. 7).
  - Estadio IIA: el nódulo es menor a 2 cm y presenta diseminación a ganglios linfáticos de la axila.
  - Estadio IIB: Nódulo mayor a 2 cm, sin sobre pasar los 5 cm, con un 50 % de probabilidades de haberse diseminado a ganglios linfáticos axilares.

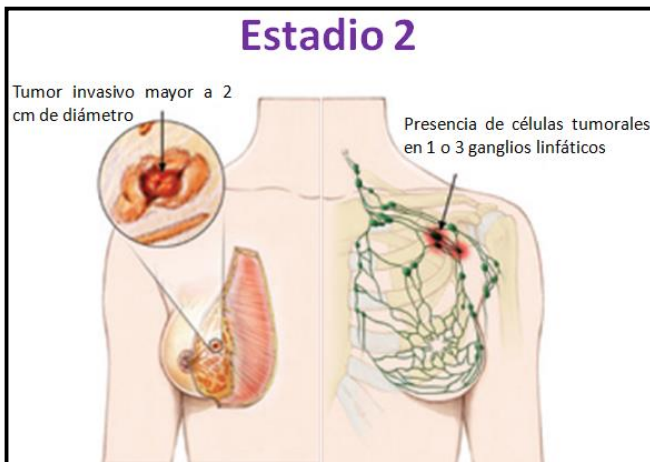


Fig. 7- Etapa 2 del desarrollo del cáncer de mama. Modificado de American Society of Clinical Oncology, 2011.

- ❖ Estadio 3: Tumoración menor a 5 cm, pero con extensión a las axilas (Fig. 8).
  - Estadio IIIA: el tumor de mama es menor a 5 cm de diámetro, y el cáncer se ha diseminado a ganglios linfáticos de la axila, ya sea detrás del esternón o bien, no diseminado a ganglios linfáticos axilares.
  - Estadio IIIB: tumoración de cualquier tamaño, con diseminación a la pared torácica, el pecho puede estar hinchado o la piel de la mama puede presentar grumos. El cáncer puede haberse diseminado a los ganglios linfáticos de la axila o detrás del esternón.
  - Estadio IIIC: nódulo de cualquier tamaño y diseminado a ganglios linfáticos detrás del esternón y axila o encima y debajo de la clavícula.

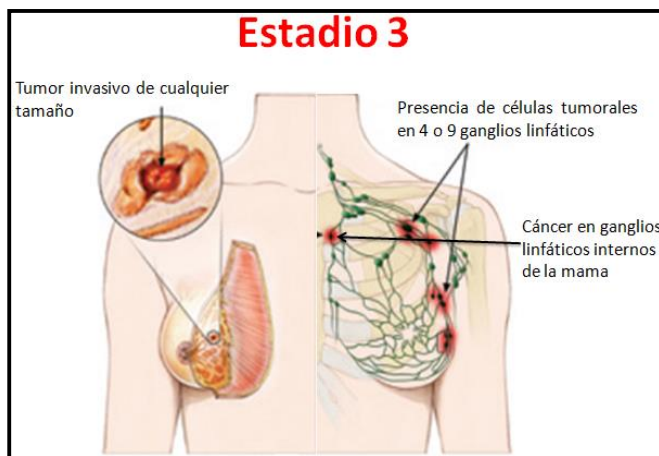


Fig. 8- Etapa 3 del desarrollo del cáncer de mama. Modificado de American Society of Clinical Oncology, 2011.

- ❖ Estadio 4: diseminación de células cancerosas a otros tejidos y órganos del cuerpo, proliferando en alguno de ellos (Fig. 9).

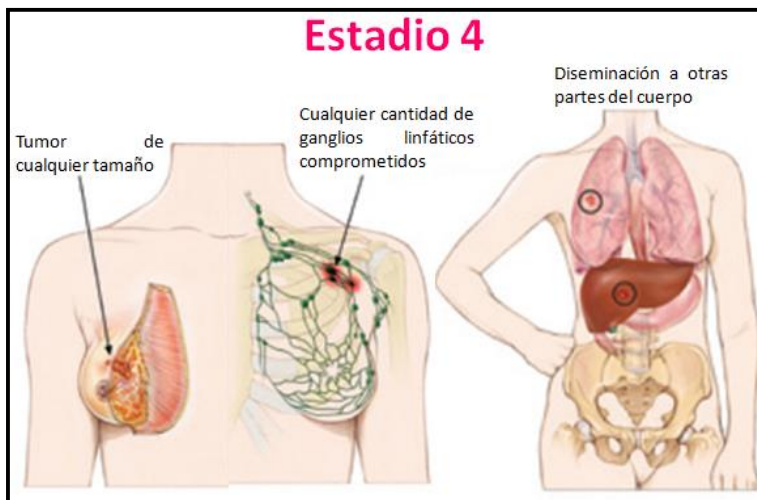


Fig. 9- Etapa 4 del desarrollo del cáncer de mama. Modificado de American Society of Clinical Oncology, 2011.

### 🌀 2.1.4. Signos y Síntomas del Cáncer de Mama

El cáncer de mama es considerado un síndrome que comienza de forma localizada, que en la mayoría de los casos se manifiesta por la aparición de una tumoración que es indolora, dura y con bordes irregulares. Esta tumoración va a estar relacionada con las siguientes características: consistencia firme, aspecto sólido, bordes irregulares, escaso desplazamiento sobre la piel, unilateral, sin dolor y la presencia de adenopatías axilares (Moreno, 2009).

Además de la presencia del tumor, los síntomas principalmente reportados son la umbilicación o desviación del pezón, piel de naranja o retracción de la misma, enrojecimiento, ulceración o edema, salida espontánea de secreción sanguínea por el pezón, aumento de la red venosa superficial, protuberancias o masas en las axilas que son indoloras, hinchazón de la totalidad o parte de la mama, irritación de la piel o formación de hoyuelos, dolor de la mama, descamación o engrosamiento del pezón o la piel de la mama (Fig. 10) (Moreno, 2009 y American Cancer Society, 2013).



Fig. 10- Síntomas frecuentes del cáncer de mama. Tomado de <http://noticiasfree.com/cada-29-segundos-un-nuevo-caso-de-cancer-de-mama-se-diagnostica-465-mil-muertes-anuales/>

### 🌀 2.1.5. Factores de Riesgo

Un factor de riesgo se define como cualquier elemento que incrementa las posibilidades de contraer una enfermedad. Para el caso del cáncer de mama los que han sido reportados con mayor frecuencia son (Tabla 1):

- ❖ Factores Hormonales: debido a que el cáncer de mama es un tumor hormonodependiente, cualquier factor que incremente la exposición a estrógenos como:
  - Edad: la probabilidad de desarrollar cáncer de mama incrementa a medida que la mujer envejece, donde la edad promedio de aparición es de 54 años, mientras que el 45 % de los casos aparecen después de los 65 años.
  - Menarquía Temprana: las mujeres que empezaron a tener periodos menstruales antes de los 12 años o después de los 14 años, incrementan ligeramente el riesgo de desarrollar la enfermedad.
  - Menopausia después de los 52 años: las mujeres que presentan menopausia tardía adquieren un riesgo doble de padecer la enfermedad, debido al tiempo de exposición a los estrógenos y progestágenos.
  - Nuliparidad: el no tener hijos, aumenta el riesgo después de los 50 años.
  - Primera gestación tardía: las mujeres que tienen su primer embarazo entre los 30-35 años o tener un menor número de embarazos tienen un riesgo 5 veces mayor de desarrollar cáncer de mama. Esto está relacionado con el tiempo de exposición a los cambios hormonales, ya que al embarazo se le atribuye un efecto protector cuando la primera gestación ocurre en una época temprana disminuyendo de dos a tres veces el riesgo de padecer cáncer mamario.
  - Uso de anticonceptivos orales: aumenta ligeramente el riesgo, ya que se ha reportado que 5 de cada 100 000 mujeres que usan anticonceptivos antes de los 20 años, han desarrollado cáncer de mama.
  - Terapia hormonal con estrógenos y/o progesterona: el uso prolongado aumenta ligeramente el riesgo, presentándose en 7-8 casos por cada 10 000 mujeres.
  - Tejido denso mamario: el presentar tejido denso del seno significa que hay más tejido glandular y menos tejido graso, por lo que estas mujeres presentan un mayor riesgo de cáncer de mama.
- ❖ Enfermedad mamaria previa: presentar cambios fibroquísticos y lesiones benignas como: fibroadenoma complejo, hiperplasia moderada florida (con atipia o sin atipia, adenosis esclerosante y papiloma). Así como hiperplasia ductal o lobulillar atípica, aumenta el riesgo de 4 a 5 veces y 10 veces si existe antecedente familiar de cáncer.
- ❖ Antecedente de carcinoma de endometrio.

- ❖ Factores genéticos, como:
  - Antecedente familiar de cáncer de mama: cuando la paciente presenta un familiar de primer grado que haya padecido cáncer de mama el riesgo aumenta de 2 a 4 veces, además de que el 60 % de los cánceres mamarios familiares se presentan antes de la menopausia.
  - Ser portador del gen BRCA1: la mutación en este gen se ha identificado entre el 15 y 20 % de las mujeres con cáncer de mama heredado, incrementando el riesgo de padecer la enfermedad en un 60 a 80 %.
  - Ser portador del gen BRCA2: las mutaciones en este gen son la causa del 35 % de los casos de cáncer de mama familiar. La mutación en este gen aumenta en un 60 a 85 % el riesgo de desarrollar la enfermedad.  
La relación específica de estos genes con el cáncer de mama, es debido a que durante el metabolismo estrogénico se generan especies reactivas que pueden dañar al ADN.
  - TP53: las mutaciones en este gen son por sustituciones, apareciendo en el 40 % de los casos de cáncer de mama.
- ❖ PTEN: se encuentra asociada a la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR, en donde se puede perder la función de PTEN, presentándose en el 28 % de pacientes con cáncer de mama.
- ❖ Presencia de la proteína Her-2-neu: se trata de un receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano que está sobre expresado en 25 a 30 % de las pacientes con cáncer de mama, que puede modificar la activación de varias vías de señalización, como la vía de PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B (Elias *et al*, 2008; Secretaría de Salud, 2002; American Cancer Society, 2013; BioCáncer, 2010; Vidal Millán, 2008).

**Tabla 1- Magnitud de los Factores de Riesgo conocidos para el cáncer de mama**

Riesgo Relativo Leve <2	Riesgo Relativo Moderado 2-4	Riesgo Relativo Alto >4
Menarquia Precoz	1 familiar de primer grado con cáncer de mama	2 familiares de primer grado con cáncer de mama
Menopausia Tardía	Exposición a radiación	Mutación genética
Nuliparidad	Antecedente personal de cáncer de mama	Portadora de carcinoma lobulillar in situ
Primer embarazo después de los 35 años	Mama densa	Portadora de carcinoma ductal in situ
Terapia hormonal de reemplazo		Portadora de hiperplasia con células atípicas
Obesidad		
Consumo de alcohol		
Portadora de enfermedad proliferativa de la mama		

## 🔗 2.1.6. Tratamientos para el Cáncer de Mama

El cáncer de mama requiere un tratamiento multidisciplinario que dependerá del tamaño y ubicación del tumor y si se ha diseminado. Dividida en:

- ❖ Terapia Locorregional: dirigida a eliminar cualquier tumor visible, por medio de:
  - Cirugía Conservadora
  - Cirugía No Conservadora
- ❖ Terapia Sistémica: consiste en el control y tratamiento de la enfermedad, reduciendo el riesgo de reincidencia y la eliminación de células cancerosas que pudieran persistir. Este tipo de terapia se puede dividir en:
  - Neoadyuvante: terapia que se administra de forma preoperatoria, adecuada para mujeres con tumores en estadios IIA y IIB que reúnen criterios para realizar cirugía conservadora.
  - Adyuvante: administración de terapia sistémica después de la cirugía primaria, con el objetivo de eliminar la posible existencia de enfermedad residual y disminución del riesgo de reincidencia local o diseminación a distancia.

Dentro de la terapia sistémica se encuentran:

- Radioterapia: tiene como objetivo la eliminación de células tumorales por medio de la energía liberada en forma de partículas u ondas. Es utilizada como terapia neoadyuvante facilitando la cirugía conservadora en tumores operables, pero de gran tamaño; y como terapia adyuvante post mastectomía cuando existe riesgo elevado de recidiva locoregional, post cirugía conservadora y cuando los ganglios axilares están comprometidos, reduciendo en un 30 % el riesgo de recurrencia.
- Quimioterapia: los fármacos utilizados destruyen a las células que se dividen rápidamente provocando la enfermedad. Es indicada para el tratamiento de tumores menores a 2 cm, ganglios axilares comprometidos y como terapia neoadyuvante para reducir el tamaño tumoral, permitiendo la cirugía conservadora. Reduce la posibilidad de muerte anual en mujeres premenopáusicas del 25 al 35 % y posmenopáusicas de 9 a 19 %, siendo los más utilizados: capecitabina, doxorubicina, gemcitabina, etc.
- Hormonoterapia: se basa en la intensa hormonodependencia de las células que conforman el tumor, y se dividen en:

- Tratamientos Competitivos:
  - Antiestrógenos: actúan como antagonistas de los receptores de estrógenos, produciendo un efecto citostático en las células neoplásicas. Uno de los más utilizados es el Tamoxifeno, reduciendo la posibilidad de muerte en un 25 %, sin embargo incrementa el riesgo de cáncer de endometrio.
  - Progestágenos: ejercen un efecto antiproliferativo sobre los tumores con receptores de progesterona positivos, debido a que regulan la activación de los receptores de estrógenos.
- Tratamientos Inhibidores de aromatasa: bloquean la acción de la aromatasa para convertir los andrógenos en estrógenos y se dividen en:
  - Tipo I: derivados esteroideos de la androstendiona.
  - Tipo II: inhibidores no esteroideos.
- ❖ Terapia Biológica: generación de anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de la proteína HER2, debido a que el 25 % de los tumores mamarios sobreexpresan el gen HER2/neu (Moreno, 2009; Elias *et al*, 2008; Sánchez, 2008 y Beltrán, 2010).

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



## 2.2. *Ruta graveolens* L.

El género *Ruta* comprende alrededor de 60 especies de dicotiledóneas; etimológicamente *Ruta* deriva del griego ruomai, que significa salvar, liberar o proteger (Álvarez *et al* 2006; [http://www.julia.ad/img/nwl/feb12/ruta\\_cast.pdf](http://www.julia.ad/img/nwl/feb12/ruta_cast.pdf)).

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

### 2.2.1. Clasificación Científica

- Reino:** Plantae
- División:** Magnoliophyta
- Clase:** Magnoliopsida
- Orden:** Sapindales
- Familia:** Rutaceae
- Subfamilia:** Rutoideae
- Género:** *Ruta*
- Especie:** *Ruta graveolens* L.



Fig. 11- Morfología de *Ruta graveolens*.

### 2.2.2. Descripción Fisiológica y Morfológica

La Ruda es una planta sub-arbustiva con un tallo que puede volverse leñoso, aromática y perenne perteneciente a la familia de las Rutáceas. Alcanza una altura de entre 70 a 100 cm, su tallo ramoso y erecto con hojas alternas; verde azuladas, profundamente subdivididas, con segmentos espatulados u oblongos de 15 mm de largo, contiene glándulas translúcidas con aceite esencial responsable de su olor característico. Las flores, terminales y amarillentas que presentan entre cuatro y cinco pétalos, se agrupan en umbelas, haciendo su aparición entre la primavera y el verano. Los frutos son capsulas redondeadas con cinco lóbulos (Hernández, 2011 e Instituto Salud Publica de Chile, 2005).

Dentro de las características microscópicas, ambas epidermis contienen estomas, pero la superior contiene pocos, y la mayor parte se encuentra en la base de los segmentos foliares. Las células de la epidermis superior son de contorno ligeramente ondulado o rectilíneo, y las de la cara inferior muy sinuosas. El mesófilo está formado por dos capas en empalizada, de células bastante anchas y cortas, y de parénquima esponjoso, cuya capa inferior se aproxima nuevamente a la forma empalizada. En el mesófilo se encuentran esparcidas drusas de oxalato. Se observan numerosos y grandes depósitos de esquizolisígenos de esencia que llegan hasta la epidermis. Las cuatro células epidérmicas que las cubren tienen generalmente forma rómbica y están hundidas por debajo del nivel de las demás (Instituto Salud Pública de Chile, 2005).

### 🌀 2.2.3. Propiedades Medicinales

La ruda es una planta con muchos usos etnobotánicos, al presentar propiedades curativas como antiespasmódica, antihelmíntica antimicrobiana, promueve la menstruación, oftálmica y rubefaciente (enrojecimiento de la piel). Aplicada en infusión, gracias a la acción de la rutina, tiene una acción fortalecedora de los capilares sanguíneos, regula los ciclos menstruales y reduce las hemorragias; restringe el vientre; alivia los retortijones del vientre, dolor de costado y pecho, la tos, inflamaciones pulmonares, la ciática, dolores articulares. Presenta propiedades curativas para trastornos circulatorios, arterioesclerosis, neuralgias, cefaleas, nerviosismo, histeria, debilidad visual, fiebre, reumatismo, inflamaciones, espasmos y trastornos de la diuresis; refuerza las membranas que rodean a los huesos. Muchas de sus propiedades medicinales ponen de manifiesto que existe cierta actividad antiinflamatoria (Raghav *et al*, 2006).

### 🌀 2.2.4. Principios Activos

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

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

- a) Los glucósidos, como la rutina.
- b) Alcaloides (quinilonas): coquisagenine y skimmianine graveoline
- c) Furocoumarinas (psoralenos): bergaptene (3-metoxipsoraleno) y xantotoxina (8-metoxippsoraleno)

- d) Aceites esenciales: metil-nonil-cetona, metil-n-octil-cetona y heptil-metilcetona
- e) Alcoholes: metil-etil-carbinol-pineno y Limenenes
- f) Otros compuestos: dictamina, gammafagarina, pteleina y kokusagina.

Los principios activos de importancia clínica son los psoralenos, responsables de la hepatotoxicidad y la fotosensibilización, y metil-nonil-cetona que tiene efectos sobre el útero (Benavides *et al*, 2000).

### 🌀 2.2.5. Efecto Antitumoral de la planta

En el cáncer, la ruda se ha llegado a utilizar por sus efectos:

- Como agente preventivo contra el Cáncer.
- Usada como agente quimioterapéutico.
- Empleada como agente antineoplásico.
- Uso potencial como clastogénico.

Estos efectos se sustentan en la siguiente evidencia:

- Estudios en ratones albinos adultos han demostrado que la ruda proporciona un efecto protector contra daños clastogénicos inducidos por radiación X. La Ruta 6 en combinación con fosfato de calcio ha demostrado contener un potente efecto antitumoral en pacientes con cáncer de cerebro, protegen a los linfocitos B de peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y muestra efectos mitogénicos en linfocitos normales de sangre periférica, previniendo la mutagénesis (Pathak *et al*, 2003).
- El extracto hidroetanólico muestra actividad antiinflamatoria frente a inflamaciones crónicas, hecho relacionado con un efecto antiproliferativo (Vanaclocha, 2003).
- Recientemente se ha descrito que el uso de la ruda presenta un efecto protector contra el daño a las cadenas de ADN impidiendo la mutagénesis, además de inducir la remoción de un grupo amida de la proteína antiapoptótica Bcl-xL en células de cáncer cerebral humano aumentando la sensibilidad de las células cancerígenas a señales de muerte, sin afectar a las células normales (Ríos, 2015).

Por otra parte varios de los efectos que presenta la *Ruta graveolens* en células tumorales se han asociado a la presencia de proteínas en la planta, en particular con las lectinas vegetales (Hernández, 2011; Flores, 2012; Necib *et al*, 2015).

## 2.3. Lectinas Vegetales

---

El término lectina fue propuesto por Boyd y Sharpleigh en 1954, derivada del latín *legere* (seleccionado, escogido) refiriéndose a su capacidad de unión selectiva de azúcares. Hoy en día este término se adjudica a proteínas de origen no inmune que no presentan actividad enzimática, que tienen la capacidad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos libres o glicanos presentes en glicoproteínas y glicolípidos, sin alterar la estructura del carbohidrato (Castillo y Abdullaev, 2005 y Liang *et al*, 2014).

A nivel celular las lectinas son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso como preproteínas, las cuales son procesadas para la eliminación del péptido señal, la escisión proteolítica del péptido C-terminal y la adición de oligosacáridos a la cadena polipeptídica en los residuos de asparagina, lo que puede generar dos protómeros de un dominio (presentan una masa de 11-14 kDa que originan un monómero) o dos dominios (que pueden presentar un peso de 30 kDa que originan dos monómeros con masas idénticas o similares), que se pueden combinar para formar homo/hetero-dímeros o tetrámeros; y son transportadas para su acumulación en vacuolas o cuerpos proteicos (Rincón, 2014; Pereira *et al*, 2015; De HoV *et al*, 2009).

Estas proteínas están presentes en todos los organismos vivos y en plantas se han detectado principalmente en los cotiledones y endospermo, constituyendo del 2 al 10 % del total de las proteínas; además de estar presentes en órganos de reserva como tubérculos, bulbos y rizomas, en donde tienen un papel como proteínas de defensa al actuar como insecticida, anti-hongos, anti-microbiana, entre otras (Hernández, 1999; Kabir *et al*, 2011). También las lectinas vegetales se originan en los órganos vegetativos como raíces, hojas, tallos, cortezas, flores, frutos, savia del floema, látex y néctar; se ha encontrado que las lectinas presentes en órganos vegetativos pueden tener estructuras diferentes o presentar isoformas altamente conservadas en la secuencia de aminoácidos, dando como resultado actividades biológicas y propiedades químicas análogas (Ingale y Hivrale, 2013; De HoV *et al*, 2009; Agrawal *et al*, 2011; Rameshwaram y Nadimpalli, 2008; Carreñon, 2013).

Tienen diversas funciones como: participar en las interacciones entre las bacterias fijadoras de nitrógeno con la raíz, presentan actividad mitogénica, efecto protector contra la acción patogénica de microorganismos, entre otros (Hernández, 2005; Lannoo *et al*, 2014). Recientemente se ha sugerido que las lectinas presentes en las plantas pueden contener o transportar carbohidratos como sacarosa, fructosa,

glucosa y oligosacáridos que pueden participar en la fotosíntesis, que son generalmente aceptados para participar en el metabolismo energético y crecimiento de la planta, además de actuar como moléculas señal en los programas de desarrollo de la planta ya que también se ha encontrado una comunicación con hormonas vegetales (Ruan, 2014; Lannoo *et al*, 2014; Van den Eden, 2014; Ingale y Hivrale, 2013; Rameshwaram y Nadimpalli, 2008).

Se han podido establecer relaciones filogenéticas a partir de la estructura de las proteínas tipo lectina presentes en las diferentes clases taxonómicas de las plantas, lo cual se ha dado por mutaciones de los aminoácidos presentes en el dominio de unión a carbohidratos (Fig. 12). Por otra parte también la glicosilación genera un espectro filogenético, con un total de 13 monosacáridos y 8 aminoácidos que forman por lo menos 41 tipos de enlaces glicosídicos (Nagasuma *et al*, 2006; Bo *et al*, 2010; Gabius *et al*, 2011).

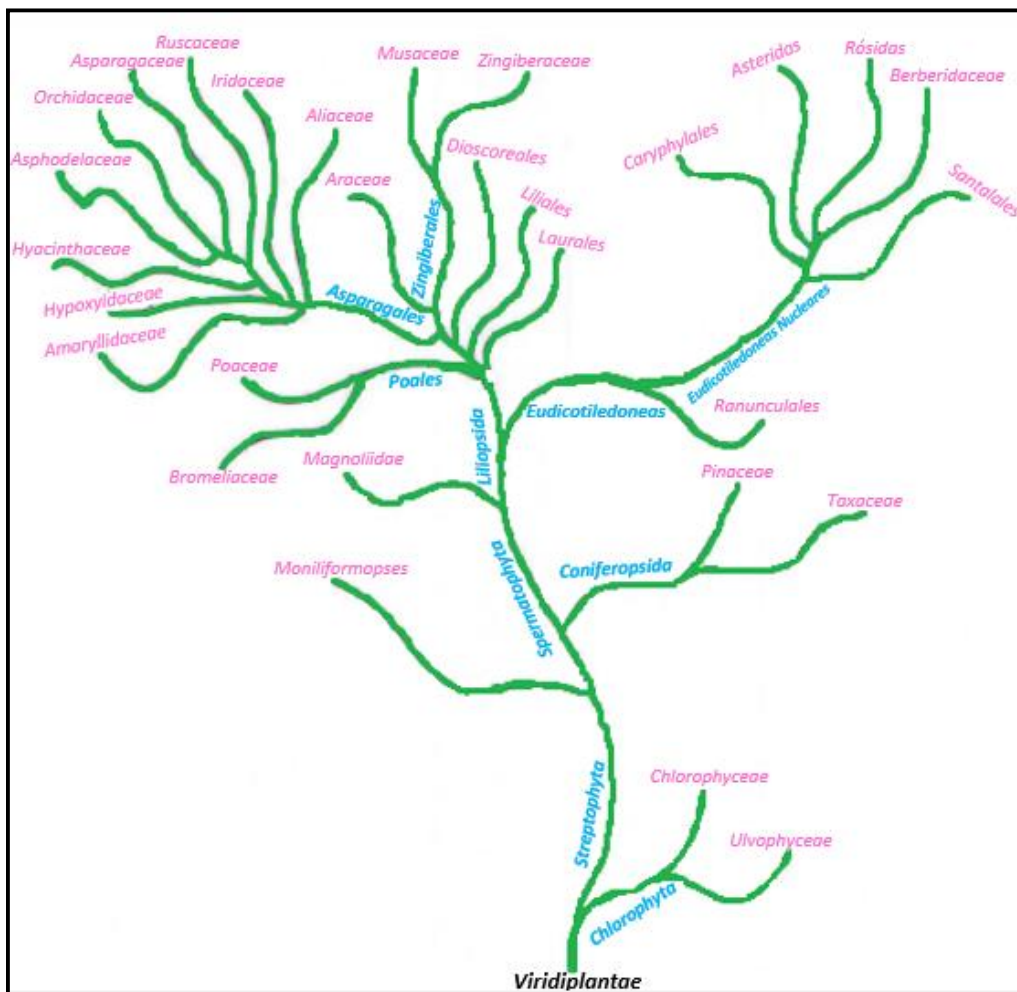


Fig. 12- Distribución Taxonómica de lectinas vegetales presente en diferentes familias. Modificado de Nagasuma *et al*, 2006.

### 🌀 2.3.1. Estructura de Lectinas Vegetales

Las lectinas vegetales poseen una estructura conformada por una cadena polipeptídica en la cual pueden estar unidos de 1 a 15 monosacáridos residuales constituidos por 2 o más azúcares como: D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido salicílico, glucosamina y galactosamina (López, 2013). Se ha determinado que presentan un alto contenido de ácido glutámico/glutamina, ácido aspártico, asparagina, glicina y bajo contenido de lisina (Vázquez *et al*, 2012). Ingale y Hivrale (2013) reportan que la asparagina y el ácido aspártico se encuentran ampliamente conservadas en la estructura de las lectinas vegetales, ya que desempeñan un papel importante en el reconocimiento de carbohidratos y participan en la formación de puentes de hidrógeno con el azúcar. Dentro de la estructura se presentan al menos dos sitios de unión, que permiten su enlace en primer lugar a un azúcar simple o complejo de manera específica y en forma secundaria a una molécula glicosilada (Vázquez *et al*, 2012; Hernández, 1999; Hernández, 2005; Pereira *et al*, 2015) (Fig. 13).

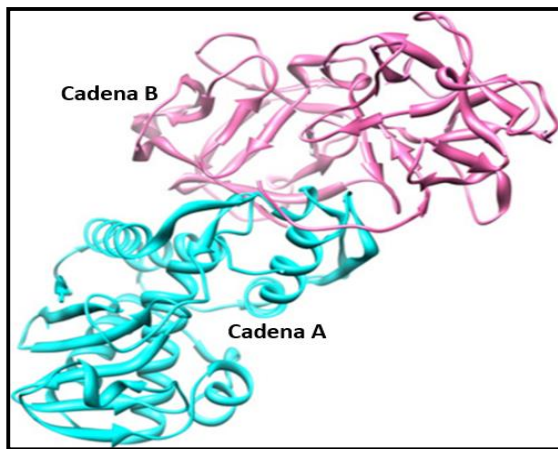


Fig. 13- Estructura de lectinas de muérdago. Modificado de Fu *et al*. 2011.

Dentro de la unidad polipeptídica las interacciones hidrofóbicas son importantes ya que permiten la estabilidad de la estructura nativa; además cada subunidad que compone a una lectina puede contener uno o varios sitios de enlace a carbohidratos, permitiendo el reconocimiento de dos hasta diez carbohidratos diferentes al ser polivalentes, presentando más de dos sitios de unión lo que les permite ejercer diferentes actividades biológicas (Vázquez *et al*, 2012; Ingale y Hivrale, 2013; Adenike y Babalola, 2004).

Algunos estudios han determinado que la mayoría de las lectinas de origen vegetal presentan una configuración compacta de hojas  $\beta$  en barril, sin la presencia de  $\alpha$  hélices y dominadas por dos hojas antiparalelas. Además, se presenta un pliegue polipeptídico común conocido como el motivo “13-sandwich” o “jelly roll”, que consta



de tres conjuntos de hojas  $\beta$  antiparalelas conectadas por bucles de diverso tamaño (Biswas y Chattopadhyaya, 2014).

De la misma forma el sitio de unión a carbohidrato involucra una combinación de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals; así como la estructura cuaternaria también contribuye al reconocimiento del glicano (Vázquez *et al*, 2012; Ingale y Hivrale, 2013). En su mayoría, la estructura cuaternaria de las lectinas consiste en subunidades que pueden variar en peso molecular, dispuestas en dímeros o tetrámeros y compartir propiedades bioquímicas similares (Agrawal *et al*, 2011)

Para la elección de las células que van a aglutinar requieren (Hernández, 1999):

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

Lo anterior, está relacionado a que las lectinas reconocen principalmente un carbohidrato o secuencias de carbohidratos específicos que se encuentran en la membrana celular, permitiendo la formación de complejos entre la lectina y glicoconjugados de superficie o de la matriz; mientras que otras unidades de carbohidratos presentes en la membrana celular son los responsables de la transmisión del mensaje y de la activación de segundos mensajeros (Vázquez *et al*, 2012; Ingale y Hivrale, 2013).

Kenmochi *et al* (2015) reporta que además del sitio de unión a carbohidratos, algunas lectinas de leguminosas presentan uno o más sitios de unión a ligandos hidrófobos tales como adenina y hormonas vegetales.

### ❖ 2.3.1.1. Dominio de Reconocimiento a Carbohidratos

Se ha propuesto que las lectinas reconocen azúcares en forma piránica, por medio de la interacción con la configuración de los grupos hidroxilo de los carbonos 3 y 4, permitiendo su clasificación en grupos del 1 al 4 de acuerdo a la posición del grupo hidroxilo (Fig. 14) (Hernández, 1998; Hernández *et al*, 2005).

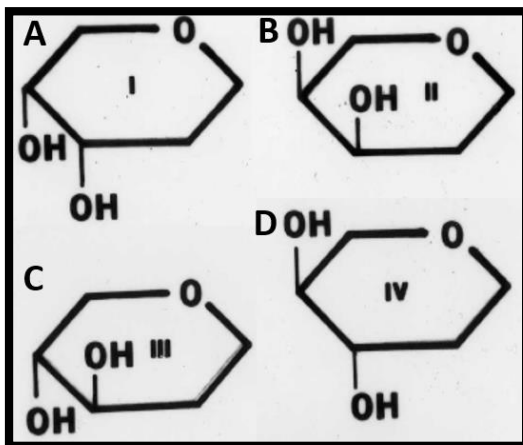


Fig. 14- Monosacáridos reconocidos por lectinas vegetales, mostrando conformaciones en los carbonos 3 y 4. Monosacáridos de A, C y D corresponden a lectinas que interaccionan con fucosa. Monosacáridos del grupo B, corresponden a lectinas que interaccionan con galactosa. Modificado de Hernández *et al*, 2005.

Además del reconocimiento estructural del monosacárido, las lectinas presentan afinidad por estructuras oligosacáridicas, siendo que este reconocimiento puede ser en posición terminal o intermedio (Fig. 15), por lo que este reconocimiento se da por la conformación de los carbohidratos y la estructura tridimensional de la lectina (Hernández, 1998).

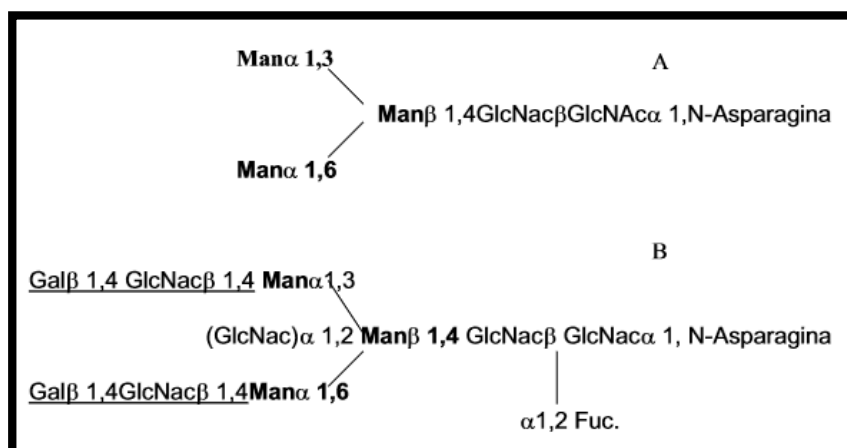


Fig. 15- N-glicanos reconocidos por las lectinas de Con A y LCA. A) En negrita se observa el núcleo trimanosídico reconocido por la lectina de Con A. B) Subrayado se observan las sustituciones lactosamínicas en el núcleo trimanosídico que interfieren con el reconocimiento de la lectinas de Con A, pero que no afecta la interacción de la lectina de LCA con estas estructuras. Tomado de Hernández *et al*, 2005

La interacción proteína-carbohidrato se da gracias a que en la estructura de la lectina se presenta el sitio de unión a Carbohidratos o CRD por sus siglas en inglés (Carbohydrate Recognition Domain) formado por aproximadamente 200 aminoácidos (Hernández, 1998), que puede ser dividido en el sitio de unión a monosacáridos ubicado en la superficie de la lectina y el sitio de unión a oligosacáridos que comprende una serie de residuos adyacentes al lado del sitio de unión a monosacárido (Hernández *et al*, 2005; De HoV *et al*, 2009; Kenmochi *et al*, 2015). Este dominio de reconocimiento a carbohidratos puede distinguir la variación en la longitud de la columna vertebral de carbono del monómero, así como su anomericidad  $\alpha$  o  $\beta$ , orientación y sustitución del grupo lateral (De HoV *et al*, 2009).

Los CRDs están formados por aminoácidos altamente conservados en todas las lectinas, ya que son críticos para la coordinación con los iones metálicos, la formación de los bolsillos hidrofóbicos y la unión a carbohidratos. La formación de estos bolsillos hidrofóbicos permite a estas proteínas la unión con monómeros u oligómeros de azúcar a través de interacciones con la cadena principal, además de pequeñas moléculas como auxina o citocinas (De HoV *et al*, 2009; Gabius *et al*, 2011).



Este CRD, se dice que esta preformado, ya que pocos cambios conformacionales ocurren tras la unión. Lo anterior está relacionado a que, en muchas de las lectinas, independientemente de la especificidad, se presentan cuatro residuos de aminoácidos invariantes que participan en la unión al carbohidrato: un ácido aspártico, una asparagina, una glicina y un aminoácido aromático o leucina. Por lo tanto, mientras que los aminoácidos altamente conservados proporcionan el marco requerido para la unión, la especificidad probablemente surge de la variabilidad de los residuos de aminoácidos ubicados en otras regiones del bolsillo hidrofóbico. Esto provoca, que el CRD este dividido en cuatro bucles, donde el ácido aspártico invariante y glicina pertenecen a los bucles A y B, respectivamente; en tanto la asparagina y el residuo hidrofóbico están en el bucle C, mientras otras interacciones se proporcionan por aminoácidos presentes en el bucle D, lo que sugiere una correlación entre este bucle y la especificidad al carbohidrato que está relacionada con la variabilidad en términos de longitud, secuencia y conformación, un ejemplo de estos son las lectinas con especificidad a manosa que presentan un bucle D idéntico (Ambrosi *et al*, 2005) (Fig. 16 ).

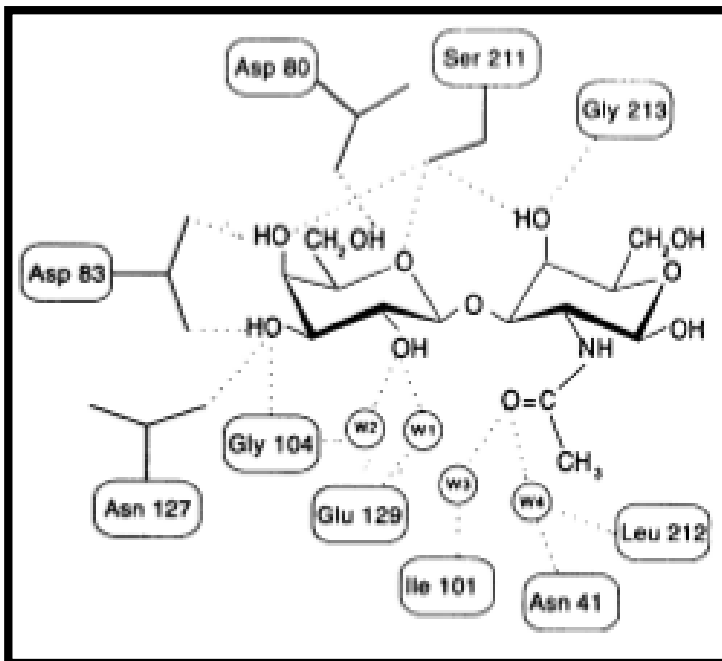


Fig. 16- Representación esquemática de las interacciones proteína-carbohidrato en el complejo PNA-T. Tomado de Ambrosi *et al*, 2005.

Pruebas experimentales ponen de manifiesto la unión de iones metálicos para la actividad de las lectinas, esto debido a que la interacción con los carbohidratos requiere la unión de iones como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  u otro ion de metal de transición. Los cuales se encuentran ubicados cerca del sitio de unión a carbohidratos y están colocados de forma idéntica, teniendo como principal función el mantenimiento de la integridad de las subunidades y mediando el posicionamiento de residuos de

aminoácidos para la unión con los carbohidratos (Adenike y Babalola, 2004). Se ha demostrado que los residuos de ácido aspártico y asparagina invariantes participan en coordinación con  $\text{Ca}^{2+}$  (Ambrosi *et al*, 2005; Gabius *et al*, 2011).

En la unión proteína-carbohidrato, como se mencionó anteriormente, participan Fuerzas de Van der Waals, que se establecen por la disposición estérica de los grupos hidroxilo de los carbohidratos, específicamente de los carbonos-6, -4 y -3 (Biswas *et al*, 2009), creando parches hidrofóbicos sobre la superficie del azúcar, permitiendo la interacción con regiones hidrofóbicas del CRD. Contrario a lo que ocurre con las moléculas de agua, que también median los contactos carbohidrato-proteína, ya que actúan como un “mortero” molecular por su capacidad de donar o aceptar hidrógenos, dando una extensión de la superficie de la proteína (Ambrosi *et al*, 2005; Gabius *et al*, 2011).

### 🌀 2.3.2. Clasificación de Lectinas Vegetales

De acuerdo con las estructuras generales, las lectinas de plantas maduras se subdividen en (Tabla 2) (Fig. 17) (Bo *et al*, 2010; Ferriz *et al*, 2010; Carreño, 2013):

Tabla 2- Clasificación de Lectinas Vegetales según su estado de maduración	
Tipo de Lectina	Definición
Merolectina	Presentan un solo dominio de unión a hidratos de carbono, por lo que son monovalentes y por lo tanto no puede precipitar en glicoconjugados o aglutinar células.
Hololectina	Contienen al menos dos dominios de unión a carbohidratos, que son di o polivalentes y por lo tanto pueden aglutinar células y/o precipitar glicoconjugados.
Chimerolectina	Son proteínas de fusión que consisten en uno o más dominios de unión a carbohidratos y un dominio enzimático bien definido u otra actividad biológica, que actúa independientemente entre el dominio de unión a carbohidratos. Dependiendo del número de sitios de unión a carbohidratos, las chimerolectinas se comportan como merolectinas u hololectinas
Superlectina	Constan de al menos dos dominios de unión a carbohidratos que reconocen azúcares no relacionados estructuralmente. También pueden ser consideradas como un grupo especial de chimerolectinas.

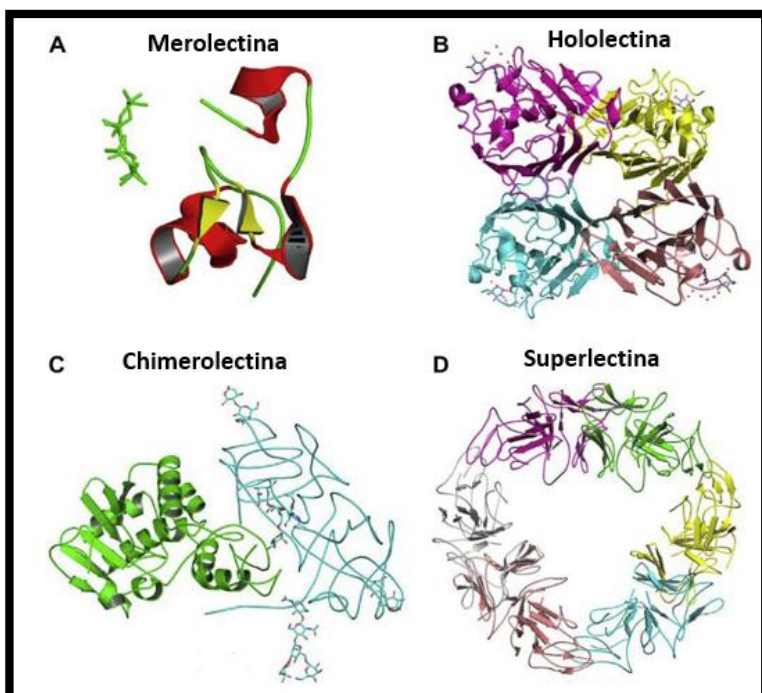


Fig. 17 Representación esquemática de A) Merolectinas (Heveína). B) Hololectinas (Con A). C) Chimerolectinas (ricina). D) Superlectinas (TXCL-1)

Estructuralmente, las lectinas vegetales van a presentar características comunes que permiten agruparlas en familias, generando así diferentes formas de clasificarlas: por la especificidad hacia el monosacárido que inhibe su actividad hemaglutinante y hacia estructuras oligosacáridicas que reconocen, otra a partir de su estructura molecular y una a partir por su especificidad de unión a carbohidratos.

La clasificación establecida a partir de la especificidad hacia el monosacárido (Tabla 3) que inhibe su actividad hemaglutinante y hacia las estructuras de oligosacáridos que reconocen las dividen en N-glicanos (oligosacáridos unidos de forma covalente a un residuo de asparagina dentro de una secuencia consenso: Asn-X-Ser/Thr que tiene unida una N-acetil-glucosamina) y lectinas que reconocen a los O-glicanos (oligosacáridos unidos covalentemente a un residuo serina o treonina que tienen unida una N-acetil-galactosamina) (Hernández, 2005; Jiménez *et al*, 2002).

Tabla 3- Clasificación de Lectinas Vegetales según su especificidad a Monosacáridos		
Monosacárido	Lectina	Abreviatura
A-D-manosa, $\alpha$ -D-glucosa	<i>Canavalia ensiformis</i> <i>Lens culinaris</i>	ConA LCA
$\beta$ -galactosa, N-acetil- $\alpha$ -D-galactosamina	<i>Ricinus communis</i> <i>Glycine max</i> <i>Arachis hipogea</i> <i>Amaranthus leucocarpus</i>	RCA SBA PNA ALL
N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina	<i>Triticum vulgare</i>	WAG
$\alpha$ -D-fucosa	<i>Lotus tetragonolobus</i> <i>Ulex europeus</i>	LTA UEA
A-N-acetilneuramínico	<i>Limulus polyphemus</i>	LPA

La clasificación establecida con base en su estructura molecular distingue seis familias (Fig. 18):

- 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 subunidades contiene un sitio de unión para iones metálicos  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Una subunidad contienen aproximadamente 250 aminoácidos y presenta una gran homología con las otras subunidades. Está constituida por doce hojas  $\beta$  antiparalelas conectadas entre sí mediante bucles, lo que genera una estructura aplanada en forma de domo, cuatro bucles localizados en la parte superior del monómero forman el sitio de reconocimiento a carbohidratos.
- 2. Lectinas con dominios tipo heveína o específicas de quitina.** Los miembros de esta familia generalmente presentan dos subunidades idénticas, ricas en cisteína. Una subunidad está constituida por cuatro dominios tipo heveína, conteniendo cuatro puentes disulfuro lo cual origina que no existan estructuras secundarias regulares a excepción de una pequeña  $\alpha$  hélice de cinco residuos, cada dominio presenta un sitio de reconocimiento a carbohidrato que no necesita la presencia de iones metálicos.
- 3. Lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa.** Presentan secuencias de aminoácidos altamente conservadas. Estas son tetraméricas, cada monómero tiene un peso molecular de 12 kDa, así como una secuencia de 36 aminoácidos repetida tres veces. El sitio de reconocimiento a carbohidrato está constituido por cuatro hojas  $\beta$  antiparalelas unidas entre sí por giros. El conjunto se asocia de manera que forma una corona aplanada dejando aparecer un gran túnel central.
- 4. Lectinas en forma de prisma  $\beta$  o del tipo jacalina.** Presentan estructuras tridimensionales, tetraméricas glicosiladas, donde cada subunidad contiene una cadena pesada ( $\alpha$ ) y una cadena ligera ( $\beta$ ), y está constituida por tres hojas  $\beta$  antiparalelas arregladas a manera de un prisma triangular.
- 5. Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas.** Constituidas por dos cadenas A y B, las cuales son diferentes y se encuentran unidas por dos puentes disulfuro. La cadena A es la responsable de la toxicidad, mientras que la cadena B tiene la actividad de lectina, está constituida por dos dominios que presentan cuatro subunidades, las cuales contienen  $\alpha$  hélices y hojas  $\beta$ .
- 6. Lectinas tipo amaranto.** Cada proteína se encuentra formada por dos monómeros en los que existen dos dominios N y C, unidos por una pequeña hélice, cada dominio muestra una conformación de trébol  $\beta$  (Hernández, 2005; Rudiger y Rouge, 1998; De HoV *et al*, 2009).

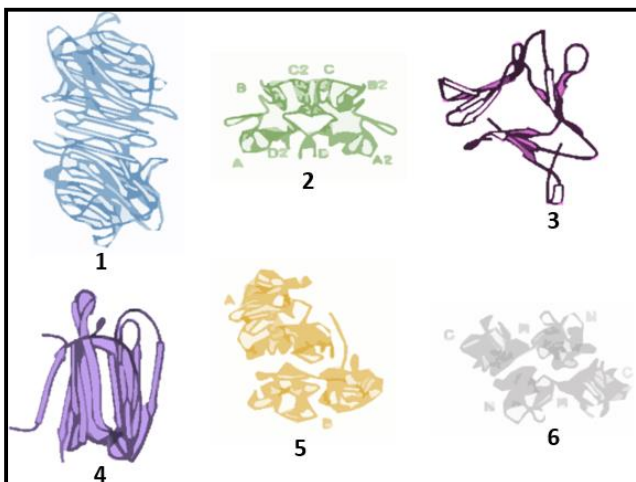


Fig. 18- Representación esquemática de las estructuras tridimensionales en lectinas vegetales. Lectinas aisladas de leguminosas (1), lectinas con dominio tipo *heveína* (2), lectinas aisladas de monocotiledóneas, específicas de manosa (3), lectinas con estructura tipo prisma  $\beta$  (4), lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas (5), lectinas tipo *Amaranto* (6). Modificado de Hernández *et al*, 2005.

Actualmente se estableció una nueva clasificación dada a partir de sus diferentes especificidades de unión a carbohidratos (Tabla 4):

- ❖ Homólogos de aglutinina *Agaricus bisporus*
- ❖ *Amaranthins*
- ❖ Clase V homólogos a quitinasa con actividad de lectina
- ❖ Familia cianovirina
- ❖ Familia EEA (*Euonymus europaeus* agglutinin)
- ❖ Familia GNA (*Galanthus nivalis* agglutinnin)
- ❖ Proteínas con dominios heveína
- ❖ Jacalina
- ❖ Proteínas con dominios lectina de leguminosas
- ❖ Con dominio LysM
- ❖ Familia Nictaba (antes lectinas de *Cucurbitaceae pholoem*)
- ❖ Familia ricina-B (Fu *et al*, 2011; Liang *et al*, 2014).

Tabla 4- Clasificación de lectinas vegetales por unión a carbohidratos y estructura				
Lectina	Abreviación	Familia	Azúcar de unión específica	
Aglutinina <i>Agaricus bisporus</i>	ABA	Homólogos de aglutinina <i>Agaricus bisporus</i>	Galactosa	
Aglutinina relacionada con Quitinasa	CRA	Clase V quitinasa Homólogos con actividad de lectina	N-glicanos con alta Manosa	
N-Cyanovirina	CV-N	Familia <i>Cyanovirina</i>	Manosa	
Aglutinina <i>Euonymus europaeus</i>	EEA	Familia EEA	Manosa/Galactosa	
Lectina <i>Polygonatum cytonema</i>	PCL	Familia GNA	Manosa/Ácido siálico	
Aglutinina de germen de trigo	WGA	Proteínas con dominio Heveína	N-acetil-D-glucosamina	
Concavalina A	ConA	Proteínas con dominios lectina de leguminosas Dominio LysM	D-Manosa	
Lectina <i>Cucurbitaceae pholoem</i>	CPL	Familia Nictaba	D-Manosa	
Lectina de muérdago europeo	ML-I	Familia de Ricina-B	B-galactosa	

### 🌀 2.3.3. Lectinas Vegetales y su función

La actividad biológica que presentan las lectinas vegetales radica en su capacidad de reconocimiento y unión a carbohidratos específicos en la superficie de la membrana, siendo que el proceso de reconocimiento está asociado al mecanismo de inmunidad innata (Vázquez *et al*, 2012; Alessandra *et al*, 2005).

Estas moléculas forman parte de conjugados como lectina-lectina, lectina-enzimas y lectina-anticuerpos. Van a presentar mayor afinidad por carbohidratos con estructuras más complejas que aquellos con estructuras simples (monosacáridos y disacáridos), por lo tanto se ha incrementado el estudio de la interacción lectina-carbohidrato (Hernández, 1999).

La gran importancia de las lectinas se debe fundamentalmente a sus propiedades biológicas, tales como aglutinación de eritrocitos y otras células como linfocitos, espermatozoides, plaquetas y bacterias, inducción de mitosis en linfocitos, efectos citotóxicos sobre linfocitos, aglutinación de virus y otras. El estudio de estas moléculas se basa por su uso en la detección de transformaciones malignas en células, ya que generan una aglutinación preferencial por células transformadas, además de disminuir el crecimiento, son citotóxicas y antitumorales (Hernández, 1999). Actualmente su estudio se basa en su actividad antitumoral, a través de la muerte celular programada dirigida (PCD), que es un mecanismo celular intrínseco para la eliminación de las células dañinas y el mantenimiento de la homeostasis (Fu *et al*, 2011; Liu *et al*, 2009).

### 🌀 2.3.4. Efecto de Lectinas Vegetales en Células Tumorales

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

Durante la diferenciación celular y la transformación maligna, la biosíntesis de las cadenas de oligosacáridos de glicoproteínas es frecuentemente alterada, lo cual puede ser detectado por las lectinas, por medio del dominio de reconocimiento a carbohidratos que se encuentra dividido en dos subsitios. Esta división permite explicar la diferencia del efecto biológico que presentan las lectinas con la misma especificidad hacia un monosacárido. Las lectinas son capaces de distinguir patrones específicos de la glicosilación de proteínas de superficie, que se encuentra regulando la transducción de señales intracelulares, entre otros (Rambaruth, 2011). Los mecanismos de acción de estas proteínas son muy variados dependiendo de diferentes factores como pueden ser el origen celular, clase de tumor y concentración de lectina (Tabla 5) (Castillo y Abdullaev, 2005).

A nivel bioquímico y molecular se han propuesto diferentes mecanismos de acción del efecto antitumoral de las lectinas. Un mecanismo describe la unión de lectinas a moléculas de adhesión de la superficie (epCAM) que participan en una gran variedad de señales de transducción que son importantes para la regulación celular. Un segundo mecanismo sugiere que la lectina se internaliza en la célula y afecta el proceso celular fundamental para la división celular (Villanueva *et al*, 2015). La lectina se une a una forma truncada de Orp150 la cual está directamente involucrada en el proceso del importe nuclear dependiente de NLS (Castañeda, 2006). Un tercer mecanismo explica que la lectina induce apoptosis por diversas vías:

- Dependiente de la activación intracelular de la caspasa 8/FLICE requiriendo la internalización de la lectina e involucra su actividad inhibitoria ribosomal y de la síntesis de proteínas.
- A través de la activación de la caspasa-3 y la ruptura de PARP.
- Por la activación de Bax (acelerador de apoptosis) y la inhibición tanto de Bcl-2 (supresor de apoptosis) como de la telomerasa (Zhiyi *et al*, 2015).

Tabla 5- Mecanismos de acción de lectinas vegetales en diferentes líneas celulares de cáncer				
Lectina	Mecanismo de Acción	Línea Celular	Tipo de Cáncer	
PHA-L ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) y Con A (Concavalina A)	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones	LoVo, HCT-15, SWB37	Cáncer humano	colorrectal
GSA ( <i>Griffonia simplicifolia</i> I-A)	Estimula el crecimiento celular a altas concentraciones. Inhibe el crecimiento celular a altas concentraciones.	SW837 LoVo	Cáncer humano	colorrectal
WGA ( <i>Triticum vulgare</i> )	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones	LoVo, HCT-75, SW837	Cáncer humano	colorrectal
DSA ( <i>Datura stramonium</i> )	Inducción de diferenciación irreversible e inhibición de proliferación	C6 glioma, U251, SNB-75, SNB-78	Glioma de rata, tumor de cerebro humano	
VCA ( <i>Viscum álbum, L coloratum</i> )	Inhibición del crecimiento dosis-dependiente Inhibición de proliferación dosis-dependiente, con inducción de apoptosis Inducción de apoptosis a través de la activación de caspasa-3 Inhibición de la telomerasa Inducción de apoptosis por la desfosforilación de Akt	Molt-4 B16-BL6 HL-60 HL-60 SK-Hep-1 Hep3B A253	T linfoblastico humano agudo Melanoma metastático Leucemia promieloide aguda Hepatocarcinoma humano Hepatocarcinoma humano Cáncer humano	
ML-I ( <i>Viscum álbum</i> )	Inducción de apoptosis: inactivación intracelular de caspasas	Jurkat T-cell BJAB B-cell	Leucemia humana	
ABL ( <i>Agaricus bisporus</i> I)	Inhibición de proliferación sin citotoxicidad, se internaliza y selectivamente bloquea la importación de proteínas nucleares dependientes de NLS a través de Orp-150 truncada	HT29	Cáncer de colon humano	
AAL ( <i>Agrocybe aegerita</i> )	Inducción de apoptosis con actividad de ADNasa	HeLa, SW4880, SCG-7901, MGC80-3, BGC.823, HL-60, S-180	Canceres humanos Sarcoma de ratón	
In vivo				
PHA ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Inhibición del crecimiento de tumores	Murina linfomas ascíticos		
SBA ( <i>Glycine max</i> )	Fortalecimiento del sistema inmune del huésped	Murina linfoma ascítico		
TMA I y II ( <i>Triholoma mongolicum</i> )	Inhibición del tumor y prolongación de la vida de los animales	Ratón con células de sarcoma 180		
GS-1 ( <i>Griffonia simplicifolia</i> )	Inhibición del crecimiento del tumor	Ratón con células ascíticas Ehrlich		
VCA ( <i>Viscum álbum, L coloratum</i> )	Inhibición del crecimiento de tumores y metástasis por el incremento de la apoptosis y la inhibición de la angiogénesis	Ratón inoculado con células de melanoma B-16-BL6		
KML-C ( <i>Korean mestleotoe; Viscum álbum coloratum</i> )	Actividad inmunomoduladora para fortalecer el sistema de defensa del huésped, efecto en metástasis asociado a muerte natural y macrófagos	Murina melanoma, carcinoma de colon y linfoma		
ML-I ( <i>Viscum álbum</i> )	Efecto antitumoral con reducción del crecimiento del linfoma trasplantado	Ratón con tumores de linfa no Hodgkin		

Por tanto estos estudios han demostrado que este tipo de proteínas pueden tener un efecto adverso sobre las células cancerígenas, lo que las lleva a ser un arma potencial para el tratamiento de esta enfermedad, debido a su especificidad hacia células malignas y por medio de diferentes rutas son capaces de activar los mecanismos de apoptosis como se muestra en la Fig. 19 (Fu *et al*, 2011; Ingale y Hivrale, 2013; Liang *et al*, 2014; Bo *et al*, 2009; Bo *et al*, 2010, Bo *et al*, 2009; Silva *et al*, 2013; Jiang *et al*, 2015). Por otra parte, estudios clínicos recientes han utilizado este tipo de moléculas (lectinas de muérdago), como agentes adyuvantes durante



la quimioterapia y la radioterapia debido a que este tipo de proteínas pueden entrar intactas a la circulación sistémica (Bo *et al*, 2010; Ferriz *et al*, 2010).

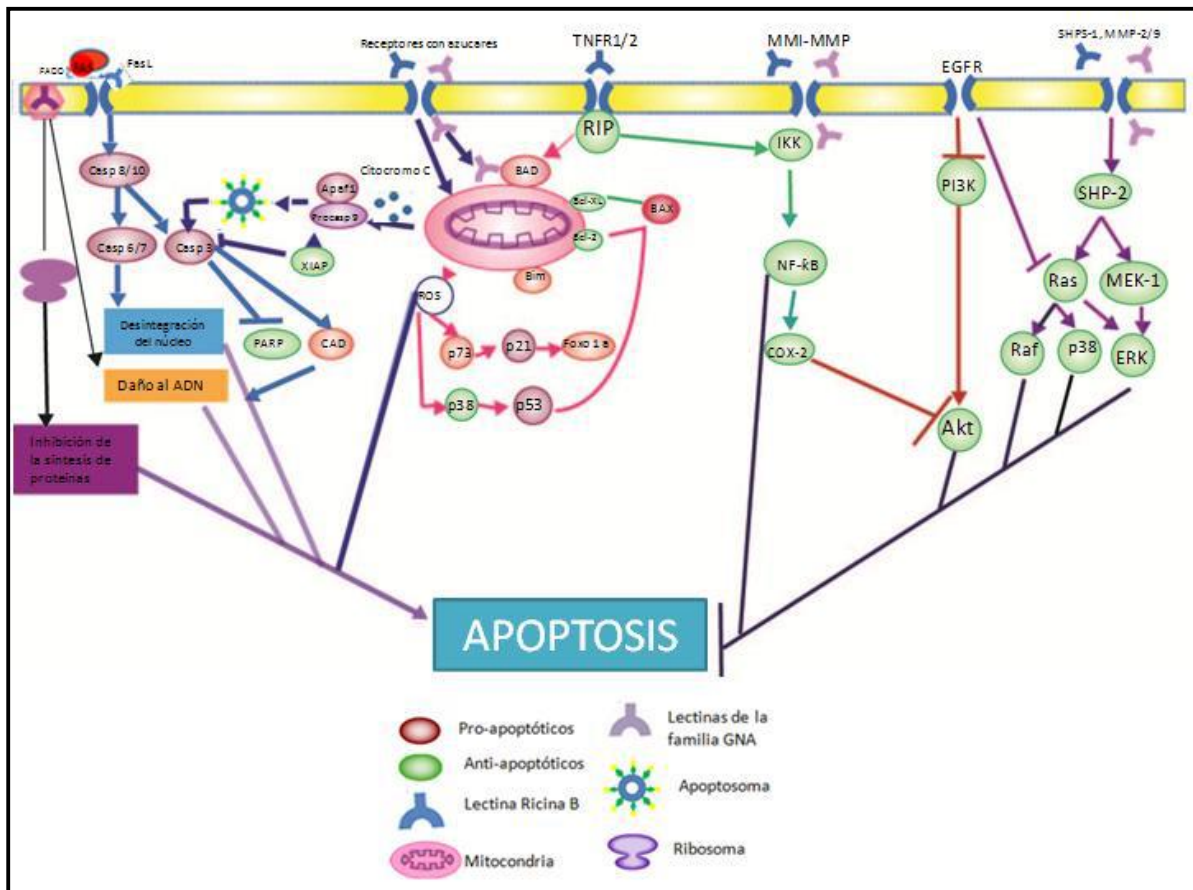


Fig.19- Red de señalización de muerte celular programada (PCD) por lectinas vegetales. Modificado de Fu *et al*. 2011.

Para el caso de lectinas de *R. graveolens* se ha reportado que presentan alta afinidad por oligosacáridos como: galactosa (Gal), glucosa (Glu), N-acetil glucosamina (GlcNAc) y fructosa (Fru), y una menor afinidad por sacarosa (Sac), Lactosa (Lac), fucosa (Fuc), galactosa acetilada (GalAcet), ribosa (Rib), xilosa (Xyl), manosa (Man) y N-acetilgalactosamina (NANA); sin embargo, a estas lectinas aún no se les ha dado una clasificación (Hernández, 2011; Necib *et al*, 2014).

### 3. Planteamiento del Problema

Debido a que el cáncer de mama es considerado el problema de salud más importante para la población femenina, es indispensable la búsqueda de nuevos tratamientos que sean capaces de reconocer a las células tumorales con mayor eficiencia provocando su eliminación. Así el estudio de las lectinas vegetales extraídas de *Ruta graveolens* permitirá la generación de un potencial fitofármaco menos agresivo y más específico que identifique los cambios en la glicosilación del cáncer de mama y active la apoptosis en células tumorales.

### 4. Hipótesis

Debido a la presencia de modificaciones en las glicosilaciones membranales de las células tumorales, se espera que las lectinas vegetales presentes en *Ruta graveolens* identifiquen a las células transformadas por medio de los cambios en la glicosilación y por consiguiente presenten un efecto citotóxico sobre células de cáncer de mama.

### 5. Objetivos

#### 5.1. Objetivo General

---

- Realizar la caracterización parcial del efecto citotóxico sobre células MCF-7 dado por lectinas vegetales de *Ruta graveolens*.

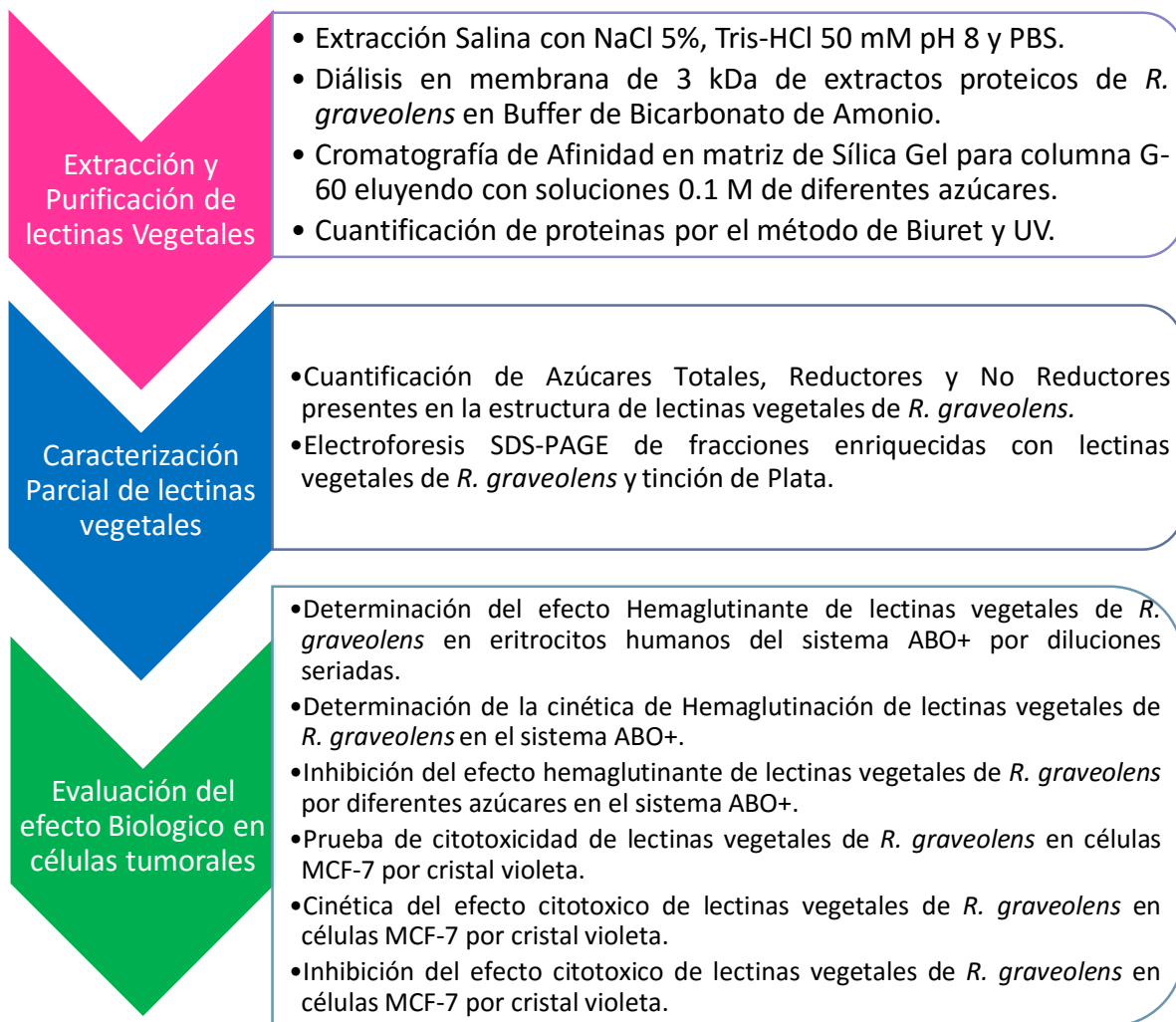
#### 5.2. Objetivos Particulares

---

- ❖ Realizar la extracción de lectinas presentes en extractos de *R. graveolens* obtenidos por dos métodos de extracción salina.
- ❖ Comparar dos métodos de extracción salina de lectinas vegetales.
- ❖ Realizar una caracterización parcial de las características bioquímicas y del efecto biológico de lectinas vegetales presentes en la *R. graveolens*.

## 6. Desarrollo Experimental

Experimentalmente este proyecto fue dividido en tres rubros:



### 6.1. Extracción Salina de Lectinas Vegetales de *R. graveolens*

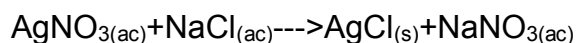
La extracción salina de proteínas totales presentes en los diferentes órganos de la ruda se llevó a cabo por medio de dos métodos (NaCl y Tris-HCl) para el caso de hoja y tallo, mientras para raíz la extracción se realizó por medio de tres tipos de extracción (NaCl, Tris-HCl y PBS).

La extracción se realizó de acuerdo al método de Villarrubia *et al* (1995) y Torres (2010) con algunas modificaciones. Se maceraron 100 gr de material vegetal (por cada órgano) en un mortero con solución de NaCl a una concentración al 5 % a 4°C, en una proporción 3:1, solución Tris-HCl 50 mM pH 8 en una proporción 4:1 y solución PBS (para raíz) en una proporción 1:5, dejando reposar por 24 hrs a 4°C. Se eliminó el exceso de material vegetal por filtración con gasas y papel Whatman # 41. Posteriormente se aplicó un gradiente de densidad con una centrifugación a 3000 rpm durante 20 min. El precipitado se descartó y el sobrenadante se conservó en refrigeración a 4 °C, hasta su utilización.

## **6.2. Procesos de Semipurificación**

### **6.2.1. Diálisis**

Se realizó la semipurificación proteica de los extractos por medio de una diálisis con una membrana semipermeable de 3 kDa de acuerdo a lo reportado del peso molecular de las lectinas que va de 12-65 kDa. En 1L de tampón NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (J.T. Baker MEX) 0.1 M pH 8, donde se produce un proceso osmótico que permite la separación de proteínas por su tamaño y cambio en la composición de sal de la mezcla, hasta comprobar la eliminación de sal por la prueba de AgNO<sub>3</sub> (MERCK) 0.1 N que en presencia de NaCl el AgNO<sub>3</sub> forma un complejo de cloruro de plata dando una coloración lechosa.



### **6.2.2. Cromatografía de Afinidad:**

Para la semipurificación de los dializados se prepararon columnas empaquetadas con una matriz de Silica Gel para columna G60. Las muestras fueron pasadas por la columna con un flujo constante. Las proteínas retenidas fueron desplazadas mediante el paso de soluciones de Glucosa, Arabinosa, Galactosa, Lactosa, Maltosa, Manitol, Sacarosa, Sorbitol y Fructosa 0.1 M. Posteriormente cada una de las fracciones obtenidas fueron dializadas para la eliminación de azúcares en tampón bicarbonato de amonio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 0.1 M pH 8 en agitación constante, realizando cambios hasta la eliminación de carbohidratos, que fue corroborado por el método de Dubois (Fenol-Ác. Sulfúrico).

## **6.3. Cuantificación de Proteínas**

### **6.3.1. Método de Biuret:**

Se determinó la concentración de proteínas presentes en los extractos tomando 800 µl de muestra con 200 µl de agua, agregando 10 ml del reactivo de Biuret;

cuantificando por la lectura a 545 nm, en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Genesis 20) y extrapolando a una curva patrón de albumina sérica bovina a una concentración de 10 mg/ml.

#### **6.3.2. Método de UV:**

Las muestras a evaluar fueron previamente precipitadas por el método de TCA(10%)-SDS(10%)-NaOH(0.8N). Una vez obtenidos los precipitados proteicos se diluyeron en 1 ml de la solución de SDS-NaOH. Se utilizó como blanco la solución de SDS-NaOH. Las absorbancias se midieron a 280-260 nm. Para determinar la concentración de proteínas para un mg/ml de disolución, utilizando la siguiente fórmula:

$$A_{280} - A_{260} = (1.55 * A_{280} - 0.76 * A_{260})$$

### **6.4. Cuantificación de Carbohidratos:**

#### **6.4.1. Cuantificación de Azúcares Totales:**

La cuantificación de carbohidratos totales se realizó por medio del método de Dubois, tomando 100 µl de muestra de cada una de las fracciones obtenidas a las cuales se les adicionaron 100 µl de fenol al 5 % dejando reposar por 15 min, posteriormente se añadieron 3 ml de ácido sulfúrico concentrado, agitando y dejando incubar por 30 min y leyendo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

#### **6.4.2. Cuantificación de Azúcares Reductores:**

La cuantificación de azúcares reductores se llevó acabo por medio del método de Miller, tomando 500 µl de muestra, completando el volumen a 1 ml con agua destilada, se adicionaron 500 µl del reactivo DNS, colocando en baño maría en ebullición por 5 min y deteniendo la reacción en baño de agua y hielo. Se añadieron 5 ml de agua destilada, agitando y dejando reposar por 15 min y se leyó a una longitud de onda de 540 nm.

#### **6.4.3. Cuantificación de Azúcares No Reductores:**

La determinación de la concentración de azúcares no reductores se llevó a cabo por medio de la diferencia entre la concentración de azúcares totales y azúcares reductores.

## **6.5. Prueba de Hemaglutinación:**

Se realizó en eritrocitos humanos intactos del sistema ABO+ que fueron recolectados en tubos vacutainer con EDTA-K2 10.8 mg. Los eritrocitos fueron preparados de acuerdo a Rodríguez *et al* (2004), se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante aspirando la capa superior, los eritrocitos extraídos se resuspendieron en aproximadamente 10 volúmenes de PBS (pH 7.4, 295 mOsm/Kg) y se centrifugaron en las mismas condiciones, repitiendo el lavado dos veces más. Posteriormente el volumen de eritrocitos sedimentados se resuspendió en PBS en una dilución al 3 %. Se prepararon pozos con 50 µl de una solución con lectinas vegetales de la ruda a una concentración inicial de 100 µg y realizando diluciones serias, posteriormente se colocaron 50 µl de la solución de eritrocitos al 3 %, utilizando como control positivo las mismas concentraciones de la lectina comercial PHA. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 2 hrs, realizando la lectura al microscopio y por el escaneo de las placas de 96 pozos.

### **6.5.1. Cinética de Hemaglutinación:**

Los eritrocitos utilizados para esta prueba se manejaron de la misma forma que en la prueba de hemaglutinación. Una vez obtenidas las suspensiones celulares, se prepararon pozos con 50 µl de una solución con lectinas vegetales de la ruda a una concentración de 100, 75 y 50 µg, posteriormente se colocaron 50 µl de la solución de eritrocitos al 3 %, utilizando como control positivo las mismas concentraciones de la lectina comercial PHA. Dejando incubar a temperatura ambiente por 1, 2, 3, 4, 5 y 24 hrs. Realizando la lectura al microscopio y por el escaneo de las placas de 96 pozos.

### **6.5.2. Inhibición de la Hemaglutinación:**

Los eritrocitos del tipo sanguíneo A+ fueron manejados de la misma manera que en la prueba de hemaglutinación. Se prepararon pozos con 50 µl de una solución de lectinas vegetales de la ruda a concentraciones de 100, 75 y 50 µg a los cuales se les adicionaron 50 µl de una solución de glucosa, arabinosa, galactosa, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa, sorbitol y fructosa 0.1 M, así mismo se realizó la dilución seriada de la solución de azúcares hasta obtener la mínima concentración requerida para que se inhiba la aglutinación. Posteriormente, se agregaron 50 µl de la solución de eritrocitos al 3 % y se dejó incubar por 1, 2, 3 y 4 hrs y se realizó la lectura al microscopio y por el escaneo de las placas de 96 pozos.

## **6.6. Electroforesis SDS-PAGE:**

Fue realizada de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli (1970) en un gel de poliacrilamida al 12%. Tomando una concentración de proteína aproximadamente de 10 µg de las fracciones. La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el reactivo de Bradford. El revelado de los geles se hizo por medio de la Tinción de Plata de acuerdo a lo establecido en The Protein Protocols Handbook (Walker J. "The Protein Protocols Handbook, Human Press, second edition, 2002, pág. 97-99).

## **6.7. Prueba de Citotoxicidad:**

Las células MCF-7 de cáncer de mama fueron sembradas en medio de cultivo DMEM, en placas de 96 pozos a una población de  $10 \times 10^3$  células/pozo. Tratando con cada una de las fracciones enriquecidas obtenidas en concentraciones de 0, 2, 4, 8 y 16 µg/µl, dejando incubar por 48 hrs, al término de los cuales se determinó la cantidad celular por la técnica de cristal violeta. La capacidad citotóxica se calculó por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ células vivas} = \frac{\text{D.O. de células tratadas}}{\text{D.O. de células control}} \times 100$$

### **6.7.1. Cinética de Citotoxicidad:**

La prueba de cinética de la citotoxicidad se realizó tomando las células MCF-7 y sembrándolas en medio de cultivo DMEM, en placas de 96 pozos a una población de  $10 \times 10^3$  células/pozo. Tratando con las fracciones que presentaron un efecto citotóxico y utilizando la concentración a la que se presentó el máximo efecto. Se incubó por 12, 24, 36 y 48 hrs. Al término de los cuales se determinó la cantidad celular por la técnica de cristal violeta.

### **6.7.2. Inhibición de la Citotoxicidad o Proliferación:**

Las células MCF-7 de cáncer de mama fueron sembradas en medio de cultivo DMEM, en placas de 96 pozos a una población de  $10 \times 10^3$  células/pozo. Tratando con cada una de las fracciones que presentaron un efecto citotóxico o proliferativo en la concentración a la que presentaron el máximo efecto, adicionando 5 µl del azúcar con la que se realizó la elución cromatografía para la obtención de dicha fracción, dejando incubar por 48 hrs, al término de los cuales se determinó la cantidad celular por la técnica de cristal violeta.

## 7. Resultados

### 7.1. Extracción Salina de Lectinas Vegetales

---

#### **7.1.1. Determinación de la concentración de lectinas vegetales en *R. graveolens* obtenidas por diferente método de extracción**

Se utilizaron 100 gr de las partes vegetativas de *Ruta graveolens* (hoja, tallo y raíz) para la obtención de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales. En este estudio se utilizaron dos de los métodos de extracción con mayores reportes en la literatura: la solución de cloruro de Sodio (NaCl) al 5 % que presenta alta fuerza iónica y el buffer de Tris-(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl) 50 mM pH 8, el cual presenta baja fuerza iónica. Para el caso de raíz también se realizó un extracto hecho con Buffer PBS 0.1 M pH 7.4 de fuerza iónica media, con el fin de verificar la eficiencia de este método. Cada uno de los extractos obtenidos se sometió a procesos de semipurificación hasta la obtención de nueve fracciones enriquecidas con lectinas vegetales, siendo cuantificada la concentración de proteínas presentes en cada uno de los procesos de semipurificación.

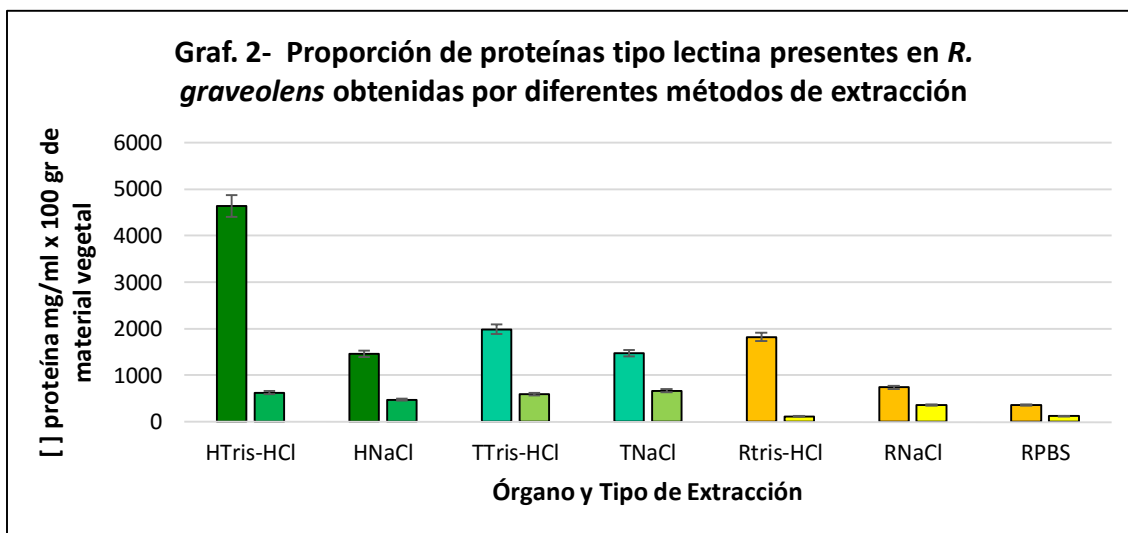
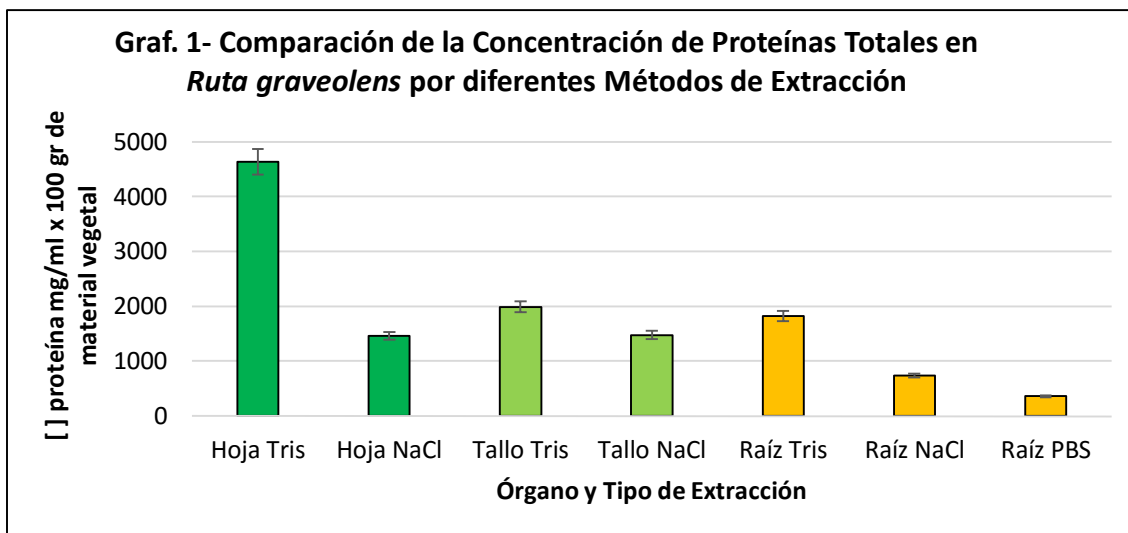
La Tabla 6 y Gráfica 1 muestran las variaciones en la concentración de proteínas presentes en cada uno de los procesos hasta la obtención de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales. La hoja fue el órgano que presentó una mayor concentración de proteínas totales, seguido de tallo y por último la raíz. Para las extracciones con NaCl se obtuvo un contenido de proteínas totales menores a 3 kDa de: 36.63 % en hoja, 22 % en tallo y 46 % en raíz, mientras que para Tris-HCl se obtuvo: 62 % en hoja, 40 % en tallo y 67 % en raíz, y 15 % en raíz extraída con PBS. Mientras que la proporción de proteínas tipo lectinas para las extracciones con NaCl fue de: 12.57 % en hoja, 45.03 % en tallo y 48.78 % en raíz; para las extracciones con Tris-HCl: 13.49 % en hoja, 30 % en tallo y 6.58 % en raíz, y 33.01 % en raíz extraída con PBS (Gráfica 2).

Comparando características físicas se observó que la extracción con Tris-HCl presentó un mayor precipitado después de la centrifugación, sugiriendo que fueron extraídos otros componentes celulares. Además, encontramos diferencias en olor y color ya que las extracciones con NaCl presentaron un color traslucido y un aroma parecido al de la planta, mientras que las extracciones con Tris-HCl tuvieron un color opaco y un olor penetrante.



Órgano y Tipo de extracción	[ ] total de proteína mg/ml	[ ] proteica de dializados mg/ml	[ ] proteica de fracciones			Órgano y Tipo de extracción	[ ] total de proteína mg/ml	[ ] proteica de dializados mg/ml	[ ] proteica de fracciones			Órgano y Tipo de extracción	[ ] total de proteína mg/ml	[ ] proteica de dializados mg/ml	[ ] proteica de fracciones		
Hoja- NaCl	1459.2 100 %	924.695 63.36 %	s/Azu	450.21	31 %	Tallo-NaCl	1472.64 100 %	1135.43 77.1 %	s/Azu	130.7	32 %	Raíz-NaCl	737.37 100 %	395.34 53.61 %	s/Azú	17.25	4.8 %
			Glu	121.5	8.2 %				Glu	86.4	5.8 %				Glu	97.55	13 %
			Ara	11.42	0.7 %				Ara	75.9	5.1 %				Ara	16.2	2.1 %
			Gal	9.475	0.6 %				Gal	61.65	4.1 %				Gal	66.85	9 %
			Lac	27.16	1.8 %				Lac	3.83	0.2 %				Lac	33.8	4.5 %
			Mal	51	3.4 %				Mal	79.76	5.4 %						
			Man	48.15	3.2 %				Man	43.06	2.9 %				Man	13.1	1.7 %
			Sac	55.85	3.8 %				Sac	208.9	14 %				Sac	38.1	5.1 %
			Fru	48.93	3.3 %				Fru	72.55	4.9 %				Fru	66.15	8.9 %
Hoja-Tris-HCl	4633.6 100%	1721.61 37.15 %	s/Azú	1096.2	24 %	Tallo-Tris-HCl	1987.2 100 %	1180.3 59.39 %	s/Azú	538.65	29 %	Raíz-Tris-HCl	1821.83 100 %	595.11 32.66 %	s/Azú	304.12	26 %
			Glu	169.2	3.6 %				Glu	100.8	5 %				Gluc	0.0918	0.005
			Ara	51.72	1.1 %				Ara	61.62	3.1 %				Ara	22.08	1.2 %
			Gal	44.28	0.9 %				Gal	106.8	5.3 %				Gal	22.82	1.2 %
			Lac	18.53	0.3 %				Lac	49.92	2.5 %				Mal	15.76	0.8 %
			Mal	28.53	0.6 %				Mal	68.4	3.4 %				Man	9.18	0.5 %
			Man	63.36	1.3 %				Man	100.44	5 %				Sac	22.34	1.2 %
			Sac	130.8	2.8 %				Sac	76.8	3.8 %				Sor	23.72	1.3 %
			Sor	70.2	1.5 %				Sor	30	1.5 %				Fru	0.3	0.01 %
			Fru	48.79	1 %				Fru	2	0.1 %	Raíz-PBS	358.42 100 %	303.52 84.68 %	s/Azú	170.3	52 %
			Glu	22.73	6.3 %				Glu	22.73	6.3 %						
			Ara	10.08	2.8 %				Ara	10.08	2.8 %						
			Gal	34.1	9.5 %				Gal	34.1	9.5 %						
			Mal	16.77	4.6 %				Mal	16.77	4.6 %						
			Man	14.09	3.9 %				Man	14.09	3.9 %						
			Sac	1.168	0.3 %				Sac	1.168	0.3 %						
Sor	11.78	2.1 %	Sor	11.78	2.1 %												
Fru	7.62	2.1 %	Fru	7.62	2.1 %												

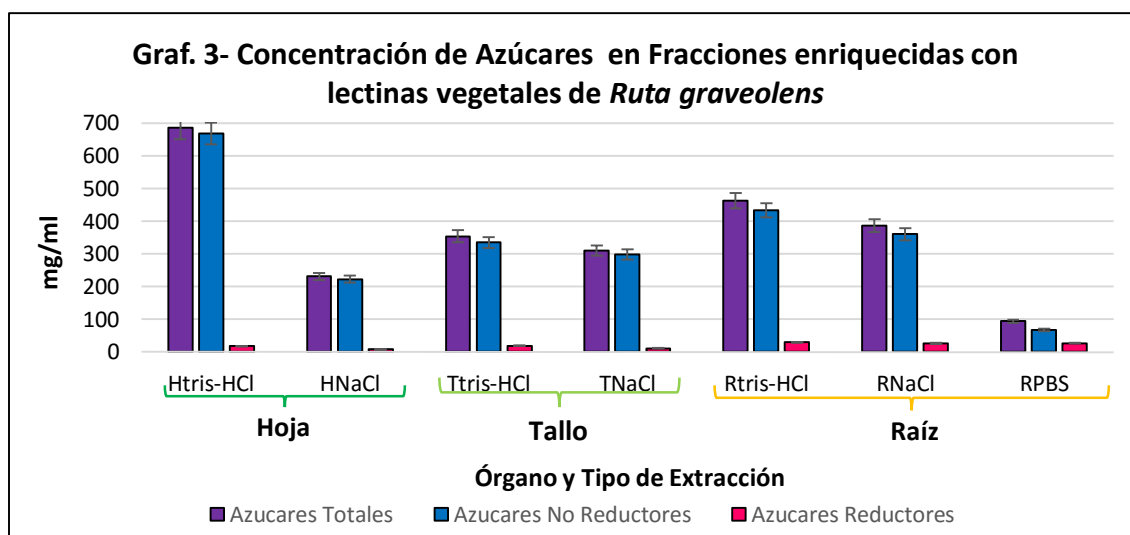
Tabla 6-Concentración de Proteínas de *Ruta graveolens* presente en cada uno de los procesos de semipurificación y fracciones enriquecidas con lectinas vegetales.



### **7.1.2. Determinación de la concentración de carbohidratos presentes en fracciones enriquecidas con lectinas vegetales en *R. graveolens* obtenidas por diferente método de extracción**

Las concentraciones promedio de los diferentes tipos de azúcares en las fracciones de hoja extraídas con NaCl fue de: 25.65 mg de azúcares totales (AT), 24.75 mg de azúcares no reductores (ANR) y 0.897 mg de azúcares reductores (AR), que corresponde al 32.7 %; para las fracciones extraídas con Tris-HCl: 76.21 mg, 74.26 mg y 1.9 mg, respectivamente, siendo el 52.3 %. Para las fracciones de tallo extraídas con NaCl las concentraciones promedio de AT fueron de 34.43 mg, 33.16 mg de ANR y 1.26 mg de AR, lo que es el 31.7 %, mientras para las fracciones de tallo extraídas con Tris-HCl tuvieron una concentración promedio de AT de 39.34 mg, de ANR 37.2 mg y 2.14 mg de AR, representando el 37.23 %. En el caso de

raíz se obtuvieron concentraciones promedio de AT de 48.3 mg, ANR 45.04 mg y AR 3.26 mg para las fracciones extraídas con NaCl, siendo el 54.73 %; mientras que las fracciones extraídas con Tris-HCl muestran una concentración promedio de 57.9 mg, 54.231 mg y 3.66 mg, respectivamente, representando el 81.75 %; por otra parte para el caso de PBS se obtuvo una concentración de 11.77 mg para AT, 8.4 mg y 3.33 mg para ANR y AR, respectivamente, correspondiendo al 47.25 %.

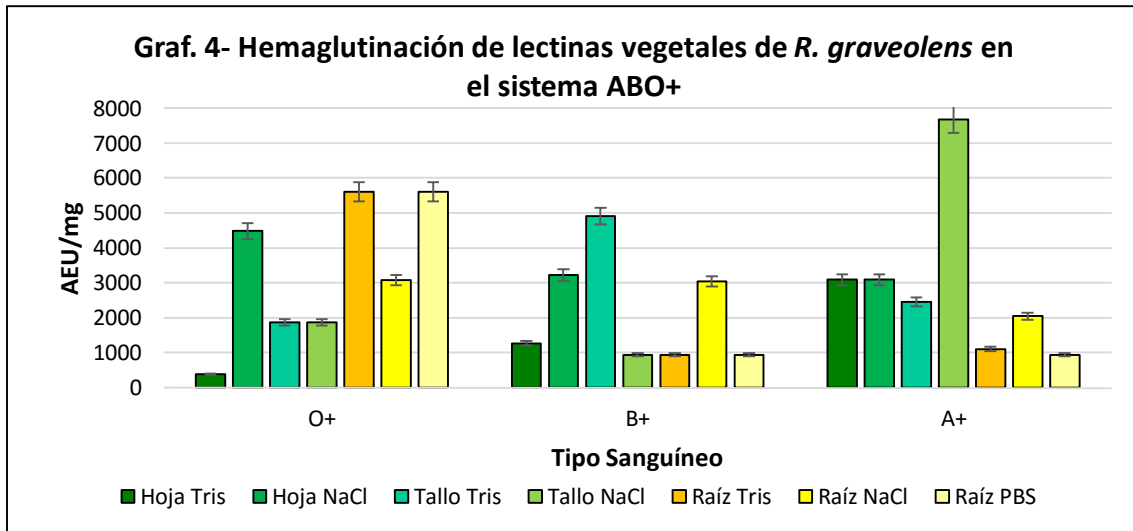


### 7.1.3. Determinación del Efecto Hemaglutinante de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales en *R. graveolens* obtenidas por diferentes métodos de extracción

Como parte de la caracterización biológica se evaluó la hemaglutinación de las lectinas vegetales, lo que permite demostrar el proceso de semipurificación (Tabla 7), reportado para el grupo sanguíneo O+. Los hallazgos muestran que la mayoría de las lectinas presentes en tallo y hoja de *R. graveolens* tienen un efecto hemaglutinante en el grupo sanguíneo A+, mientras que las lectinas presentes en raíz aglutinan preferentemente al grupo sanguíneo O+. Presentando un promedio general de actividad hemaglutinante de 2560 AEU/mg, mostrando un efecto aglutinante a concentraciones de 12.5 µg (Gráfica 4).

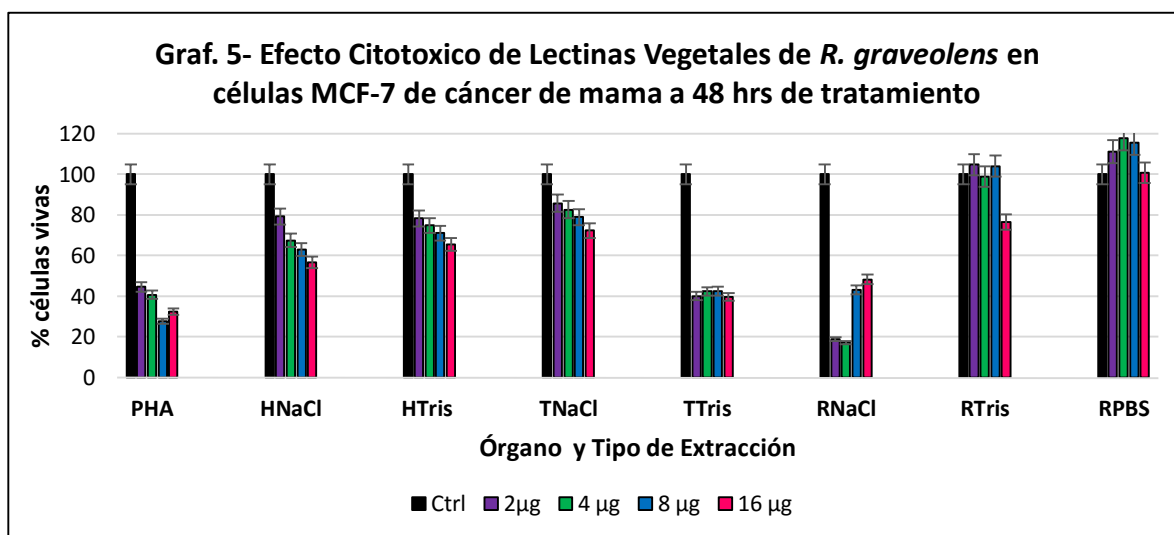
Extracto	Fracción	[ ] Proteína (mg)	Actividad Total (UHA)	Actividad Específica (UHA/mg)	Rendimiento %
Hoja-NaCl	Crudo	1459.2	2	7.01	100
	Dializado	924.69	16	320	63.36
	Enriquecido	474.48	32	4195.5	32.51
Hoja-Tris/HCl	Crudo	4633.6	32	426.6	100
	Dializado	1721.6	8	80	37.15
	Enriquecido	625.41	8.8	382.5	13.49
Tallo-NaCl	Crudo	1472.6	2	13.03	100
	Dializado	1135.4	4	53.3	77.10
	Enriquecido	667.3	22.2	1546.66	45.31
Tallo-Tris/HCl	Crudo	1987.2	2	3.7	100
	Dializado	1180.3	16	640	59.39
	Enriquecido	596.7	20.44	1866.66	29.99
Raíz-NaCl	Crudo	737.3	16	640	100
	Dializado	395.3	16	640	53.61
	Enriquecido	359.4	24.22	2757.77	48.75
Raíz-Tris/HCl	Crudo	1821.8	32	2560	100
	Dializado	595.1	16	60	32.66
	Enriquecido	116.2	39.33	5264.44	6.38
Raíz-PBS	Crudo	358.4	32	2560	100
	Dializado	303.5	16	640	84.68
	Enriquecido	118.3	39.33	5264.44	33.01

Tabla 7- Actividad Hemaglutinante de Lectinas de *Ruta graveolens* extraídas de diferente órgano por diferente método de extracción. UHA= el recíproco de la dilución más alta que muestra aglutinación (2<sup>n</sup>). Actividad Especifica= unidades de hemaglutinación (UHA)/mg



#### 7.1.4. Determinación del Efecto Citotóxico en células MCF-7 de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales en *R. graveolens* obtenidas por diferente método de extracción

En la Gráfica 5 se observa que las fracciones de los extractos de tallo (Tris-HCl) y raíz (NaCl) fueron los que presentaron un mayor efecto citotóxico en células de cáncer de mama, siendo en su mayoría a concentraciones de 2 y 4  $\mu\text{g}$  con una reducción aproximada del 60 % de las células respecto al control sin tratamiento; además comparando con el control positivo (PHA), que mostró una disminución celular del 70 % a una concentración de 8  $\mu\text{g}$ , estas mismas fracciones presentaron mayor citotoxicidad a concentraciones bajas. Mientras que las fracciones de los extractos de raíz hechos con Tris-HCl y PBS tuvieron un efecto proliferativo con el incremento del 20 % de células MCF-7 respecto al control sin tratamiento. Por otra parte, las fracciones de los extractos de Hoja (NaCl), Hoja (Tris-HCl) y Tallo (NaCl) solo tuvieron una disminución del 30 %, esto a diferentes concentraciones.

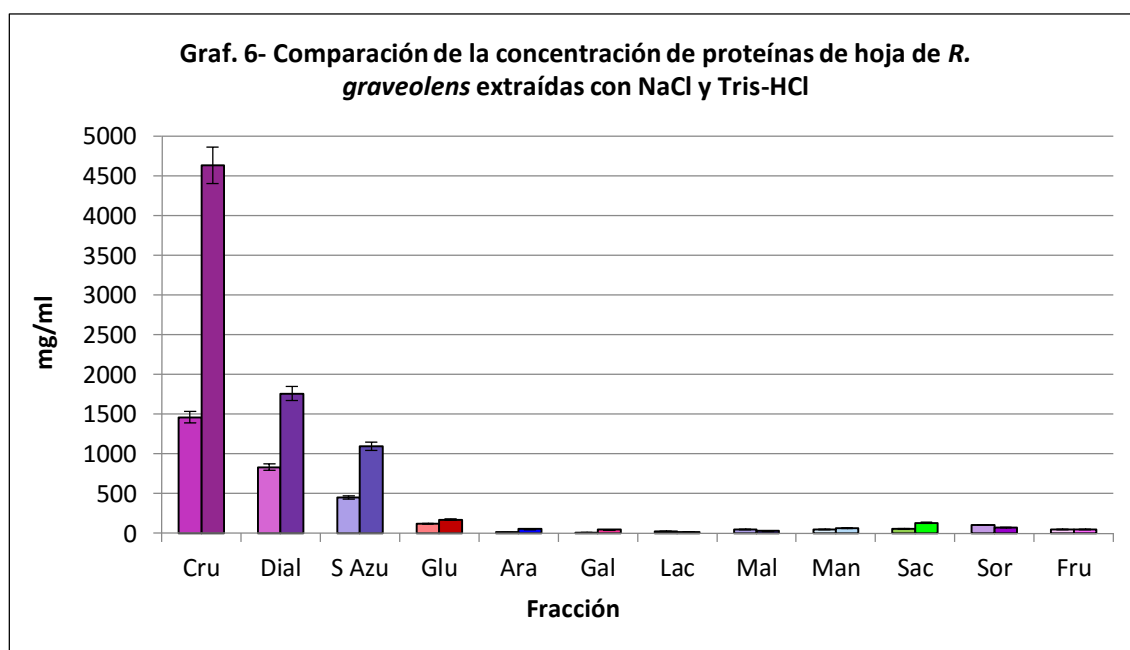


## 7.2. Comparación de Lectinas Vegetales de *R. graveolens* obtenidas por diferentes métodos de extracción

### 7.2.1. Lectinas Vegetales de Hoja de *R. graveolens*

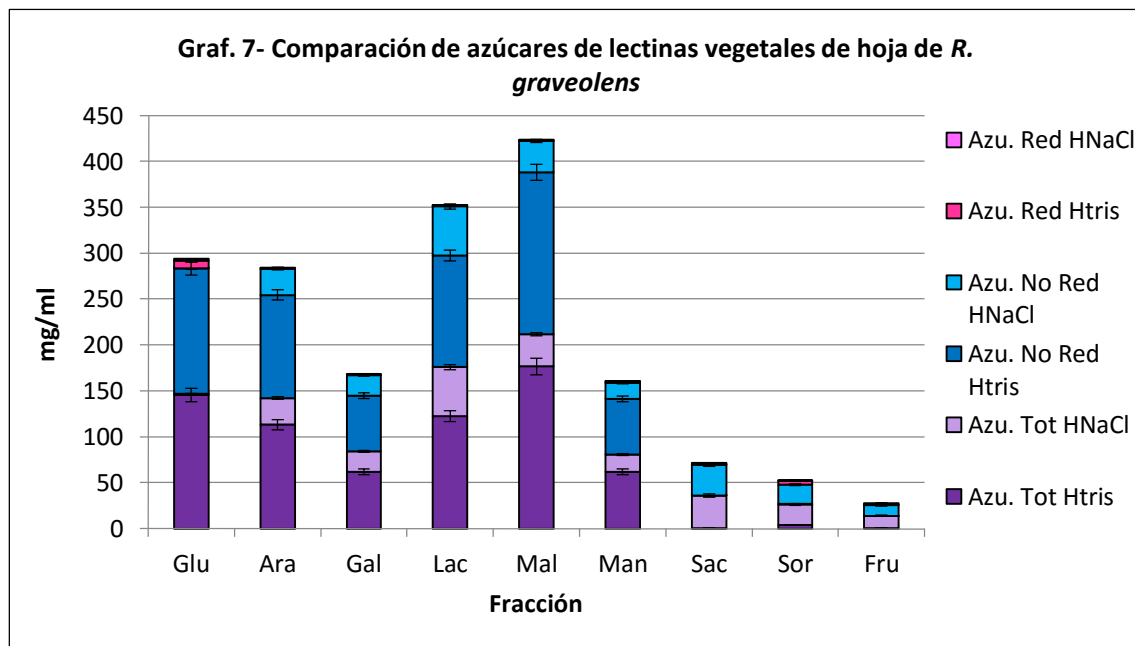
#### 7.2.1.1. Comparación de la concentración de proteínas en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de *R. graveolens*

Comparando el rendimiento en la concentración de lectinas vegetales al utilizar dos métodos de extracción (NaCl y Tris-HCl), se muestra que las fracciones de hoja de ruda presentan una mayor concentración de proteínas totales (extracto crudo) en la extracción con Tris-HCl, en tanto los extractos dializados presentaron un 37 % de proteínas con un peso menor a 3 kDa en la extracción realizada con NaCl y 62.84 % en el extracto obtenido con Tris-HCl. Aunque se tuvo un mayor rendimiento con Tris-HCl en la obtención de proteínas totales, para la obtención de proteínas tipo lectina se observó que la extracción con NaCl presenta un rendimiento del 32.51% del total proteico, lo cual corresponde al 0.474 % por cada 100 gr de material vegetal, obteniéndose en promedio de 52 mg de proteína por fracción; donde las fracciones de glucosa, sorbitol y sacarosa presentan una mayor concentración proteica. Mientras el rendimiento conseguido en la extracción de Tris-HCl fue del 13.49 % que corresponde al 0.6525 % por cada 100 gr de material vegetal, con un promedio proteico de 50.69 mg por fracción, donde las fracciones de sacarosa, sorbitol y manitol presentaron un mayor contenido de proteínas (Grafica 6).



### 7.2.1.2. Comparación de la concentración de carbohidratos en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de *R. graveolens*

Para realizar una caracterización parcial de las lectinas vegetales presentes en la *R. graveolens*, se procedió a la cuantificación de azúcares, ya que dentro de las propiedades estructurales de estas moléculas se encuentra la presencia de carbohidratos. En el caso de los extractos de hoja podemos observar que las fracciones de Tris-HCl son las que presentaron una mayor concentración de azúcares obteniendo 76.21 mg de Azúcares Totales (AT), 74.26 mg de Azúcares No Reductores (ANR) y 1.9 mg de Azúcares Reductores (AR), que corresponde al 52.3 %, donde las fracciones que presentaron un mayor contenido de carbohidratos son: glucosa, arabinosa y maltosa. Por su parte, las fracciones del extracto de NaCl tuvieron una concentración de 25.65 mg de AT, 24.75 mg de ANR y 0.897 mg de AR, representando el 32.72 %; de las cuales las fracciones con un mayor contenido de carbohidratos son: lactosa, maltosa y sacarosa (Gráfica 7). Lo anterior indica una mayor presencia de carbohidratos de tipo no reductor como componentes de la estructura de las proteínas tipo lectina presentes en la hoja de ruda

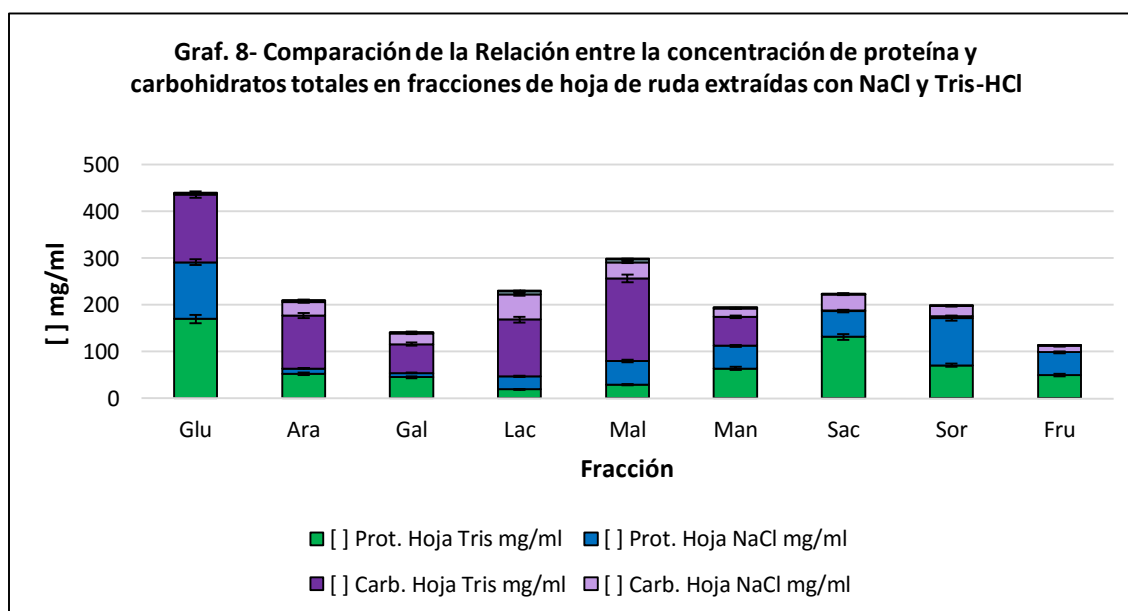


### 7.2.1.3. Comparación de la relación Proteína-Carbohidrato en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de *R. graveolens*

La Gráfica 8 y tabla 8 muestran la relación entre la concentración de proteína y la concentración de carbohidratos presentes en las fracciones enriquecidas extraídas de hoja de ruda, donde las fracciones de arabinosa, galactosa y manitol, presentan una relación proteína-carbohidrato (P-C) constante en ambos métodos; mientras que para glucosa, maltosa y sacarosa se presentan variaciones importantes entre ambos métodos de extracción, ya que como se observa las fracciones de Tris-HCl presentan una relación P-C 10 veces mayor que en las fracciones hechas con NaCl. Para las fracciones del extracto de NaCl se presenta una relación P-C promedio de 1.01 mg de carbohidrato por cada mg de proteína. Mientras las fracciones de Tris-HCl muestran que la relación promedio P-C es de 2.03 mg de carbohidrato por cada mg de proteína.

Fracción	[ ] Prot. HTris-HCl mg/ml	[ ] Prot. HNaCl mg/ml	[ ] Carb. HTris-HCl mg/ml	[ ] Carb. HNaCl mg/ml	Relación P/C HTris-HCl	Relación P/C HNaCl	% Carb. De masa total HTris-HCl	% Carb. De masa total HNaCl
Glu	169.2	121.5	145.2	1.65	0.8581	0.0135	46.18	1.33
Ara	51.72	11.42	113.03	29.17	2.1854	2.5542	68.58	71
Gal	44.28	9.475	61.52	22.5	1.3893	2.3746	58.14	70.37
Lac	18.53	27.16	122.5	53.35	6.6109	1.9642	86.86	66.26
Mal	28.53	51	176.5	35.01	6.1864	0.6864	86.08	40.7
Man	63.36	48.15	62.02	18.33	0.9788	0.3806	49.46	27.57
Sac	130.8	55.85	0.65	35.01	0.0049	0.6268	0.494	38.53
Sor	70.2	101	3.94	22.5	0.0561	0.2227	5.31	18.21
Fru	48.79	48.93	0.583	13.33	0.0119	0.2724	1.18	21.41

Tabla 8- Comparación de la Relación Proteína-Carbohidrato de fracciones enriquecidas de hoja de *Ruta graveolens* extraídas con NaCl y Tris-HCl





#### *7.2.1.4. Comparación del efecto Hemaglutinante en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de R. graveolens*

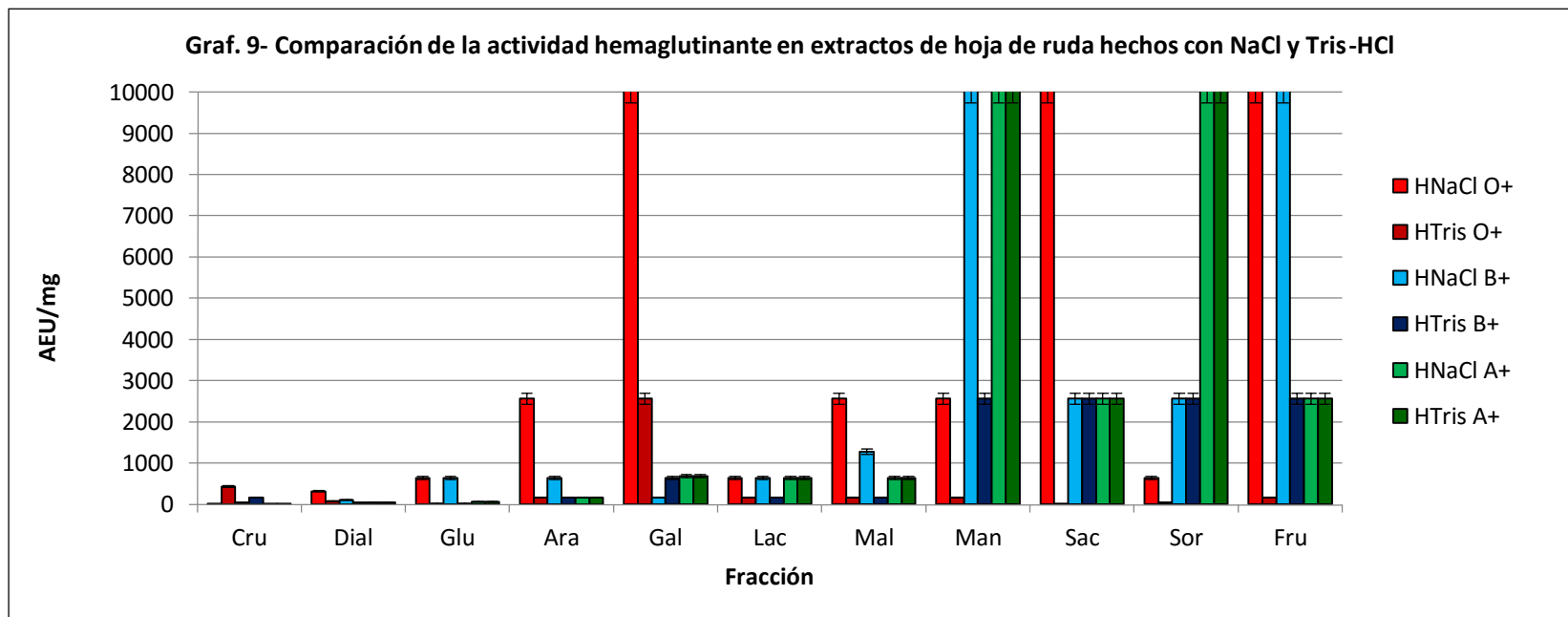
Como parte de la caracterización biológica se evaluó la hemaglutinación de las lectinas vegetales. La tabla 9 y la Gráfica 9 muestran que las fracciones de hoja extraídas con NaCl presentan una mayor capacidad aglutinante en los tres grupos sanguíneos en comparación con las fracciones extraídas con Tris-HCl. Podemos observar que conforme se da el proceso de semipurificación la actividad hemaglutinante va incrementando, ya que en los extractos crudos y dializados solo se alcanzan de 7 a 400 AEU/mg.

Para las fracciones del extracto de NaCl en el grupo sanguíneo O+ el promedio fue de 3695.18 AEU/mg, siendo las fracciones de galactosa, sacarosa y fructosa las que presentaron una mayor actividad, para el grupo sanguíneo B+ un promedio de 2646.06 AEU/mg, principalmente dado por las fracciones de manitol y fructosa, mientras para el grupo sanguíneo A+ el promedio de AEU/mg fue de 2530.78, con mayor actividad en las fracciones de manitol y sorbitol.

Las fracciones de hoja extraídas por medio de Tris-HCl mostraron una actividad hemaglutinante (AEU/mg) en promedio para el grupo sanguíneo O+ de 382.5 AEU/mg, siendo la fracción de galactosa la que presentó una mayor actividad, para el grupo sanguíneo B+ el promedio fue de 1264.44 AEU/mg, con un mayor efecto en las fracciones de manitol, sacarosa, sorbitol y fructosa, mientras para el grupo sanguíneo A+ las fracciones que presentaron mayor aglutinación fueron manitol y sorbitol, con un promedio de 3087.44 AEU/mg.

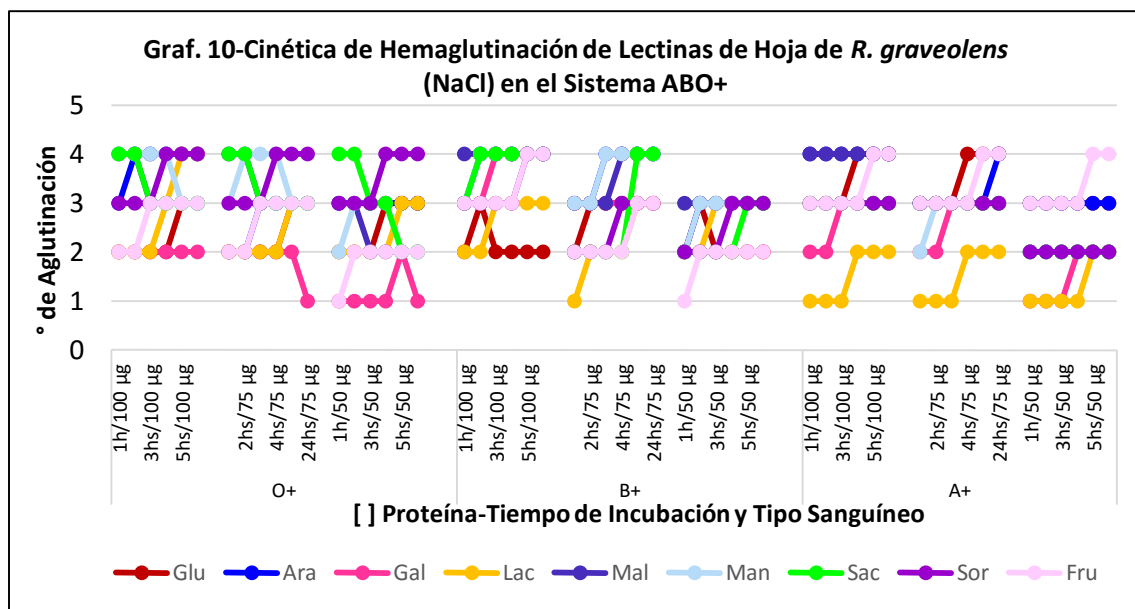
Fracc	[ ] Prot mg HNaCl	[ ] Prot mg HTri-HCl	O+				B+				A+				Rendimiento % HNaCl	Rendimiento % HTri-HCl
			Hoja NaCl		Hoja Tris-HCl		Hoja NaCl		Hoja Tris-HCl		Hoja NaCl		Hoja Tris-HCl			
			UHA	AEU/mg	UHA	AEU/mg	UHA	AEU/mg	UHA	AEU/mg	UHA	AEU/mg	UHA	AEU/mg		
Cru	1459.2	4633.6	2	7.01	32	426.6	4	40	32	426.6	2	7.0	16	160	100	100
Dial	924.69	1721.61	16	320	8	80	8	106.6	16	320	8	44.6	4	40	63.32	37.15
Glu	121.5	169.2	16	640	2	20	16	640	16	640	8	66.1	2	20	8.29	3.651
Ara	11.42	51.72	32	2560	8	160	16	160	64	10240	8	160	8	160	0.782	1.116
Gal	9.475	44.28	64	10240	32	2560	8	640	32	2560	64	680.8	16	640	0.6493	0.955
Lac	27.16	18.53	16	640	8	160	16	640	32	2560	16	640	8	160	1.86	0.399
Mal	51	28.53	32	2560	8	160	32	1280	32	2540	16	640	8	160	3.49	0.615
Man	48.15	63.36	32	2560	8	160	64	10240	8	160	64	10240	32	2560	3.29	1.36
Sac	55.85	130.8	64	10240	2	9.174	32	2560	16	640	32	2560	32	2560	3.82	2.82
Sor	101	70.2	16	640	4	53.33	32	2560	8	160	64	10240	32	2560	6.92	1.51
Fru	48.93	48.79	64	10240	8	160	64	10240	64	10240	32	2560	32	2560	3.35	1.05

Tabla 9- Comparación de la Actividad Hemaglutinante de Fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de hoja de *Ruta graveolens* extraídas con NaCl y Tris-HCl. UHA= el recíproco de la dilución más alta que muestra aglutinación (2<sup>n</sup>). Actividad Especifica= unidades de hemaglutinación (UHA)/mg



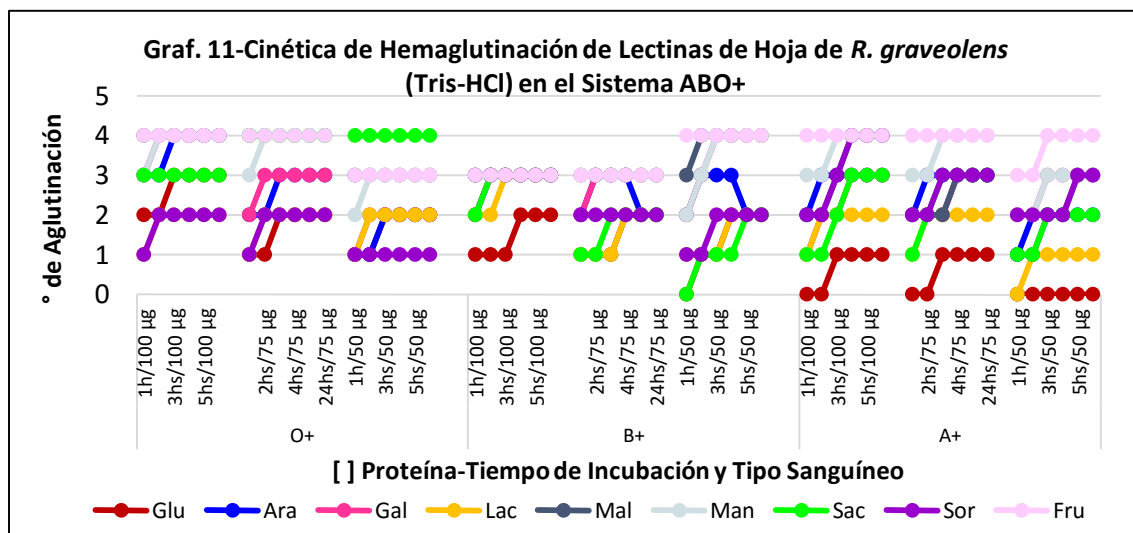
7.2.1.5. Comparación de la Cinética del Efecto Hemaglutinante en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de *R. graveolens*

Las fracciones de hoja extraídas con NaCl en el grupo sanguíneo O+ presentan grados 4 de aglutinación a una concentración de 100 µg, de las cuales las fracciones de maltosa, manitol y sacarosa fueron las que presentaron la máxima aglutinación después de una hora de incubación; mientras que la fracción de fructosa no mostró una aglutinación mayor a 2 a la misma concentración. Para el grupo B+ a concentraciones de 100 µg la mayoría de las fracciones presentaron su mayor pico de aglutinación a las dos horas de incubación, excepto la fracción de maltosa que a una hora tuvo su mayor grado de aglutinación, en el caso de glucosa después de alcanzar su máximo grado de aglutinación, a medida que pasa el tiempo el grado de aglutinación disminuye. En el grupo sanguíneo A+ la fracción de lactosa es la que presenta un menor grado de aglutinación y requiere de tres horas para alcanzar su máxima aglutinación; contrario a lo que se obtuvo para arabinosa, maltosa y manitol, que a una hora su máximo grado de aglutinación fue de 4. En éste tipo sanguíneo no incrementa el tiempo de incubación, pero disminuye el grado de hemaglutinación al disminuir la concentración de proteína, contrario a O+ y B+ donde a medida que disminuye la concentración aumenta el tiempo para alcanzar el efecto máximo de aglutinación (Gráfica 10).



Las fracciones de hoja extraídas con Tris-HCl en el grupo sanguíneo O+, a una concentración de 100 µg presentaron un grado de aglutinación 4; sin embargo solo las fracciones de maltosa y fructosa alcanzaron este punto a una hora de incubación, mientras las fracciones como galactosa, manitol y arabinosa necesitaron un mayor tiempo para alcanzar su máximo grado de aglutinación. En el caso de sacarosa a una concentración de 50 µg, se presentó el máximo efecto de 4 a una hora de incubación.

Para el grupo sanguíneo B+, las fracciones de hoja extraídas con Tris-HCl presentaron un mayor grado de aglutinación a una concentración de 50 µg; sin embargo se observaron variaciones en el tiempo necesario de incubación, ya que fructosa a una hora alcanzó el grado máximo de aglutinación, en tanto maltosa, manitol y galactosa tuvieron de 2 a 3 horas de incubación para tener un grado 4 de aglutinación. Por su parte, en el grupo sanguíneo A+ no se presentaron diferencias significativas al variar la concentración de proteína, solo en manitol a una concentración de 50 µg el grado máximo de aglutinación disminuye. En general, el tiempo de incubación mínimo requerido para alcanzar el mayor grado de aglutinación es de dos horas para la mayoría de las fracciones (Gráfica 11).



### 7.2.1.6. Comparación de la Inhibición del Efecto Hemaglutinante en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de *R. graveolens*

Las fracciones enriquecidas del extracto de hoja obtenido por NaCl presentaron alta afinidad para azúcares como glucosa, arabinosa, lactosa, manitol, sacarosa, sorbitol y fructosa, ya que se requiere una concentración de carbohidratos menor a 10  $\mu$ M, mientras que para azúcares como maltosa y galactosa estas mismas fracciones presentan baja afinidad al requerir una concentración de 100 mM del carbohidrato (Tabla 10).

Frac	[Gluco]	[Arabin]	[Galac]	[Lacto]	[Maltosa]	[Manit]	[Sacar]	[Sorbit]	[Fructo]
<b>Glu</b>	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Ara</b>	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Gal</b>	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Lac</b>	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Mal</b>	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Man</b>	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Sac</b>	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Sor</b>	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	200mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Fru</b>	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M

Tabla 10- Inhibición de la Hemaglutinación de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de hoja de *R. graveolens* (NaCl)

La tabla 11 muestra que las lectinas presentes en las fracciones del extracto de hoja (Tris-HCl) presentaron alta afinidad para carbohidratos como arabinosa, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa, sorbitol y fructosa, ya que en concentraciones  $\mu$ M se presenta un proceso de inhibición de la hemaglutinación; mientras que se requieren concentraciones mM para carbohidratos como glucosa y galactosa, mostrando baja afinidad para estos.

Frac	[Gluco]	[Arabin]	[Galac]	[Lacto]	[Malto]	[Manit]	[Sacar]	[Sorbit]	[Fructu]
<b>Glu</b>	200mM	< 10 $\mu$ M	200mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Ara</b>	100mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Gal</b>	100mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Lac</b>	100mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Mal</b>	100mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Man</b>	100mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Sac</b>	100mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Sor</b>	100mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M
<b>Fru</b>	100mM	< 10 $\mu$ M	100mM	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M	< 10 $\mu$ M

Tabla 11- Inhibición de la Hemaglutinación de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de hoja de *R. graveolens* (Tris-HCl)

7.2.1.7. Comparación del Peso Molecular en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de *R. graveolens*

La Figura 20 muestra el patrón electroforético de las fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de la hoja de ruda, obtenidas por medio de una extracción salina con NaCl. Donde el promedio de número de bandas presentes es de 2 y 6, las que presentan un rango de peso molecular de 12 a 125 kDa; de las cuales las fracciones que presentan un mayor número de bandas son: arabinosa, galactosa, lactosa y fructosa.

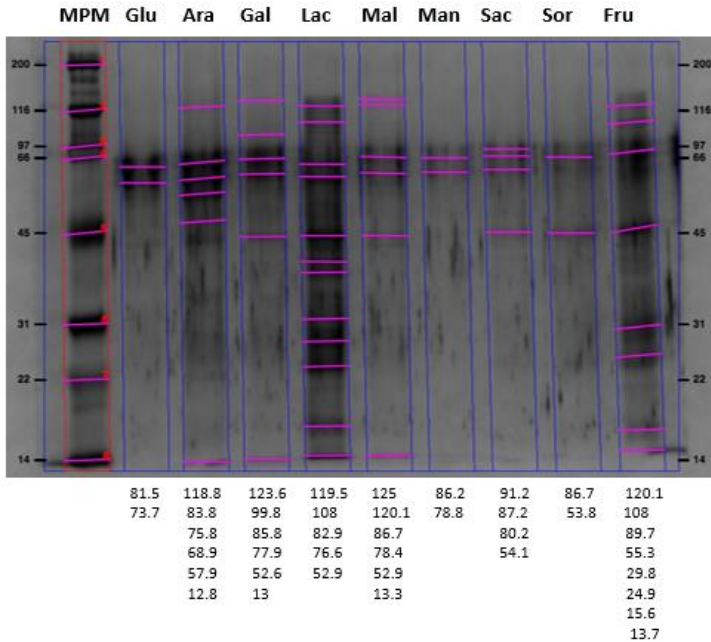


Fig. 20- Patrón Electroforético de Fracciones enriquecidas del extracto de hoja de *R. graveolens* extraído con NaCl. MPM (marcador de peso molecular), en la parte superior azúcares con los que se realizó la elución cromatografía. Parte inferior número y peso molecular (kDa) de proteínas presentes en cada una de las fracciones.

En la figura 21 se observa el patrón electroforético de las fracciones de hoja obtenidas por medio de la extracción salina con Tris-HCl; las cuales presentan un número promedio de 2 bandas, con un rango de peso molecular de 12 a 112 kDa. Donde las fracciones de galactosa y sacarosa son las que presentan un mayor número de bandeos.

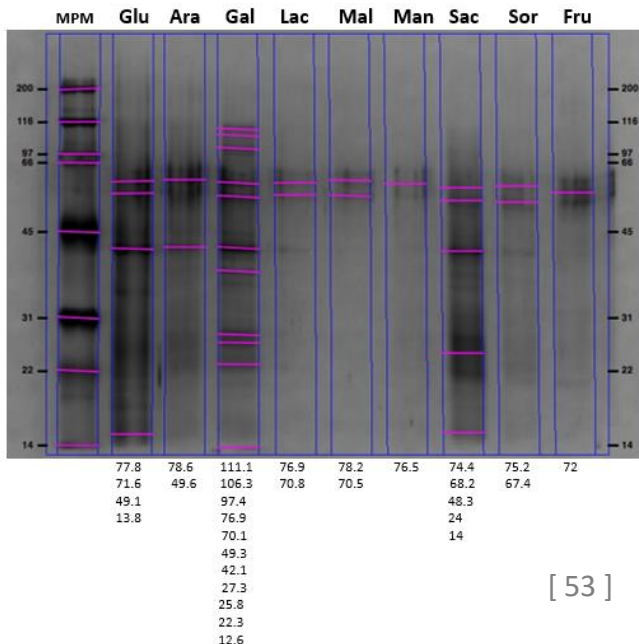
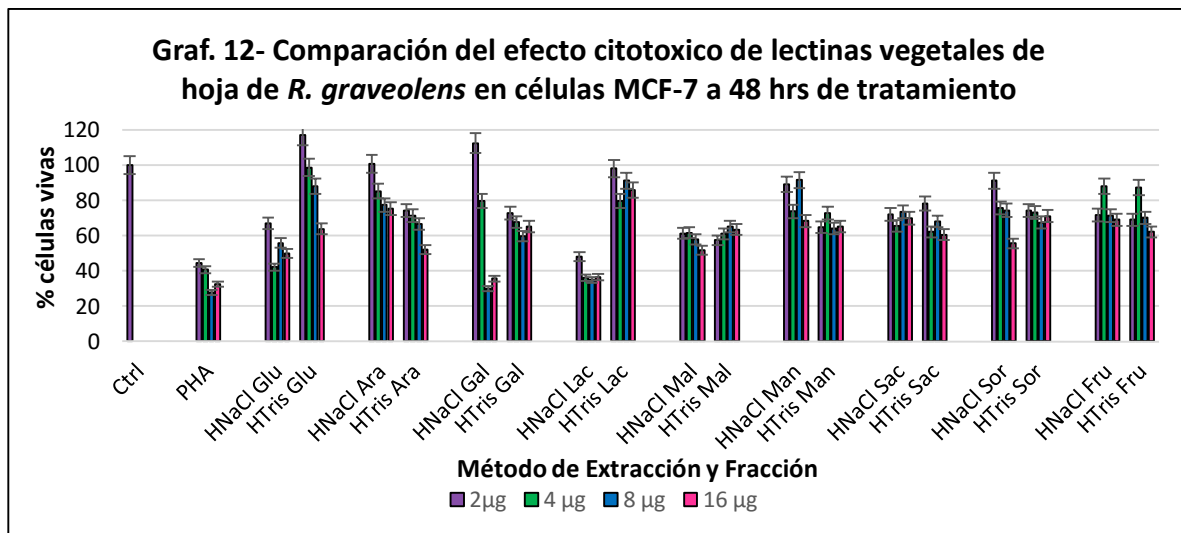


Fig. 21- Patrón Electroforético de Fracciones enriquecidas del extracto de hoja de *R. graveolens* extraído con Tris-HCl. MPM (marcador de peso molecular), en la parte superior azúcares con los que se realizó la elución cromatografía. Parte inferior Número y peso molecular (kDa) de proteínas presentes en cada una de las fracciones.

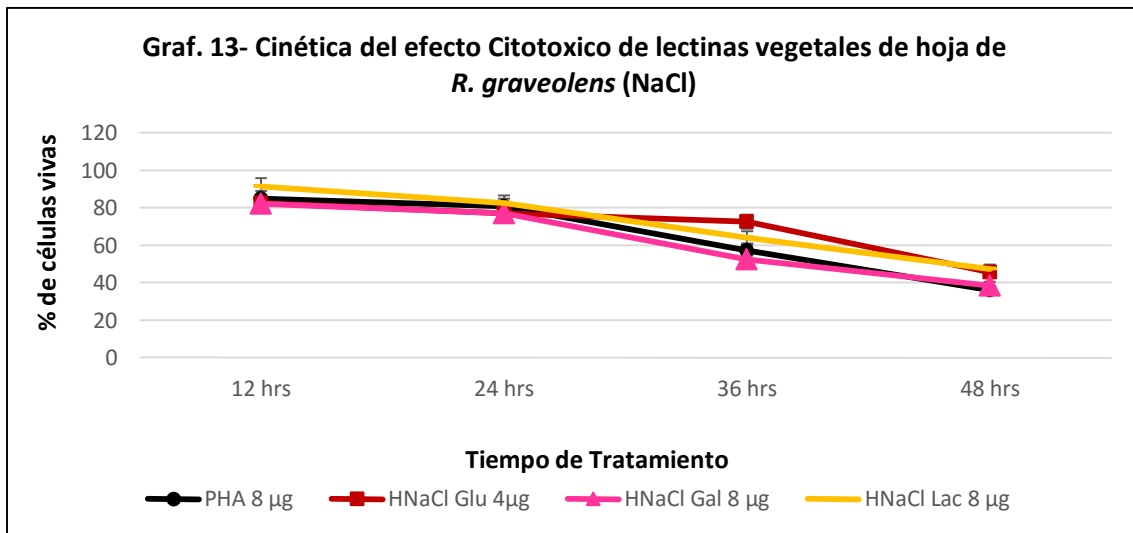
7.2.1.8. Comparación del efecto Citotoxico en células MCF-7 por dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Hoja de *R. graveolens*

En la Gráfica 12 se muestran las diferencias del efecto citotoxico dado por lectinas vegetales de hoja de ruda que fueron extraídas con diferente solución, donde la citotoxicidad de las fracciones de NaCl en promedio fue del 20.82 % en una concentración de 2 µg, 32.58 % a 4 µg, 37.1 % a 8 µg y 43.25 % en una concentración de 16 µg; de las cuales las fracciones que presentaron un efecto citotoxico mayor al 50 % son: glucosa a 16 µg, galactosa y lactosa a 8 µg, contrario al efecto proliferativo que tuvo la fracción de galactosa en una concentración de 2 µg. El efecto citotoxico presentado por las fracciones de Tris-HCl en células MCF-7 fue del 25.81 % en una concentración de 2 µg, 25.21 % a 4 µg, 28.96 % a 8 µg y 34.57 % en una concentración de 16 µg, en general estas fracciones presentaron una reducción del 27.6 %, por lo cual no se presentaron fracciones con un efecto citotoxico del 50 %, siendo las que tuvieron mayor disminución celular las fracciones de arabinosa a 16 µg y maltosa a 2 µg, contrario al efecto proliferativo que tuvo la fracción de glucosa en una concentración de 2 µg. Al comparar con PHA, que tuvo una disminución del 60 al 70 %, observamos que las fracciones extraídas con ambos métodos presentan una menor citotoxicidad.

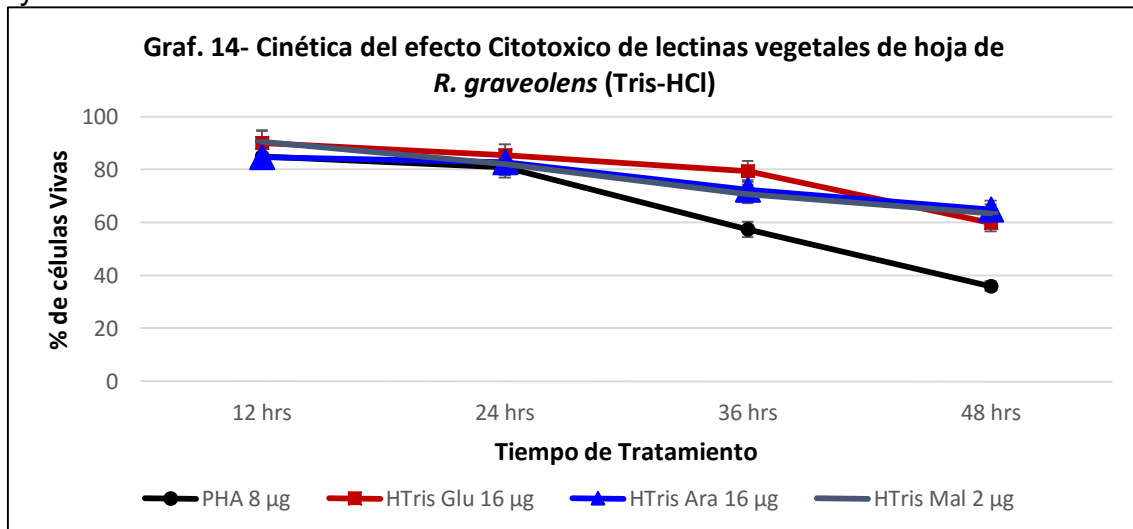


7.2.1.9. *Cinética del efecto Citotoxico sobre células MCF-7 de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de Hoja de R. graveolens obtenidas por dos métodos de extracción*

Para la cinética del efecto citotoxico, se utilizaron solo las fracciones que presentaron una citotoxicidad mayor al 50 %, en las concentraciones a las que presentaron este efecto. La gráfica 13 muestra una reducción promedio a las 12 hrs de incubación del 14.56 %, de 21.03% a las 24 hrs de incubación, de 36.98 % a las 36 hrs y 56.22 % en la reducción de células después de 48 hrs de incubación. Donde la fracción de galactosa es la que presenta un mayor efecto citotoxico a las 48 hrs de tratamiento.



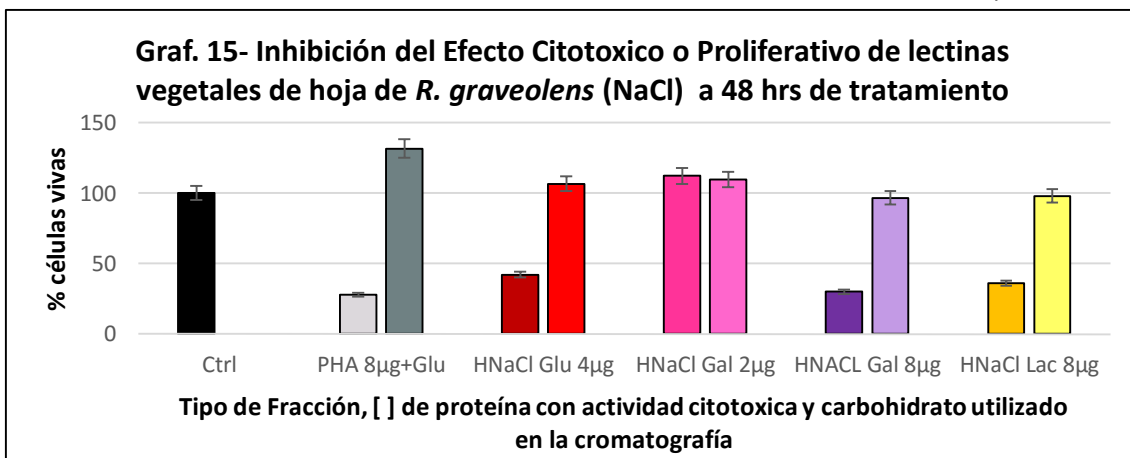
La gráfica 14 muestra la reducción dada por las fracciones de hoja extraídas con Tris-HCl que en promedio a las 12 hrs de incubación fue 11.63 %, 16.58 % a las 24 hrs de incubación, 25.87 % a las 36 hrs y 37.31 % en la reducción de células después de 48 hrs de incubación. La fracción de glucosa es la que presentó un mayor efecto citotoxico a las 48 hrs de tratamiento.



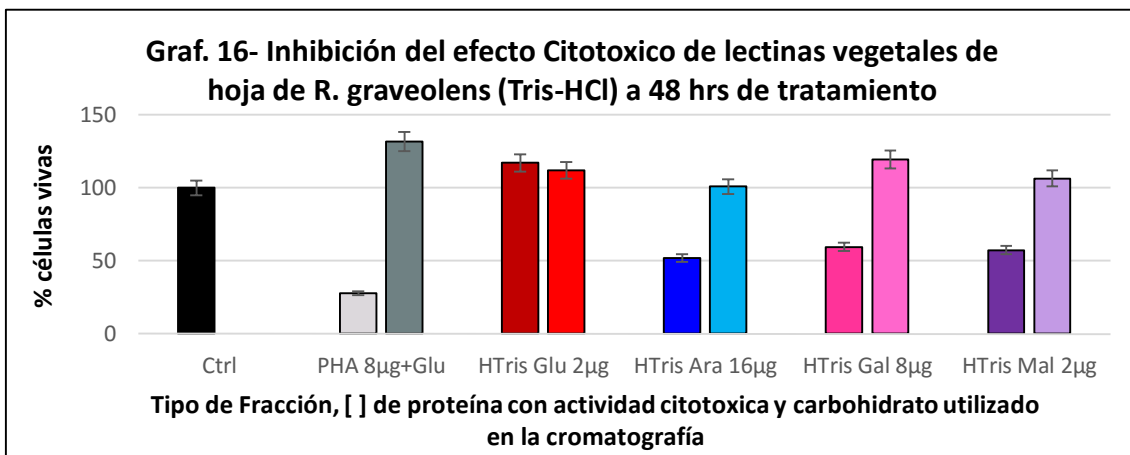


**7.2.1.10. Inhibición del efecto Citotóxico/ Proliferativo sobre células MCF-7 de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de Hoja de *R. graveolens* obtenidas por dos métodos de extracción**

El ensayo de inhibición muestra que, al adicionar el azúcar utilizado en la elución cromatográfica, las fracciones de NaCl que fueron citotóxicas en la prueba de citotoxicidad presentan un efecto proliferativo aproximadamente del 6 al 10% en glucosa y galactosa, mientras que la fracción de lactosa disminuye un 32 % su efecto citotóxico. La fracción de galactosa que presentó un efecto proliferativo, en presencia del carbohidrato, disminuye su capacidad de proliferación en un 15 %. Para el control positivo (PHA) observamos que en presencia de glucosa pierde su efecto citotóxico e incrementa en cuatro veces la cantidad de células (Gráfica 15).



Para el extracto de hoja realizado con Tris-HCl, las fracciones que presentaron un efecto citotóxico en la prueba de inhibición incrementaron la cantidad de células respecto al control, donde las fracciones de glucosa, galactosa y maltosa incrementaron en un 6 a 20 % la proliferación, al comparar con PHA que incrementa un 35 % la cantidad celular, mostraron una menor proliferación en presencia del carbohidrato; mientras la fracción de arabinosa, solo presentó un incremento del 0.93 %. En el caso de glucosa que tuvo un efecto proliferativo disminuyó en un 6 % su actividad mitogénica en presencia del carbohidrato (Gráfica 16).

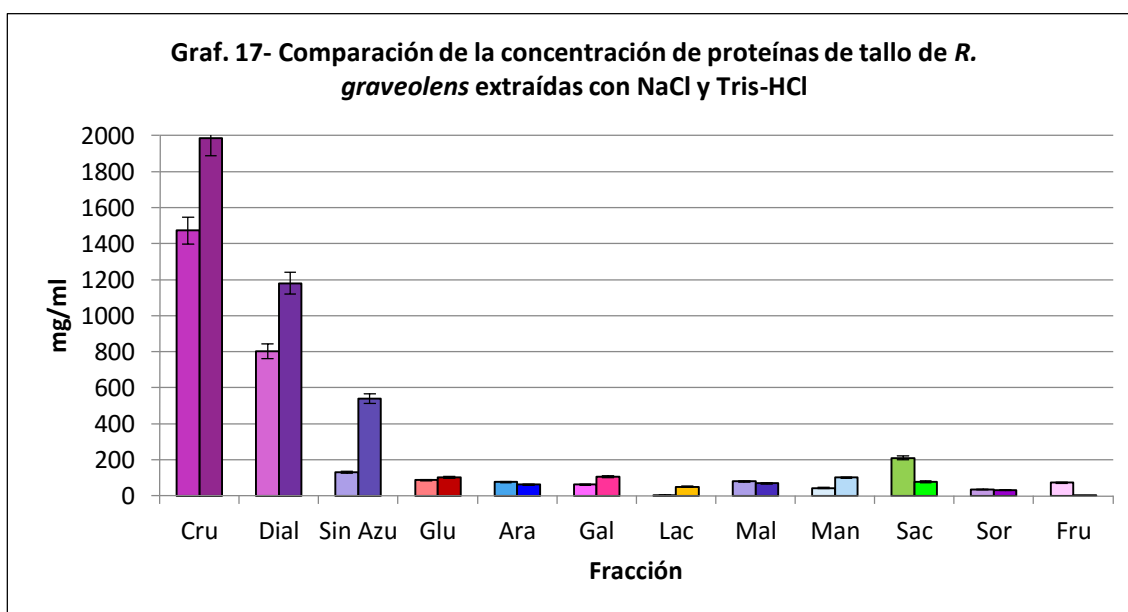


## 7.2.2. Lectinas Vegetales de Tallo de *R. graveolens*

### 7.2.2.1. Comparación de la concentración proteínas en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de *R. graveolens*

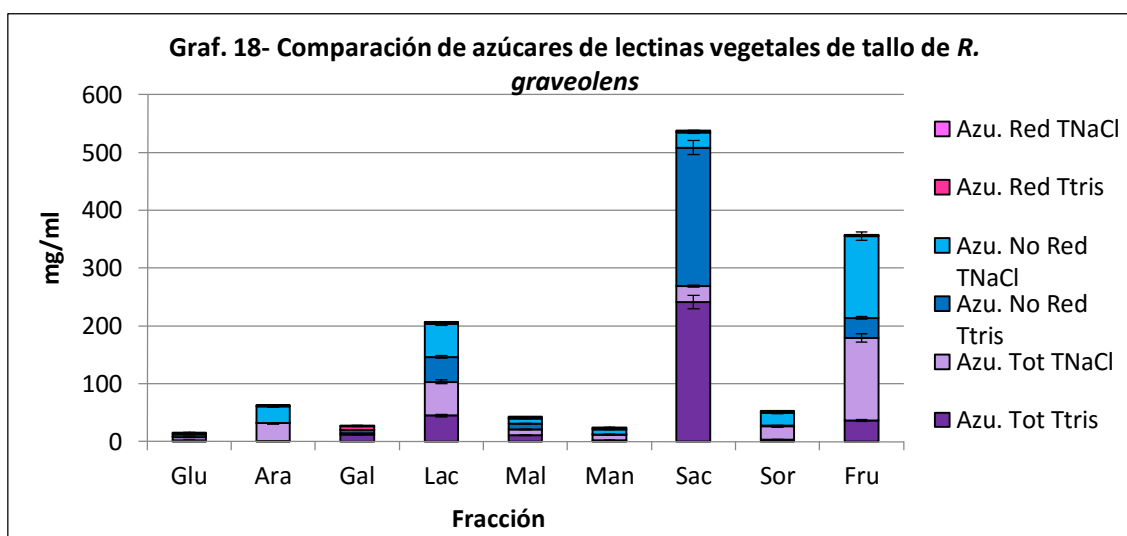
De la misma forma que en hoja, al comparar la concentración de proteínas obtenidas por diferentes métodos de extracción (NaCl y Tris-HCl) en los extractos crudos la obtención de proteínas totales fue mayor en la extracción con Tris-HCl. Mientras que en los extractos dializados se observa la presencia de un 22.9 % de proteínas con un peso menor a 3 kDa en la extracción con NaCl y en la extracción con Tris-HCl del 40.6 %.

Para el caso del extracto de tallo con NaCl se presenta un rendimiento en la obtención de proteínas tipo lectina del 45.33 % respecto del total de proteínas obtenidas, dando un rendimiento neto por cada 100 gr de material vegetal del 0.667 %, donde las fracciones obtenidas presentan en promedio 74.15 mg de proteína, de lo cual las fracciones que tuvieron un mayor contenido de proteínas son sacarosa, glucosa y maltosa. Con la extracción de tallo realizado por medio de Tris-HCl, se obtuvo un rendimiento en la obtención de lectinas vegetales del 30.02 % respecto del total proteico obtenido, lo que corresponde a un rendimiento neto de 0.596 % por cada 100 gr de material vegetal, presentando aproximadamente 66.3 mg por fracción, de las cuales las fracciones que obtuvieron un mayor contenido de proteínas son: glucosa, galactosa y manitol (Gráfica 17).



### 7.2.2.2. Comparación de la concentración de carbohidratos en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de *R. graveolens*

Para los extractos de tallo, las fracciones del extracto de Tris-HCl presentaron una concentración de azúcares totales (AT) fue de 39.34 mg, 37.2 mg de azúcares no reductores (ANR) y 2.14 mg de azúcares reductores (AR), que corresponde al 37.23 %, siendo las fracciones de sacarosa y lactosa las que presentan mayor concentración de carbohidratos. Mientras las fracciones extraídas con NaCl presentan una concentración promedio de: 34.43 mg de AT, 33.16 mg de ANR y 1.26 mg de AR, que representan el 31.7 %; de las cuales las fracciones de fructosa y lactosa tienen mayor proporción de carbohidratos. Así mismo, en ambos métodos se presenta una mayor proporción de carbohidratos no reductores (Gráfica.18).

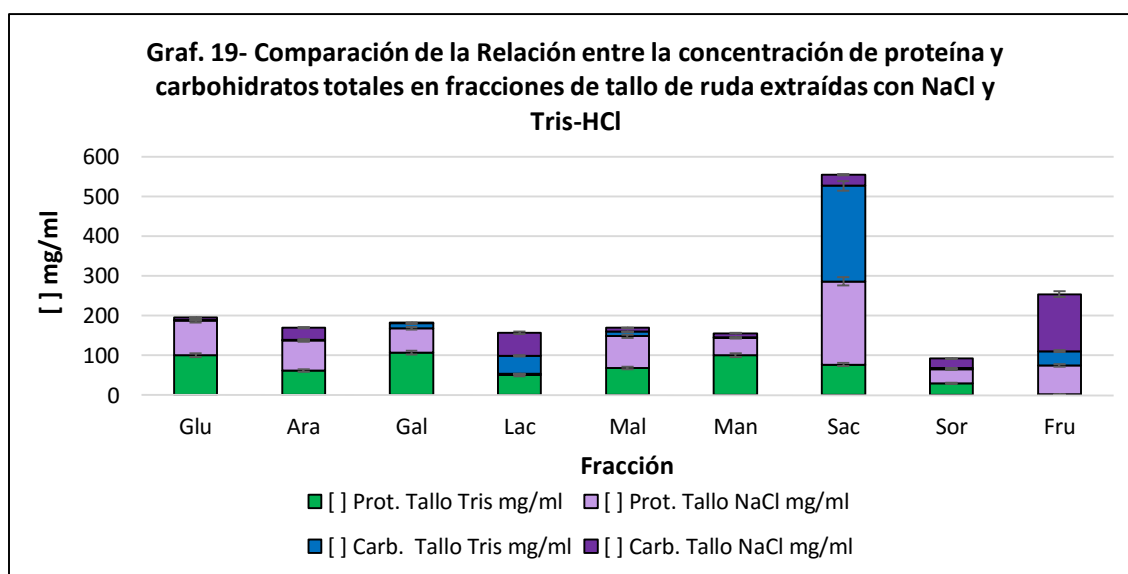


### 7.2.2.3. Comparación de la relación Proteína-Carbohidrato en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de *R. graveolens*

La Gráfica 19 y tabla 12 indican que al comparar la relación proteína-carbohidrato (P-C) en las fracciones de tallo por ambos métodos de extracción, la mayoría de las fracciones no muestran diferencias significativas; ya que la relación P-C en las fracciones de NaCl es aproximadamente de 2.09 mg de carbohidrato por cada mg de proteína, siendo las fracciones de lactosa y fructosa las que presentaron una mayor relación. Para las fracciones de Tris-HCl donde el promedio de la relación P-C es de 2.49 mg de carbohidrato por cada mg de proteína; donde la fracción de fructosa es la que presentó una mayor relación.

Fracción	[ ] Prot. TTris-HCl mg/ml	[ ] Prot. TNaCl mg/ml	[ ] Carb. TTris-HCl mg/ml	[ ] Carb. TNaCl mg/ml	Relación P/C TTris-HCl	Relación P/C TNaCl	% Carb. De masa total TTris-HCl	% Carb. De masa total TNaCl
Glu	100.8	86.4	1.98	5.83	0.0196	0.06747	1.9	6.3
Ara	61.62	75.9	1.37	30.01	0.02228	0.3953	2.1	28.3
Gal	106.8	61.65	12.5	1.23	0.1170	0.0199	10.4	1.9
Lac	49.92	3.83	45.01	58.29	0.9016	15.2193	47.4	93.8
Mal	68.4	79.76	11	10.36	0.1608	0.1298	13.8	11.4
Man	100.44	43.06	2.14	10	0.02133	0.2322	2	18.8
Sac	76.8	208.9	241.08	27.85	3.1390	0.1333	75.8	11.7
Sor	30	35.3	3	23.34	0.1	0.6611	9	39.8
Fru	2	72.55	36	143	18	1.9710	94.7	66.3

Tabla 12- Comparación de la Relación Proteína-Carbohidrato de fracciones enriquecidas de tallo de *Ruta graveolens* extraídas con NaCl y Tris-HCl



#### 7.2.2.4. Comparación del efecto Hemaglutinante en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de *R. graveolens*

Al comparar la capacidad hemaglutinante de las fracciones de tallo obtenidas por los dos métodos de extracción se encontraron diferencias significativas. Observamos que conforme se da el proceso de semipurificación se incrementa la actividad hemaglutinante, ya que los extractos crudos tuvieron una actividad hemaglutinante de 80 AEU/mg, mientras los extractos dializados incrementaron esta actividad a 640 AEU/g.

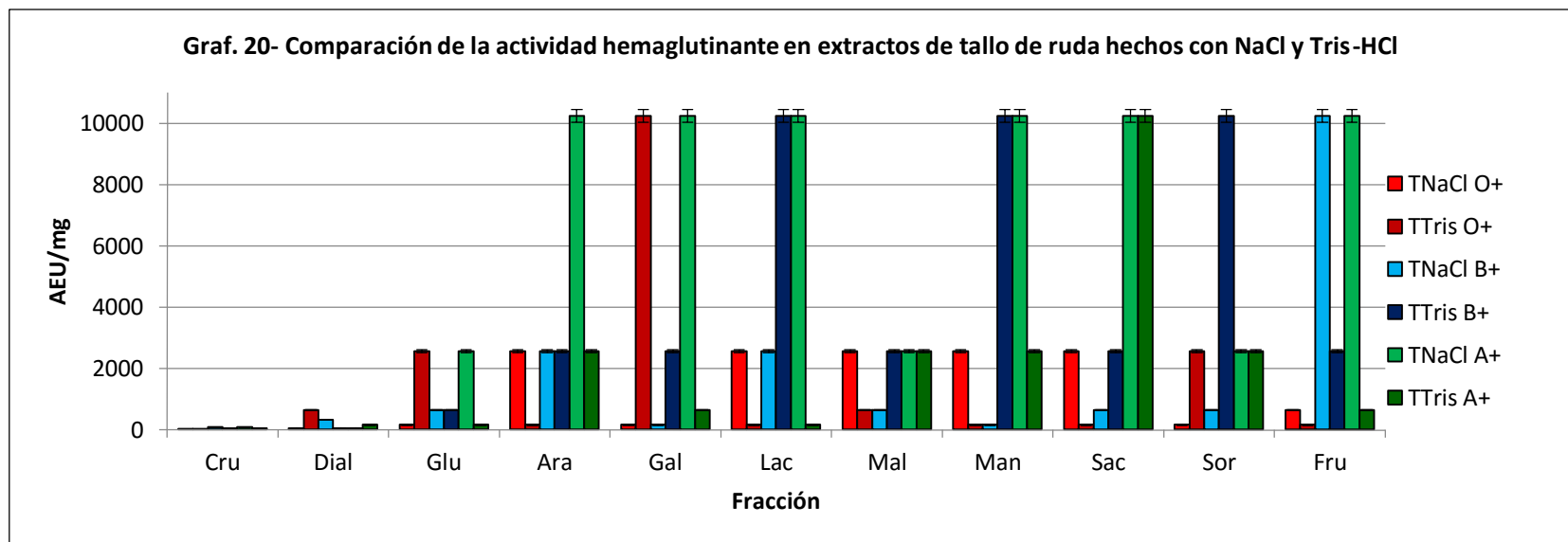
Podemos ver en la tabla 13 y Gráfica 20 que las fracciones de tallo obtenidas por Tris-HCl presentan para el grupo sanguíneo O+ una actividad hemaglutinante promedio de 1866.66 AEU/mg dado principalmente por la fracción de galactosa; en el grupo sanguíneo B+ fue de 4906.66 AEU/mg, dado por las fracciones de lactosa,

manitol y sorbitol. Mientras la fracción que presentó mayor actividad hemaglutinante en el grupo sanguíneo A+ fue sacarosa, con un promedio de 2453.33 AEU/mg.

Para el grupo sanguíneo O+, las fracciones extraídas con NaCl mostraron una actividad hemaglutinante de 1546.66 AEU/mg, siendo reconocida principalmente por las fracciones de arabinosa, lactosa, maltosa, manitol y sacarosa; para el grupo B+ se presentó una actividad hemaglutinante de 2026.66 AEU/mg, principalmente en las fracciones de arabinosa, lactosa y fructosa, mientras que en el grupo sanguíneo A+ la actividad hemaglutinante fue de 7680 AEU/mg, dado por las fracciones de arabinosa, galactosa, lactosa, manitol, sacarosa y fructosa.

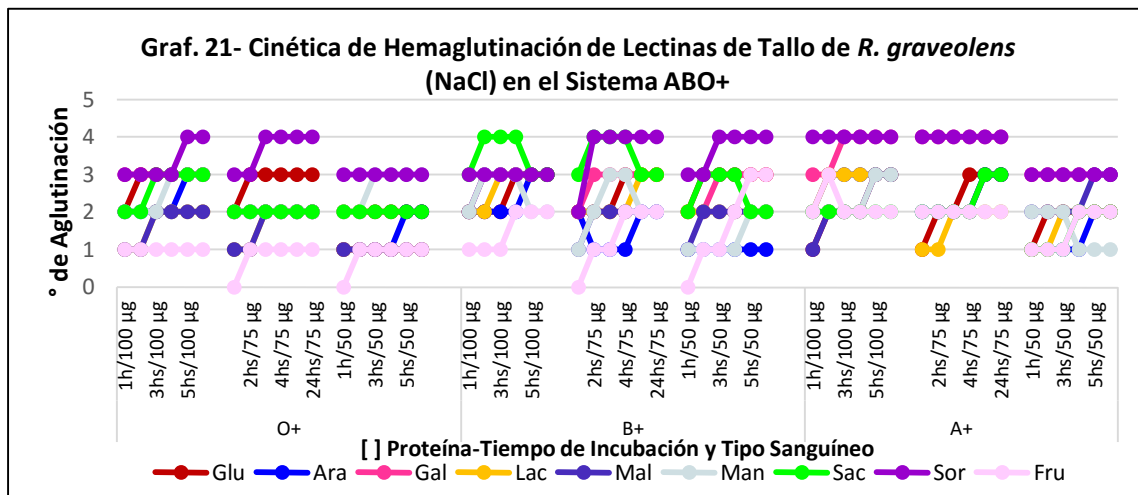
Frac	[ ] Prot mg TNaCl	[ ] Prot mg TTris- HCl	O+				B+				A+				Rendimiento % TNaCl	Rendimiento % TTris-HCl
			Tallo NaCl		Tallo Tris-HCl		Tallo NaCl		Tallo Tris-HCl		Tallo NaCl		Tallo Tris-HCl			
			UHA	AEU/mg	UHA	AEU/mg	UHA	AEU/mg	UHA	AEU/mg	UHA	AEU/mg	UHA	AEU/mg		
Cru	1472.6	1987.2	2	13.03	2	3.7	8	80	4	40	80	80	4	40	100	100
Dial	1135.4	1180.3	4	53.3	16	640	16	320	4	53.33	4	53.33	8	160	77.1	59.38
Glu	86.4	100.8	8	160	32	2560	16	640	16	640	32	2560	8	160	5.86	5.07
Ara	75.9	61.62	32	2560	8	160	32	2560	32	2560	64	10240	32	2560	5.15	3.10
Gal	61.65	106.8	8	160	64	10240	8	160	32	2560	64	10240	16	640	4.18	5.37
Lac	3.83	49.92	32	2560	8	160	32	2560	64	10240	64	10240	8	160	0.26	2.51
Mal	79.76	68.4	32	2560	16	640	16	640	32	2560	32	2560	32	2560	5.41	3.44
Man	43.06	100.44	32	2560	8	160	8	160	64	10240	64	10240	32	2560	2.92	5.05
Sac	208.9	76.8	32	2560	8	160	16	640	32	2560	64	10240	64	10240	14.18	3.86
Sor	35.3	30	8	160	32	2560	16	640	64	10240	32	2560	32	2560	2.39	1.50
Fru	72.55	2	16	640	8	160	64	10240	32	2560	64	10240	16	640	4.92	0.10

Tabla 13- Comparación de la Actividad Hemaglutinante de Fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de tallo de *Ruta graveolens* extraídas con NaCl y Tris-HCl. UHA= el recíproco de la dilución más alta que muestra aglutinación (2<sup>n</sup>). Actividad Especifica= unidades de hemaglutinación (UHA)/mg



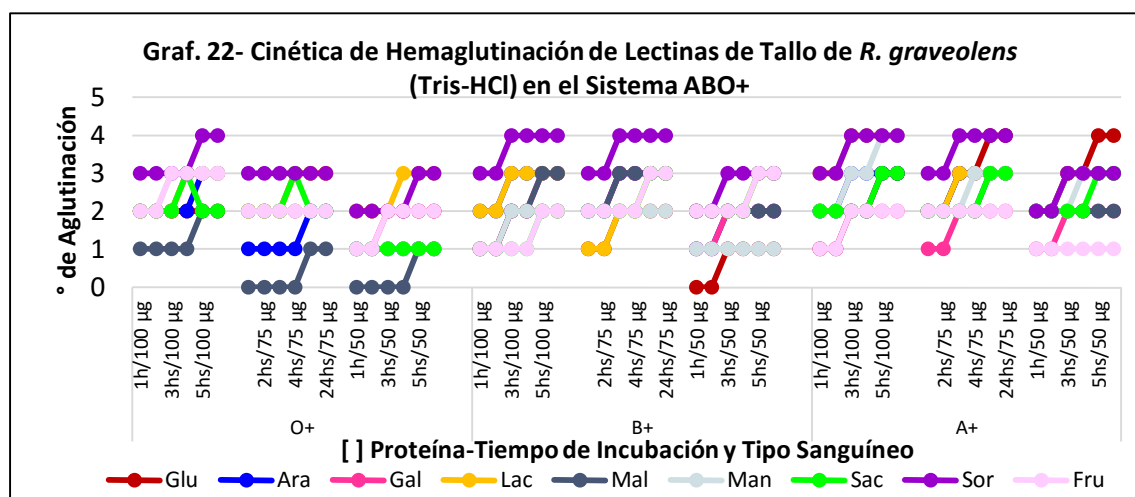
**7.2.2.5. Comparación de la Cinética del Efecto Hemaglutinante en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de *R. graveolens***

En la Gráfica 21 observamos que en el grupo sanguíneo O+ las fracciones de tallo extraídas con NaCl tuvieron un grado 3 máximo de aglutinación a una concentración de 100 µg y un tiempo de incubación mínimo de dos horas; excepto la fracción de sorbitol que a una concentración de 75 µg tuvo un 4 de aglutinación contrario a lo que ocurre a una concentración mayor, que presentó un mayor tiempo de incubación para alcanzar el mismo grado de aglutinación. En el grupo sanguíneo B+ observamos que a una concentración de 75 µg las fracciones de sacarosa y sorbitol a dos horas alcanzan un grado 4 de aglutinación, sin embargo para sacarosa a cinco horas disminuye su efecto; mientras que la mayoría de las fracciones alcanzan un grado 3 de aglutinación a una concentración de 100 µg. Para el grupo A+ las únicas fracciones que presentan un grado de aglutinación 4 son galactosa y sorbitol a 1 y 2 horas de incubación, respectivamente; mientras que a una concentración de 100 µg las fracciones de arabinosa, maltosa, glucosa, manitol y sacarosa solo tienen un grado 3 con un tiempo de incubación de 2 y 5 horas. Además se observa que al disminuir la concentración disminuye el grado de aglutinación y disminuye el tiempo de incubación.



En el grupo O+ las fracciones de tallo obtenidas con Tris-HCl a una concentración de 100 µg presentan un grado de aglutinación 3 y un tiempo de incubación de tres horas, donde la fracción de sorbitol es la más representativa para este tipo sanguíneo ya que es la única que alcanza un máximo grado de aglutinación; cabe destacar que en la mayoría de las fracciones a medida que disminuye la concentración de proteína disminuye el grado de aglutinación, pero no se modifica el tiempo de incubación. Para el grupo sanguíneo B+ se presentaron grados de

aglutinación 3 a 100 µg, mostrando su efecto máximo a 3 y 5 hrs, siendo sorbitol la única que tuvo grados de aglutinación 4; mientras que la fracción de fructosa fue la única que al disminuir la concentración de proteína incremento su grado máximo de aglutinación. Para el grupo A+ a tres horas de incubación se presentó su efecto máximo de aglutinación a las tres concentraciones con los mismos grados de aglutinación, menos lactosa, sorbitol y manitol (Gráfica 22).



### 7.2.2.6. Comparación de la Inhibición del Efecto Hemaglutinante en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de *R. graveolens*

Las lectinas vegetales presentes en las fracciones enriquecidas de tallo extraídas con NaCl presentaron alta afinidad a los diferentes azúcares utilizados en este estudio, ya que en concentraciones de 10 µM se inhibe la hemaglutinación.

La mayoría de las lectinas presentes en las fracciones de tallo obtenidas por la extracción con Tris-HCl presentaron alta afinidad a azúcares tales como: arabinosa, galactosa, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa, sorbitol y fructosa, ya que en una concentración µM se presenta una inhibición de la hemaglutinación; contrario al caso de glucosa que se requieren concentraciones mM para observar el mismo efecto (tabla 14).

Fracc	[Glucu]	[Arabin]	[Galac]	[Lacto]	[Malto]	[Manit]	[Sacar]	[Sorbit]	[Fructu]
Glu	100mM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM
Ara	100mM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM
Gal	100mM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM
Lac	100mM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM
Mal	100mM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM
Man	100mM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM
Sac	100mM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM
Sor	200mM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM
Fru	100mM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM	< 10µM

Tabla 14- Inhibición de la Hemaglutinación de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de tallo de *R. graveolens* (Tris-HCl)



### 7.2.2.7. Comparación del Peso Molecular en dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de *R. graveolens*

El patrón electroforético de las fracciones de tallo obtenidas por medio de la extracción con NaCl se presenta en la figura 22, donde el número promedio de bandas presentes en las fracciones fue de 4 y 5, con un rango de peso molecular de 10.5 a 133 kDa. De las cuales las fracciones de galactosa, lactosa y maltosa son las que mostraron un mayor número de bandas.

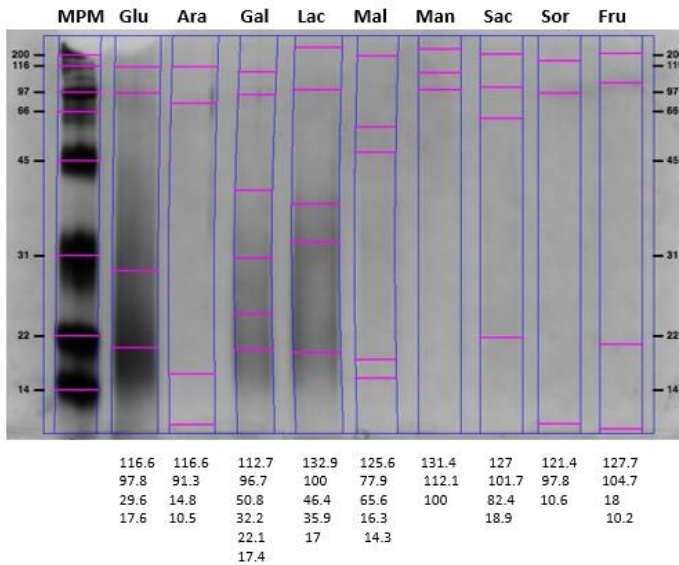


Fig. 22- Patrón Electroforético de Fracciones enriquecidas del extracto de tallo de *R. graveolens* extraído con NaCl. MPM (marcador de peso molecular), en la parte superior azúcares con los que se realizó la elución cromatografía. Parte inferior número y peso molecular (kDa) de proteínas presentes en cada una de las fracciones.

El rango de peso molecular que presentaron las fracciones de tallo extraídas con Tris-HCl fue de 15 a 175 kDa, con un promedio de 5 a 8 bandas presentes en las fracciones enriquecidas; siendo las fracciones de galactosa, sacarosa y fructosa las que mostraron un mayor número de bandeos (Figura 23).

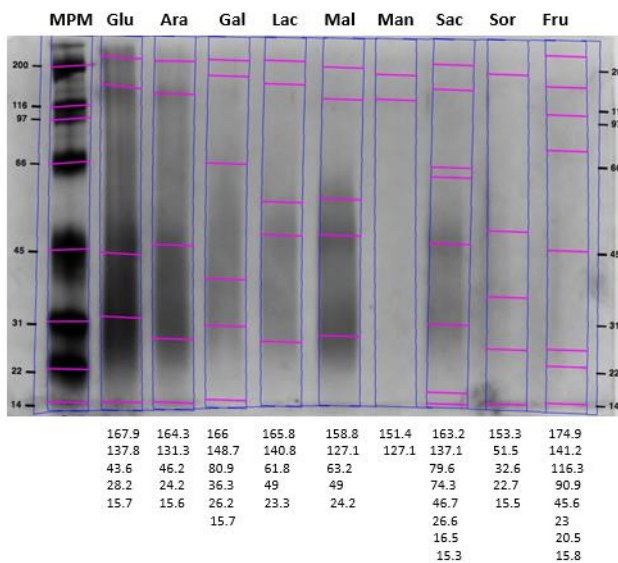
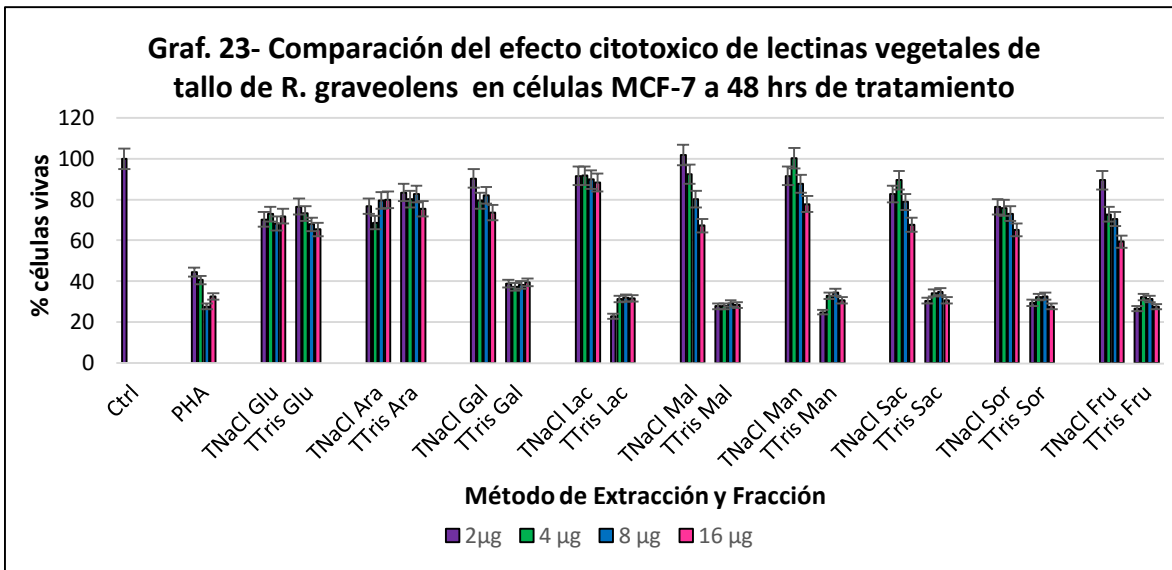


Fig. 23- Patrón Electroforético de Fracciones enriquecidas del extracto de tallo de *R. graveolens* extraído con Tris-HCl. MPM (marcador de peso molecular), en la parte superior azúcares con los que se realizó la elución cromatografía. Parte inferior número y peso molecular (kDa) de proteínas presentes en cada una de las fracciones.

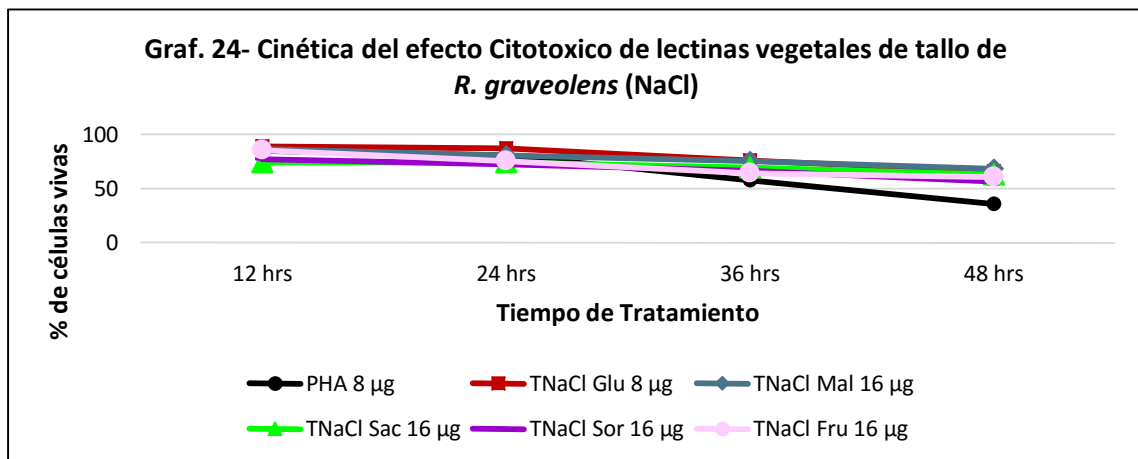
**7.2.2.8. Comparación del efecto Citotoxico en células MCF-7 por dos tipos de extracción de lectinas vegetales de Tallo de *R. graveolens***

Para las lectinas extraídas del tallo se observa en la Gráfica 23 que entre los dos tipos de extracción existen diferencias significativas, ya que en el caso de las fracciones de tallo (NaCl) solo se presenta un efecto citotoxico del 14.31 % en una concentración de 2 µg, del 17.37 % a 4 µg, 21.13 % utilizando una concentración de 8 µg y del 27.67 % en concentraciones de 16 µg. Las fracciones de glucosa, maltosa, sacarosa, sorbitol y fructosa mostraron una mayor citotoxicidad en una concentración de 16 µg. Mientras el efecto citotoxico dado por las lectinas presentes en el extracto de tallo (Tris-HCl) utilizando una concentración de 2 µg fue aproximadamente del 59.95 %, del 57.7 % en una concentración de 4 µg, del 57.52 % en una concentración de 8 µg y del 60.42 % al emplear una concentración de 16 µg; siendo las fracciones de galactosa, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa, sorbitol y fructosa las que presentaron una citotoxicidad mayor al 50 %, en concentraciones diferentes. Mientras el control positivo (PHA) presentó una citotoxicidad con la reducción del 60 al 70 %, respecto al control sin tratamiento.

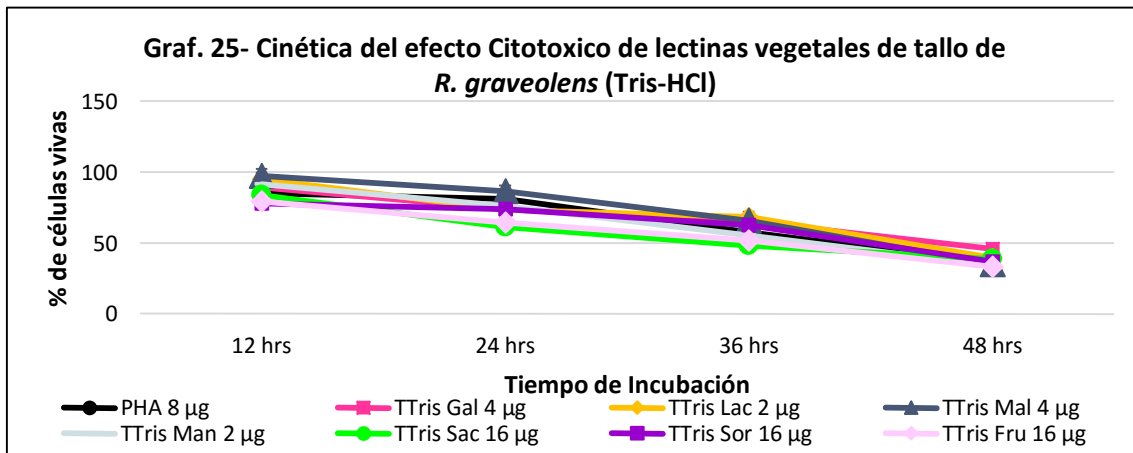


**7.2.2.9. Cinética del efecto Citotóxico sobre células MCF-7 de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de Tallo de *R. graveolens* obtenidas por dos métodos de extracción**

Las fracciones que presentaron un mayor efecto citotóxico fueron utilizadas para la determinación de la cinética de la citotoxicidad, utilizando la concentración a la que presentaron tal efecto. La gráfica 24 muestra la información sobre la cinética de la citotoxicidad dada por las fracciones de tallo (NaCl), donde a las 12 hrs de tratamiento se presenta una reducción del 17.48 %, a las 24 hrs una reducción del 22.13 %, a las 36 hrs el 29.66 % de reducción y a las 48 hrs de tratamiento se presentó una disminución de la cantidad celular del 37.24 %, de las cuales la fracción de sorbitol es la que mostro mayor capacidad citotóxica.

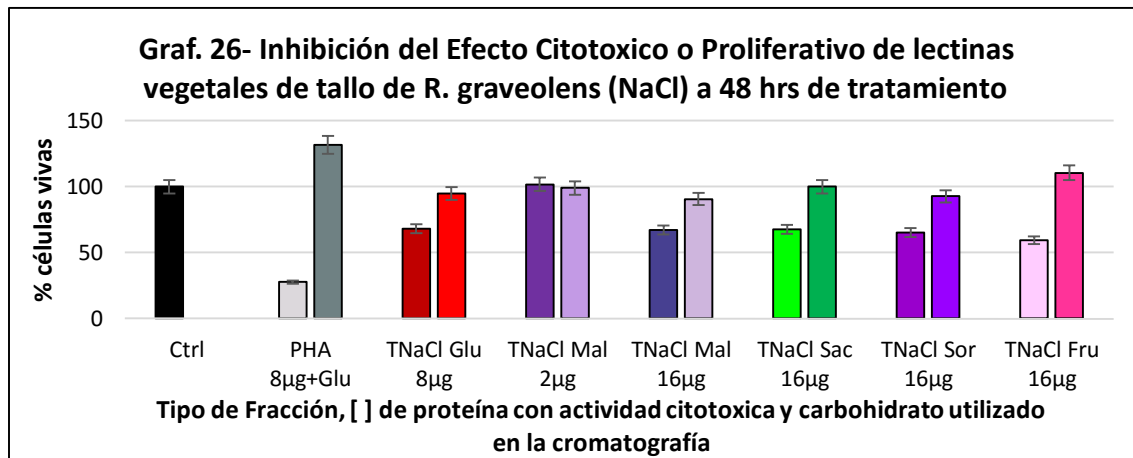


Las fracciones de tallo (Tris-HCl) que tuvieron alta actividad citotóxica fueron las que se utilizaron para determinar la cinética de su efecto citotóxico, empleando la concentración a la que presentaron dicho efecto. Para lo cual se tiene en la gráfica 25 que a las 12 hrs de tratamiento se presenta una reducción promedio del 12.35 %, a las 24 hrs una disminución celular del 27.38 %, 40.44 % a las 36 hrs y 62.47 % a las 48 hrs de tratamiento.

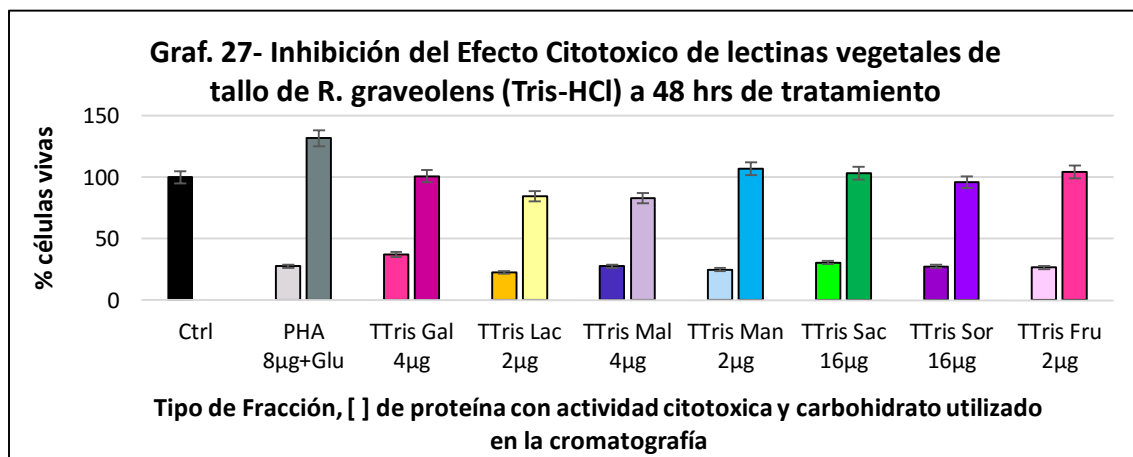


**7.2.2.10. Inhibición del efecto Citotóxico/ Proliferativo de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de Tallo de *R. graveolens* extraídas por dos métodos de extracción sobre células MCF-7**

Las fracciones de tallo NaCl que presentaron un efecto citotóxico en células MCF-7, en presencia de carbohidrato mostraron una drástica disminución del efecto al tener una citotoxicidad menor al 10 %; mientras la fracción de maltosa en una concentración de 2 µg tuvo un efecto proliferativo, en presencia del carbohidrato disminuyó la proliferación. Por su parte PHA en presencia del carbohidrato incrementa en cuatro veces la cantidad de células, en comparación cuando no se encuentra inhibida (Gráfica 26).



Las fracciones de tallo extraídas con Tris-HCl que presentaron un efecto citotóxico, en la prueba de inhibición para las fracciones de galactosa, manitol, sacarosa y fructosa, se tuvo un efecto proliferativo en presencia del carbohidrato; mientras las fracciones de lactosa, maltosa y sorbitol redujeron su actividad citotóxica (Gráfica 27).

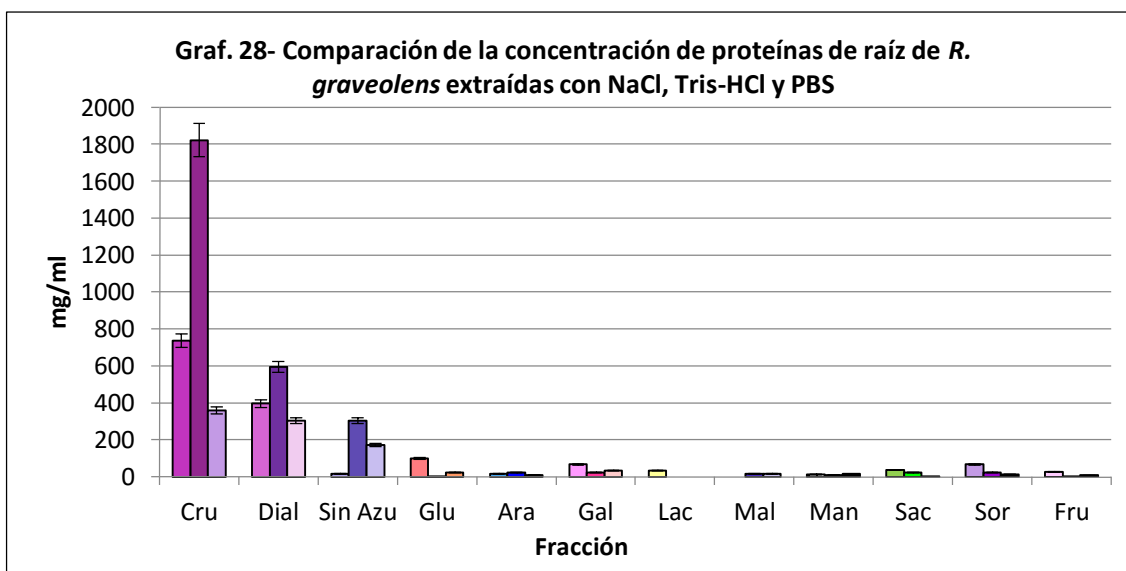


### 7.2.3. Lectinas Vegetales de Raíz de *R. graveolens*

#### 7.2.3.1. Comparación de la concentración proteínas en tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de *R. graveolens*

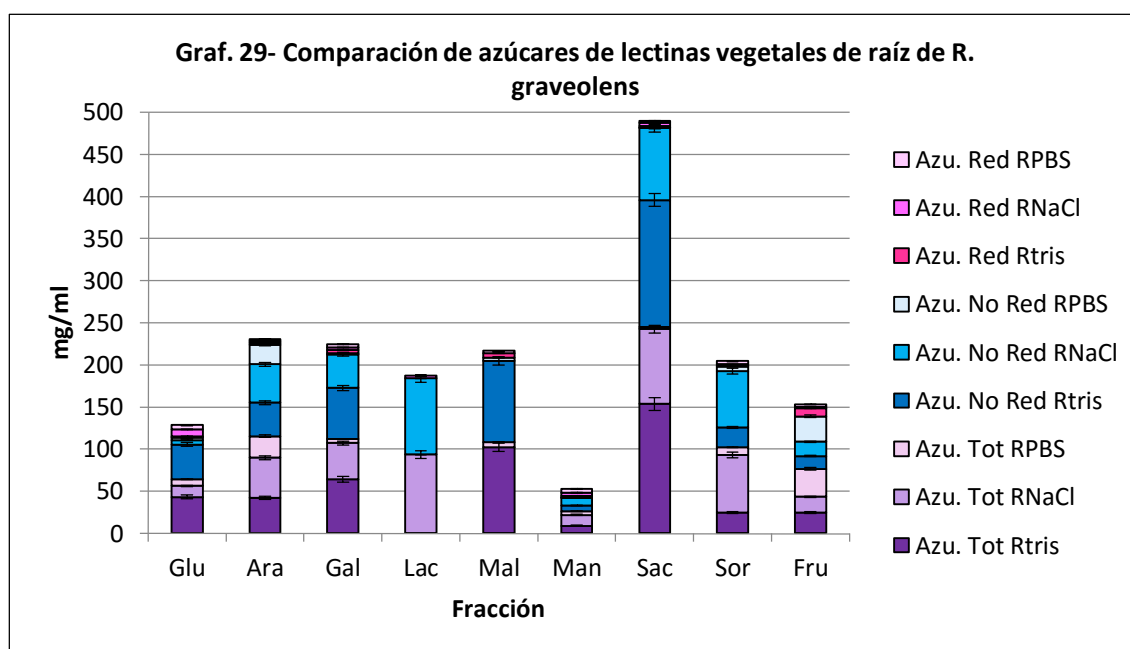
De los tres métodos utilizados para la extracción de proteínas en raíz se obtuvo que las fracciones de Tris-HCl presentaron aproximadamente de dos a seis veces mayores concentraciones en comparación con NaCl y PBS, respectivamente, en los extractos crudos. En los extractos dializados se observa la presencia de proteínas con un peso menor a 3 kDa del 46.4 % en el extracto con NaCl, 67.33 % en Tris-HCl y 15.31 % en la extracción con PBS.

En la extracción de lectinas vegetales de raíz por medio de NaCl se obtuvo un rendimiento del 48.75 % para proteínas tipo lectinas respecto al total proteico, donde se muestra un rendimiento neto del 0.359 % por cada 100 gr de material vegetal; el promedio de la concentración de proteína presente en las fracciones obtenidas es de 44.93 mg, siendo las fracciones de glucosa, galactosa y sorbitol las que tuvieron una mayor concentración proteica. En la extracción realizada con Tris-HCl de lectinas vegetales presentes en la raíz de ruda se obtuvo un rendimiento del 6.38 % respecto al total proteico, correspondiendo a un rendimiento neto por cada 100 gr de material vegetal del 0.116 %; presentando en promedio una concentración de 14.53 mg por fracción, de las cuales sorbitol, galactosa, sacarosa y arabinosa son las que mostraron un mayor contenido de proteínas. En las fracciones del extracto de raíz hecho con PBS se observa un rendimiento del 32.9 % de proteínas tipo lectina respecto al total de proteínas, lo que representa un rendimiento neto de 0.118 % por cada 100 gr de material vegetal; donde las fracciones obtenidas presentan una concentración promedio de proteína de 14.79 mg, de las cuales maltosa y manitol son las fracciones con un mayor contenido de proteínas (Gráfica 28).



### 7.2.3.2. Comparación de la concentración de carbohidratos en tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de *R. graveolens*

Las fracciones de raíz extraídas por NaCl muestran una concentración promedio de azúcares totales (AT) de 48.3 mg, 45.04 mg de azúcares no reductores (ANR) y 3.26 mg de azúcares reductores (AR) que corresponde al 54.73 %, de las cuales las fracciones de lactosa, sorbitol y arabinosa mostraron un mayor contenido de carbohidratos totales. La concentración de los diferentes tipos de carbohidratos presentes en las fracciones obtenidas de raíz (Tris-HCl) es para AT de 57.9 mg, 54.231 mg de ANR y 3.66 mg de AR lo que representa el 81.75 %, las fracciones de sacarosa y maltosa tienen un mayor contenido de carbohidratos. La concentración de los diferentes tipos de carbohidratos obtenida en las fracciones de raíz extraída con PBS para AT fue de 11.77 mg, 8.4 mg de ANR y 3.33 mg de AR siendo el 47.25 %; las fracciones que presentan una mayor cantidad de carbohidratos son fructosa y arabinosa (Gráfica 29).

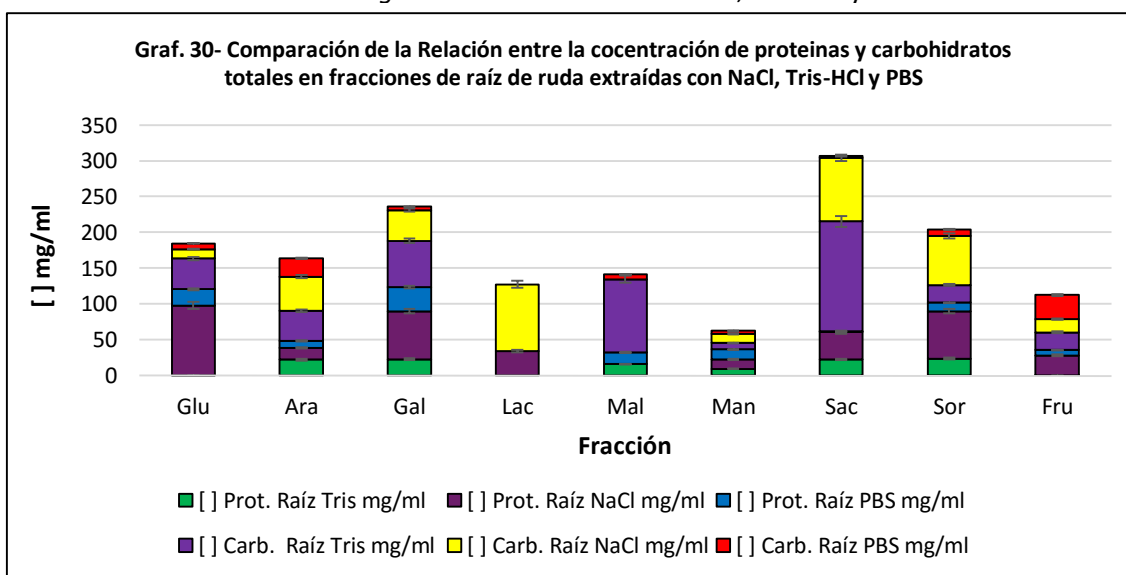


### 7.2.3.3. Comparación de la relación Proteína-Carbohidrato en tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de *R. graveolens*

Para los extractos de raíz observamos que la extracción hecha con NaCl presentó una mayor concentración de proteínas, sin embargo la concentración de azúcares es muy parecida en dos de los tres métodos de extracción. La relación Proteína-Carbohidrato (P-C) que tuvieron las fracciones enriquecidas del extracto de raíz (NaCl) en promedio fue de 1.43 mg por cada mg de proteína; siendo las fracciones de arabinosa, lactosa y sorbitol, las que tuvieron una mayor relación P-C. La relación P-C que mostraron las fracciones enriquecidas del extracto de raíz obtenido por Tris-HCl en promedio es de 71.58 mg de carbohidrato por cada mg de proteína, donde la fracción de glucosa es la que tiene una relación P-C mayor, seguida de la fracción de fructosa. La relación P-C que se presenta en las fracciones enriquecidas del extracto de raíz (PBS) fue en promedio de 1.35 mg de carbohidrato por cada mg de proteína, de las cuales las fracciones de fructosa y arabinosa son las que tuvieron una mayor relación (Tabla 15 y Gráfica 30).

Frac	[ ] Prot. RTris-HCl mg/ml	[ ] Prot. RNaCl mg/ml	[ ] Prot. RPBS mg/ml	[ ] Carb. RTris-HCl mg/ml	[ ] Carb. RNaCl mg/ml	[ ] Carb. RPBS mg/ml	Relación P/C RTris-HCl	Relación P/C RNaCl	Relación P/C RPBS	% Carb. De masa total RTris-HCl	% Carb. De masa total RNaCl	% Carb. De masa total RPBS
Glu	0.09	97.55	22.73	43.2	13.05	7.98	470.58	0.133	0.351	99.7	11.7	25.9
Ara	22.08	16.2	10.08	42	47.78	25.56	1.90	2.949	2.535	65.5	74.6	71.7
Gal	22.82	66.85	34.1	64.2	43	4.98	2.81	0.643	0.146	73.7	39.1	12.7
Lac		33.8			93.5			2.766			73.4	
Mal	15.76		16.77	102		6.36	6.47		0.379	86.6		27.4
Man	9.18	13.1	14.09	9	12.75	4.653	0.98	0.973	0.330	49.5	49.3	24.8
Sac	22.34	38.1	1.168	153.6	89	2.302	6.87	2.335	1.970	87.3	70	66.3
Sor	23.72	66.15	11.78	24.6	68.5	9.18	1.03	1.035	0.779	50.9	50.8	43.7
Fru	0.3	27.73	7.62	24.6	18.85	33.18	82	0.679	4.354	98.7	40.4	81.3

Tabla 15- Comparación de la Relación Proteína-Carbohidrato de fracciones enriquecidas de raíz de *Ruta graveolens* extraídas con NaCl, Tris-HCl y PBS



#### *7.2.3.4. Comparación del efecto Hemaglutinante en tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de *R. graveolens**

En la Gráfica 31 y tabla 16 se muestra que las fracciones de raíz extraídas con Tris-HCl y PBS no presentan diferencias significativas en el grado de aglutinación en el sistema ABO+. La actividad hemaglutinante dada por las fracciones de raíz extraídas con NaCl mostraron para el grupo sanguíneo O+ una AEU de 3075.75 AEU/mg, donde las fracciones de lactosa y fructosa mostraron una mejor actividad en este tipo sanguíneo, para el grupo B+ se obtuvo 3040 AEU/mg, con mejor reconocimiento en las fracciones de lactosa y sacarosa; mientras en el grupo A+ la AEU fue de 2045 AEU/mg, siendo la fracción de galactosa la que tuvo una mayor afinidad.

El efecto hemaglutinante que presentan las fracciones de raíz (Tris-HCl) en el grupo sanguíneo O+ es de 5602.5 AEU/mg aproximadamente, siendo reconocida principalmente por las fracciones de arabinosa, galactosa, maltosa y sorbitol; por su parte en el grupo sanguíneo B+ se obtiene 940 AEU/mg de actividad hemaglutinante, dada por el reconocimiento de las fracciones de galactosa y sacarosa. Mientras el grupo sanguíneo A+ presentó un mayor reconocimiento por fracciones como manitol, sorbitol y fructosa, generando una actividad hemaglutinante promedio de 1106.66 AEU/mg.

El efecto hemaglutinante que mostraron las fracciones de raíz (PBS) en el grupo sanguíneo O+ es de 5602.5 AEU/mg aproximadamente, siendo reconocida principalmente por las fracciones de arabinosa, galactosa, maltosa y sorbitol; por su parte en el grupo sanguíneo B+ se presenta 940 AEU/mg de actividad hemaglutinante, dada por el reconocimiento de las fracciones de galactosa y sacarosa. Mientras el grupo sanguíneo A+ tuvo un mayor reconocimiento por fracciones como sorbitol y fructosa, generando una actividad hemaglutinante promedio de 866.66 AEU/mg.

Cabe destacar que en los tres métodos se observaron los mismos patrones en el grado de aglutinación, es decir, los aglomerados que se encontraron eran de menor grado en comparación con los que se forman con tallo y hoja, además el tiempo de incubación fue mayor, requiriendo 3 hrs de incubación, mientras que para hoja y tallo fue de 1 h; en el caso de los extractos crudos se presentó un mejor efecto aglutinante que en las fracciones enriquecidas, lo que puede sugerir que para el caso de estas lectinas funcionan mejor en conjunto que de forma separada.

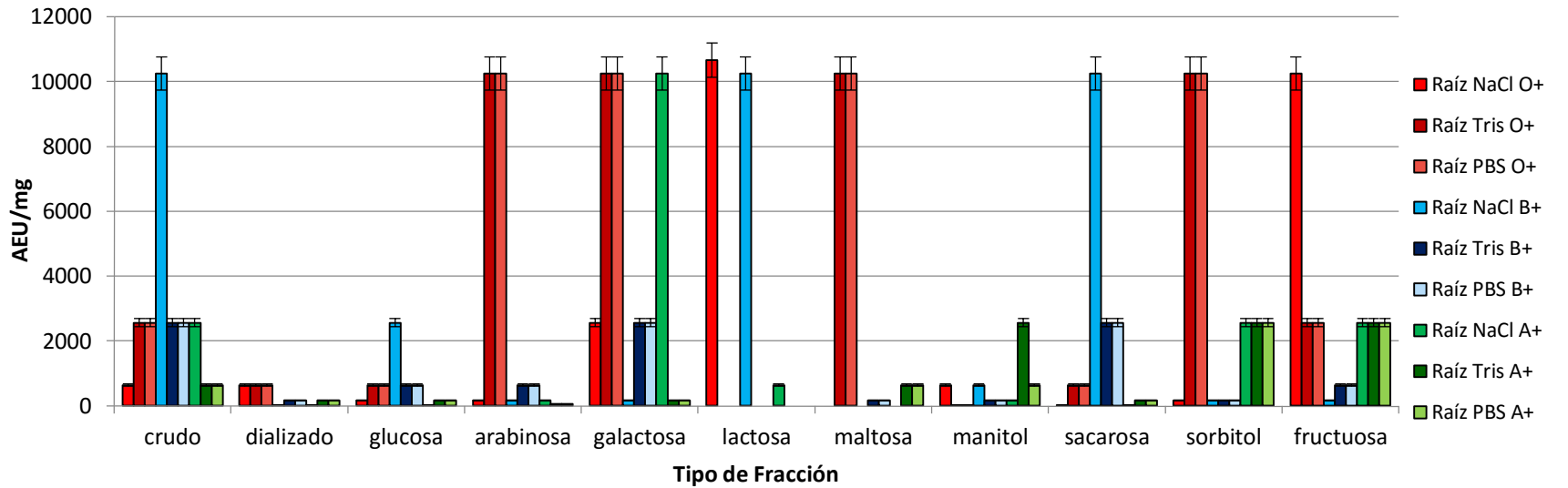


Fracc	[ ] Prot mg RNaCl	[ ] Prot mg RTris-HCl	[ ] Prot mg RPBS	O+						B+					
				Raíz NaCl		Raíz Tris-HCl		Raíz PBS		Raíz NaCl		Raíz Tris-HCl		Raíz PBS	
				UHA	AEU/mg	UHA	AEU/mg	UHA	AEU/mg	UHA	AEU/mg	UHA	AEU/mg	UHA	AEU/mg
<b>Cru</b>	737.3	1821.8	358.4	16	640	32	2560	32	2560	64	10240	32	2560	32	2560
<b>Dial</b>	395.3	595.1	303.5	16	640	16	640	16	640	2	20	8	160	8	160
<b>Glu</b>	97.5	0.091	22.7	8	160	16	640	16	640	32	2560	16	640	16	640
<b>Ara</b>	16.2	22	10	8	160	64	10240	64	10240	8	160	16	640	16	640
<b>Gal</b>	66.85	22.8	34.1	32	2560	64	10240	64	10240	8	160	32	2560	32	2560
<b>Lac</b>	33.8			64	10666					64	10240				
<b>Mal</b>		15.7	16.7			2	20	2	20			8	160	8	160
<b>Man</b>	13.1	9.1	14	2	20	16	640	16	640	64	10240	32	2560	32	2560
<b>Sac</b>	38.1	22.3	1.1	8	160	64	10240	64	10240	8	160	8	160	8	160
<b>Sor</b>	66.1	23.7	11.7	64	10240	32	2560	32	2560	8	160	16	640	16	640
<b>Fru</b>	27.7	0.3	7.6	16	640	32	2560	32	2560	64	10240	32	2560	32	2560

Fracc	A+						Rendimiento % RNaCl	Rendimiento % RTris-HCl	Rendimiento % RPBS
	Raíz NaCl		Raíz Tris-HCl		Raíz PBS				
	UH A	AEU/mg	UH A	AEU/mg	UH A	AEU/mg			
<b>Cru</b>	32	2560	16	640	16	640	100	100	100
<b>Dial</b>	2	20	8	160	8	160	53.6	32.6	84.6
<b>Glu</b>	2	20	8	160	8	160	13.2	0.005	6.3
<b>Ara</b>	8	160	4	53.33	4	53.33	2.1	1.2	2.8
<b>Gal</b>	64	10240	8	160	8	160	9	1.2	9.5
<b>Lac</b>	16	640	16	640	16	640	4.5		
<b>Mal</b>			32	2560	16	640		0.8	4.6
<b>Man</b>	2	20					1.7	0.5	3.9
<b>Sac</b>	32	2560	32	2560	32	2560	5.1	1.2	0.32
<b>Sor</b>	32	2560	32	2560	32	2560	8.9	1.3	3.2
<b>Fru</b>	32	2560	16	640	16	640	3.7	0.01	2.1

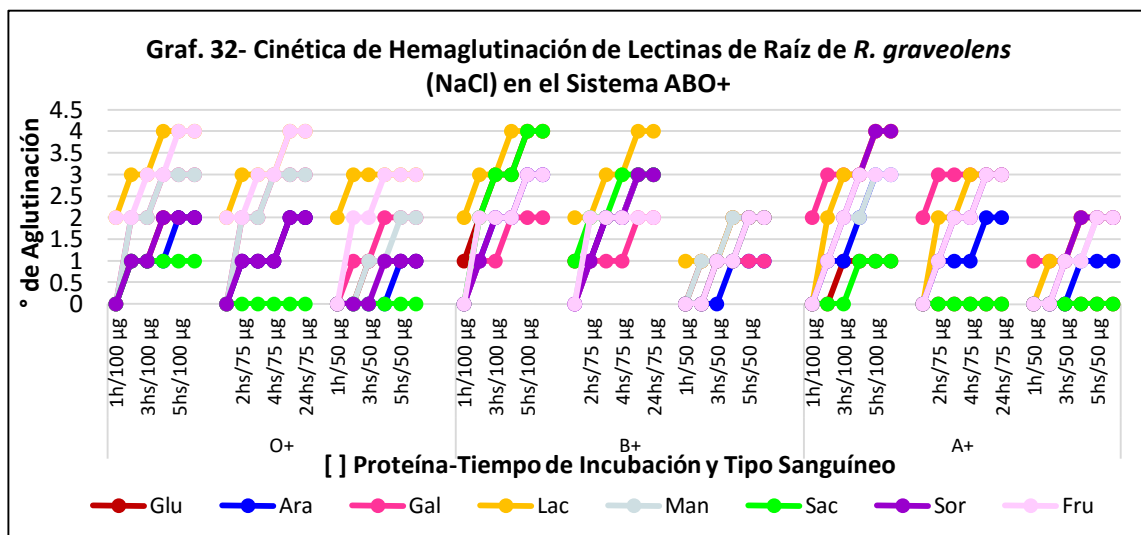
Tabla 16- Comparación de la Actividad Hemaglutinante de Fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de raíz de *Ruta graveolens* extraídas con NaCl, Tris-HCl y PBS. UHA= el recíproco de la dilución más alta que muestra aglutinación (2<sup>n</sup>). Actividad Especifica= unidades de hemaglutinación (UHA)/mg

**Graf. 31- Comparación de la actividad hemaglutinante en extractos de raíz de ruda hechos con NaCl, Tris-HCl y PBS**



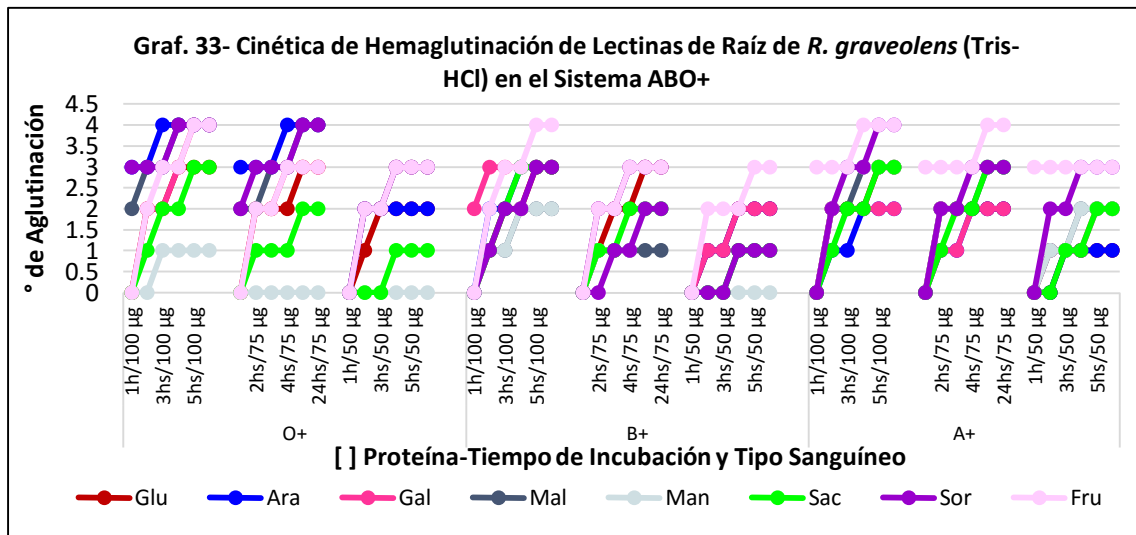
### 7.2.3.5. Comparación de la Cinética del Efecto Hemaglutinante en tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de *R. graveolens*

En el caso de las fracciones de raíz NaCl en el grupo O+ la mayoría de las fracciones requieren al menos dos horas de incubación para empezar el proceso de aglutinación, independientemente de la concentración utilizada. El promedio de máxima aglutinación es de 2, donde solo las fracciones de lactosa y fructosa son las que alcanzan un grado 4 de aglutinación y comienzan el proceso con una hora de incubación. En el grupo B+ a concentraciones de 100 y 75  $\mu\text{g}$  no se presentan diferencias significativas en el tiempo y grado de aglutinación, siendo que la mayoría de las fracciones comienzan la aglutinación a una hora de incubación; sin embargo, a una concentración de 50  $\mu\text{g}$  disminuye el grado de aglutinación y se incrementa el tiempo de incubación. En el grupo A+ estas fracciones a concentraciones de 75 y 50  $\mu\text{g}$  presentaron bajos grados de aglutinación, así como un tiempo de incubación de 4 y 5 horas; en particular el caso de sacarosa solo presentó un efecto de aglutinación a una concentración de 100  $\mu\text{g}$ , mientras que a la misma concentración las fracciones de galactosa y manitol alcanzaron un grado 4 de aglutinación (Gráfica 32).

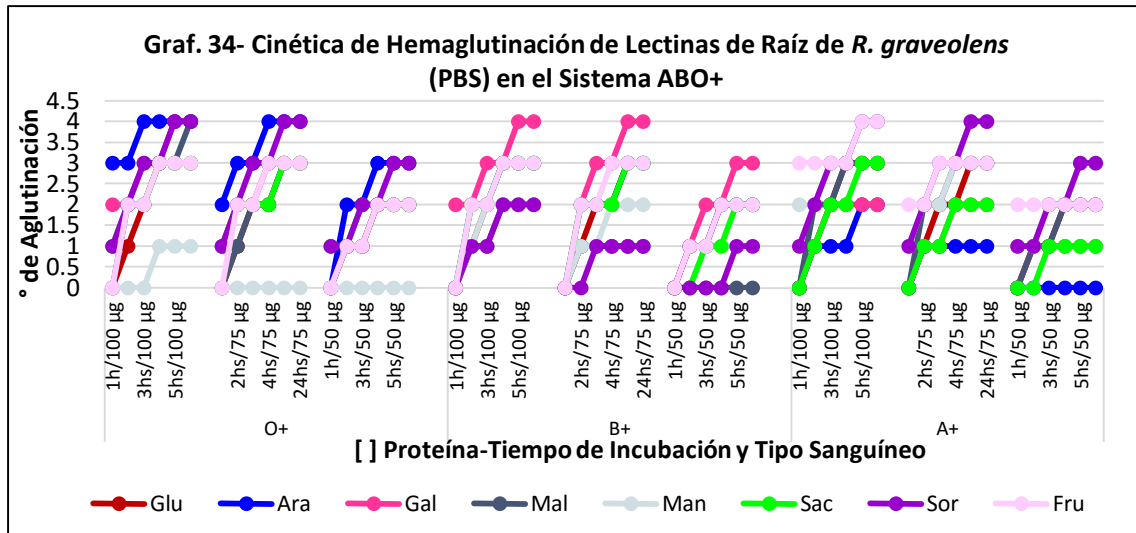


La Gráfica 33 muestra que las fracciones de raíz extraídas con Tris-HCl en el grupo O+ requieren un mayor tiempo de incubación para comenzar el proceso de aglutinación; mientras que en las fracciones que presentan un grado máximo de aglutinación a una hora de incubación tuvieron valores medios de aglutinación y solo modifican el grado de aglutinación, pero no el tiempo mínimo de incubación, como es el caso de arabinosa y manitol. En el caso del grupo sanguíneo B+ el tiempo mínimo de incubación es de dos horas en la mayoría de las fracciones,

aunque la fracción de fructosa presenta un grado 4 de aglutinación con un mayor tiempo de incubación comparado con otras fracciones que a una hora alcanzan el mismo grado de aglutinación, mientras que al disminuir la concentración de proteínas no se modifica significativamente la cinética. Para el grupo A+ el tiempo mínimo de incubación para alcanzar el grado máximo de aglutinación es de 3 a 4 hrs, además de no presentarse diferencias significativas en los patrones de aglutinación y el tiempo de incubación a concentraciones de 100 y 75  $\mu\text{g}$ .



En el grupo O+ las fracciones de raíz extraídas con PBS a concentraciones de 100 y 75  $\mu\text{g}$  presentan un patrón similar en su cinética, mientras que a 50  $\mu\text{g}$  solo se da la reducción del grado máximo de aglutinación; donde las fracciones que presentan un grado de aglutinación 4 son: arabinosa, sorbitol y maltosa, las cuales requieren un mayor tiempo de incubación en comparación con otras fracciones que presentan el mismo nivel de aglutinación; lo que ocurre contrariamente en la fracción de manitol que tuvo poca actividad en este tipo sanguíneo. La cinética de aglutinación para el grupo B+ a concentraciones de 100 y 75  $\mu\text{g}$  presenta grados de aglutinación 4 a un tiempo de incubación de 5 hrs, mientras que a concentraciones de 50  $\mu\text{g}$  solo se modifica el grado de aglutinación. En el grupo A+ observamos que las fracciones de fructosa, sorbitol y manitol alcanzan una aglutinación grado 4 con la misma cinética a una concentración de 100  $\mu\text{g}$  a tres horas de incubación; mientras que contrario al caso anterior, arabinosa presenta una baja actividad para este tipo sanguíneo. (Gráfica 34).



**7.2.3.6. Comparación de la Inhibición del Efecto Hemaglutinante en tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de *R. graveolens***

En el proceso de inhibición de la hemaglutinación se observó alta afinidad a los diferentes azúcares usados, ya que utilizando concentraciones de 10 µM se inhibe la aglutinación en los tres diferentes tipos de extracciones, las cuales mostraron los mismos patrones de inhibición.

**7.2.3.7. Comparación del Peso Molecular en tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de *R. graveolens***

El promedio de bandas presentes en las fracciones enriquecidas del extracto de raíz NaCl fue de 4 a 5, presentando un peso molecular promedio de 14 a 180 kDa; donde las fracciones de sorbitol, galactosa y sacarosa fueron las que mostraron un mayor número de bandeos (Figura 24).

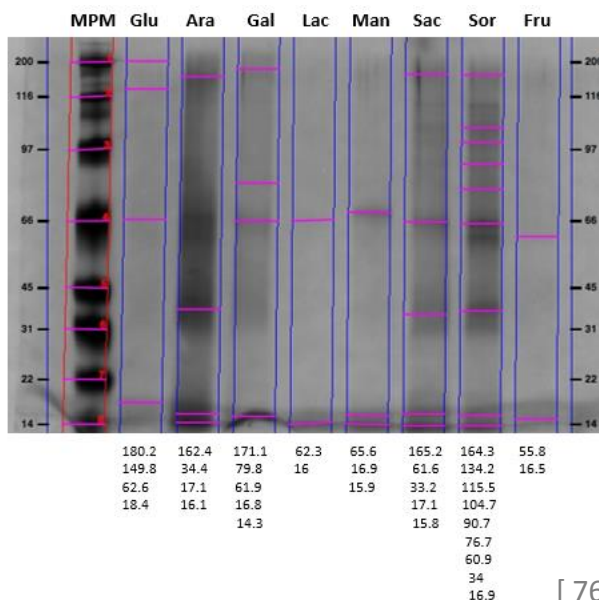


Fig. 24- Patrón Electroforético de Fracciones enriquecidas del extracto de raíz de *R. graveolens* extraído con NaCl. MPM (marcador de peso molecular), en la parte superior azúcares con los que se realizó la elución cromatografía. Parte inferior número y peso molecular (kDa) de proteínas presentes en cada una de las fracciones.

El promedio de bandas proteicas presentes en las fracciones de raíz (Tris-HCl) es de 2 y 4, con un rango de peso molecular de 16 a 185 kDa, siendo las fracciones de sacarosa y fructosa las que tuvieron una mayor diversidad de bandas proteicas (Figura 25).

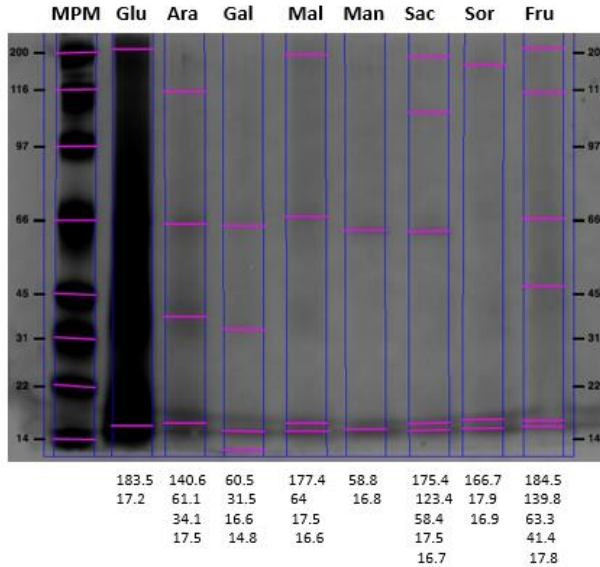


Fig. 25- Patrón Electroforético de Fracciones enriquecidas del extracto de raíz de *R. graveolens* extraído con Tris-HCl. MPM (marcador de peso molecular), en la parte superior azúcares con los que se realizó la elución cromatografía. Parte inferior número y peso molecular (kDa) de proteínas presentes en cada una de las fracciones.

El promedio de bandas proteicas presentes en las fracciones de raíz (PBS) es de 2 y 8, mostrando un rango de peso molecular de 17 a 190 kDa, siendo las fracciones de sacarosa, maltosa, manitol y sorbitol las que tienen una mayor diversidad de proteínas (Figura 26).

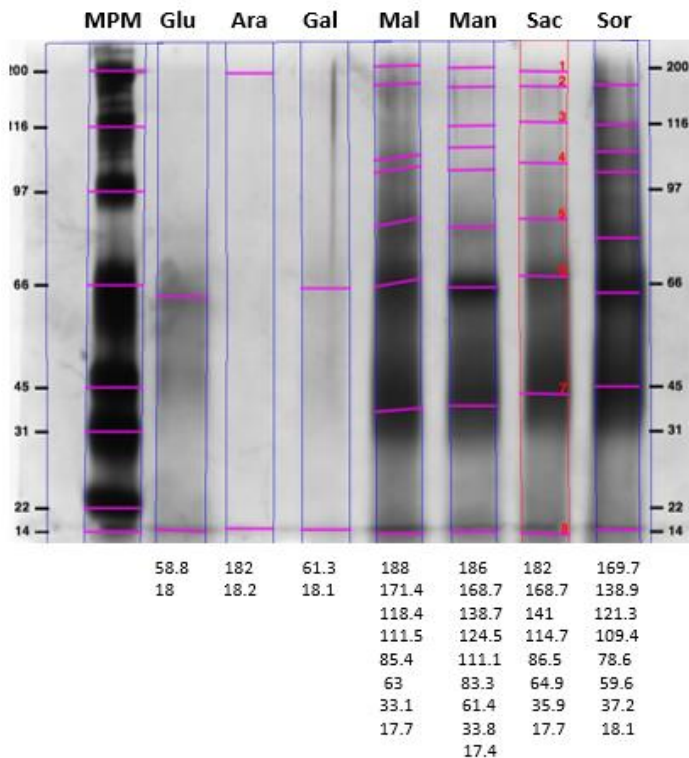


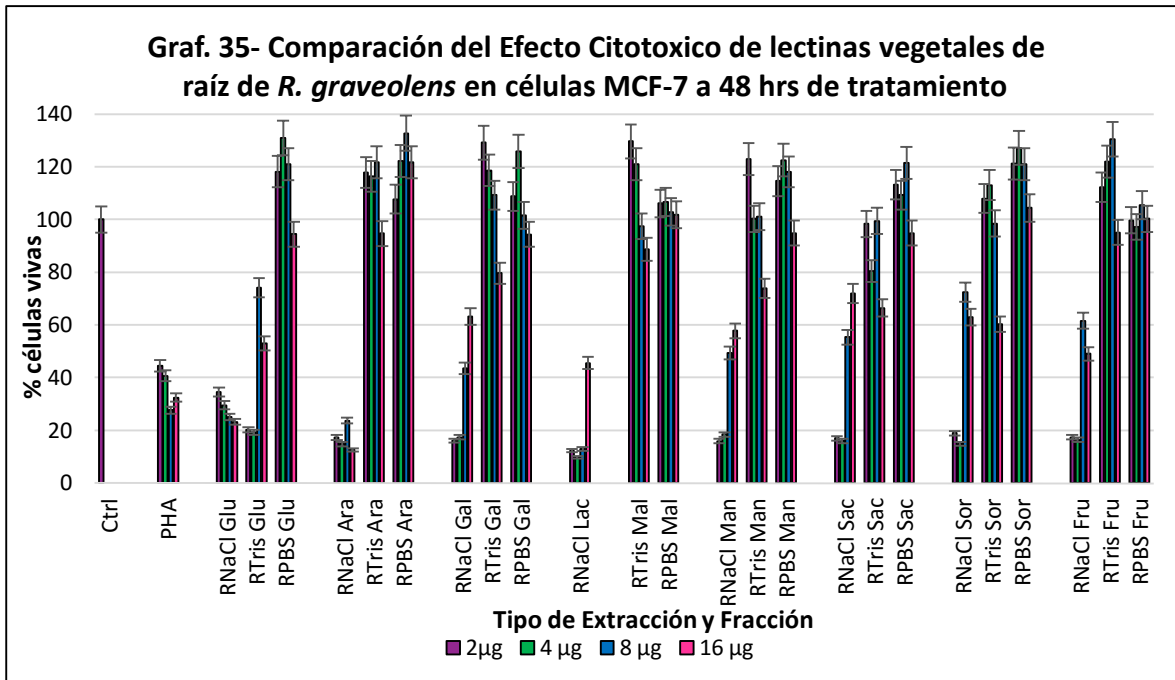
Fig. 26- Patrón Electroforético de Fracciones enriquecidas del extracto de raíz de *R. graveolens* extraído con PBS. MPM (marcador de peso molecular), en la parte superior azúcares con los que se realizó la elución cromatografía. Parte inferior número y peso molecular (kDa) de proteínas presentes en cada una de las fracciones.

#### *7.2.3.8. Comparación del efecto Citotoxico en células MCF-7 por tres tipos de extracción de lectinas vegetales de Raíz de R. graveolens*

Para las lectinas de raíz de ruda se obtuvo que las fracciones del extracto de NaCl, al utilizar una concentración de 2 µg presentaron un efecto citotoxico del 81.36 %, a una concentración de 4 µg se tuvo una disminución celular del 82.88 %, mientras que a concentraciones más altas la citotoxicidad disminuye, ya que a una concentración de 8 µg el efecto es del 57 %; así como a una concentración de 16 µg la citotoxicidad es del 51.76 %, donde todas las fracciones utilizadas presentan un efecto citotoxico mayor al 50 % en una concentración de 2 y 4 µg.

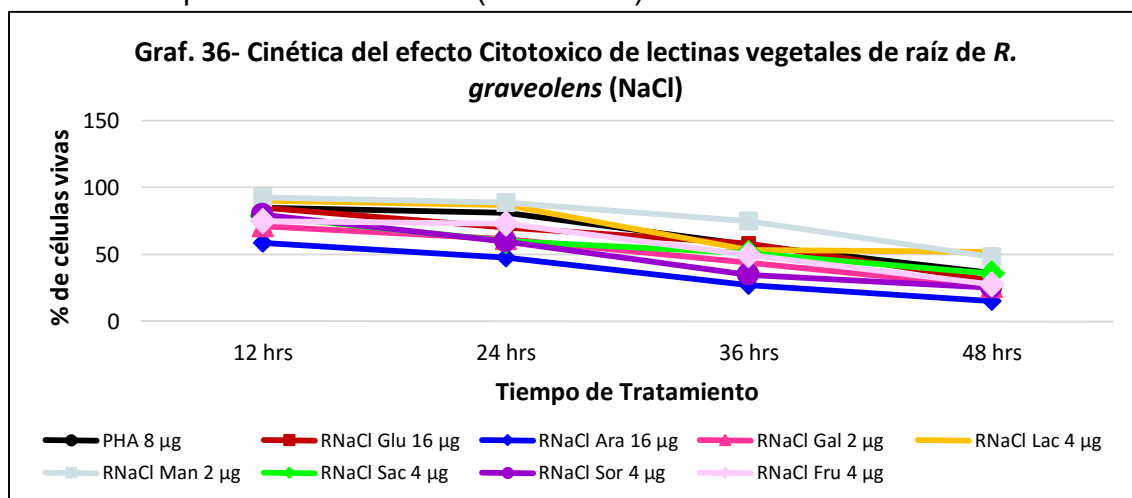
En una concentración de 2 µg se obtuvo un efecto proliferativo dado por las fracciones de raíz (Tris-HCl) sobre células MCF-7, donde las fracciones de galactosa y maltosa presentaron un incremento de 30 % de células y glucosa mostró un efecto citotoxico del 79.86 %, respecto al control; al utilizar 4 µg se presentó una disminución promedio solo del 2 %, donde la fracción de glucosa tuvo una reducción celular del 80 %, para la concentración de 8 µg se dio un efecto proliferativo en la mayoría de las fracciones, de las cuales fructosa y arabinosa incrementaron el nivel celular en un 25 %, mientras la fracción de glucosa solo presentó una disminución del 25 %.

Para las fracciones del extracto de raíz (PBS) no se observó un efecto citotoxico significativo, ya que la mayoría de las fracciones solo presentaron una reducción del 3 % a diferentes concentraciones; al utilizar una concentración de 2 µg se incrementó en un 11.15 % la cantidad de células respecto al control, a 4 µg un aumento del 17.71 %, a 8 µg se incrementa un 15.52 % el número de células y 16 µg solo se presentó un incremento de 0.86 %, siendo las fracciones de glucosa y arabinosa las que tuvieron mayor efecto mitogénico (Gráfica. 35).



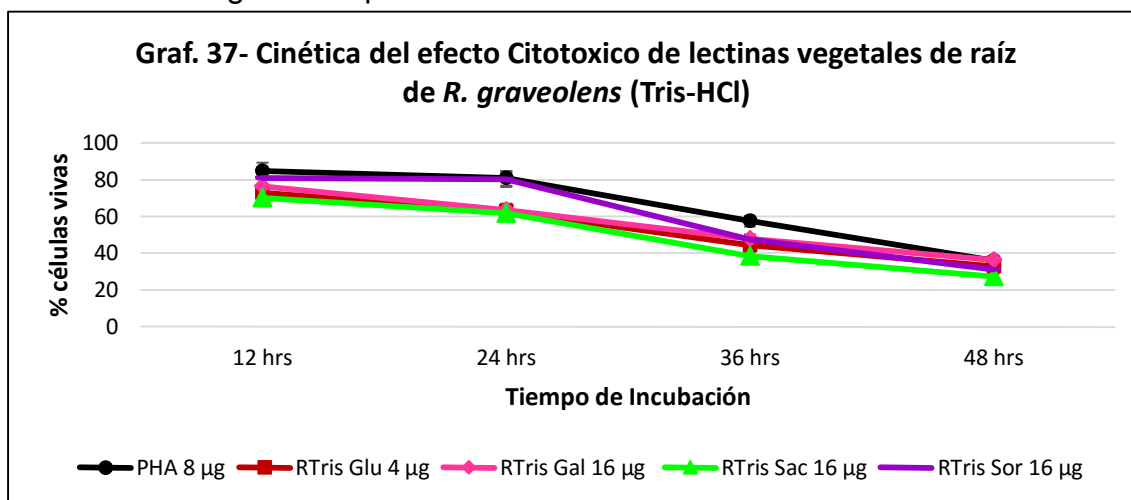
**7.2.3.9. Cinética del Efecto Citotoxico sobre células MCF-7 de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de Raíz de *R. graveolens* obtenidas por Tres métodos de extracción**

La cinética de citotoxicidad que presentan las fracciones de raíz obtenidas por medio de la extracción con NaCl, a las 12 hrs de tratamiento tuvieron una disminución celular del 21.19 %, a las 24 hrs un efecto del 31.5 %, a las 36 hrs de incubación 50.89 % y a las 48 hrs una reducción del 67.59 %. La fracción de arabinosa es la más representativa, ya que es la que presenta un mayor efecto citotoxico del 85 % y desde el primer tiempo de tratamiento ya presenta una disminución aproximada del 40 % (Gráfica 36).



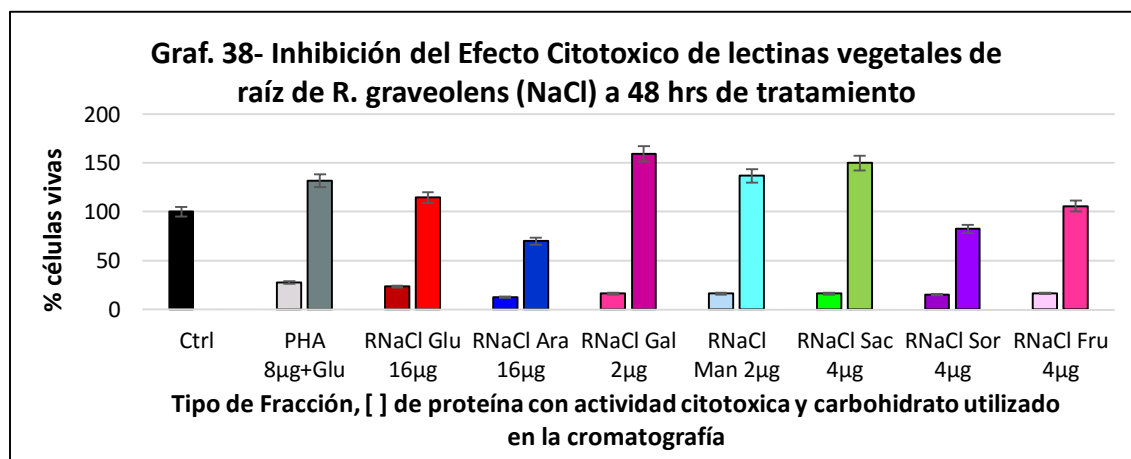


Al evaluar la cinética del efecto citotóxico dado por las fracciones de raíz extraída por Tris-HCl, se observó en la gráfica 37 que a las 12 hrs de incubación se presentó una reducción del 24.88 %, a las 24 hrs 32.87 %, a las 36 hrs de tratamiento se obtuvo una citotoxicidad del 55.5 % y a las 48 hrs de incubación se dio una reducción celular del 68.17 %; donde la fracción de sacarosa es la que mostro mayor efecto citotóxico a lo largo el tiempo.

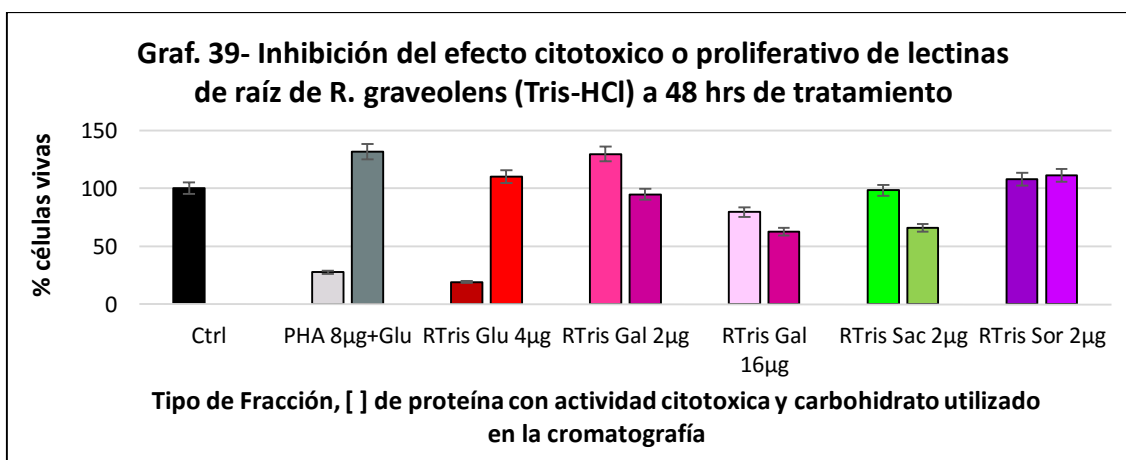


### 7.2.3.10. Inhibición del efecto Citotóxico/ Proliferativo sobre células MCF-7 de fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de Raíz de *R. graveolens* extraídas por tres métodos de extracción

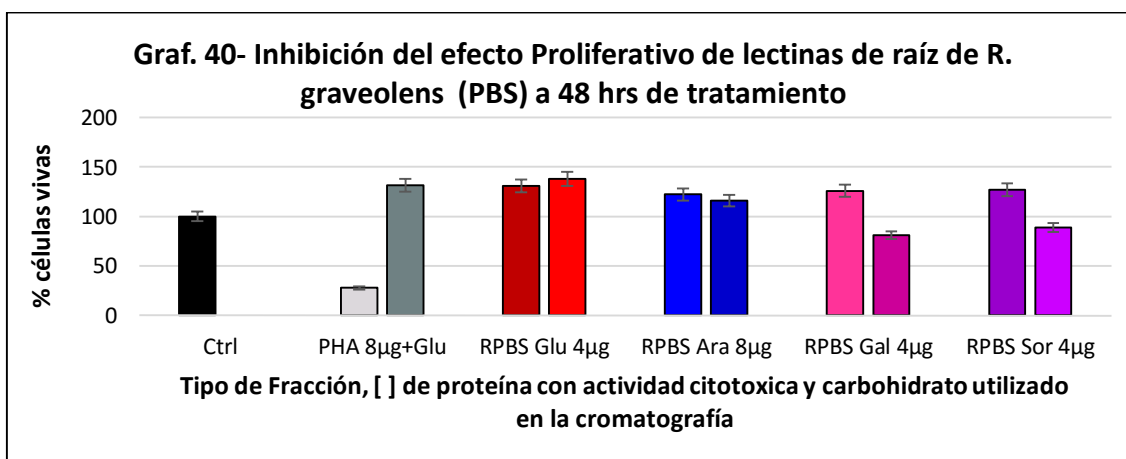
Al adicionar el carbohidrato utilizado para la elución en la cromatografía de afinidad, las fracciones de raíz (NaCl) cambiaron su alto efecto citotóxico por un efecto proliferativo al incrementar en un 10 a 60 % la cantidad de células respecto al control; sin embargo en fracciones como arabinosa y sorbitol aún se presenta una citotoxicidad, pero en menor grado (Grafica 38).



Al inhibir el efecto citotóxico o proliferativo de las fracciones de raíz extraídas con Tris-HCl se observa en la gráfica 39, que para las fracciones de glucosa y sorbitol que presentaron efecto citotóxico, en presencia del carbohidrato se promueve la proliferación, mientras las fracciones de galactosa y sacarosa siguen presentando un efecto citotóxico pero en mayor proporción; para la fracción de galactosa en una concentración de 2  $\mu\text{g}$  donde tuvo un efecto proliferativo en presencia del carbohidrato se vuelve citotóxico.



Para las fracciones de raíz (PBS) solo se presentó un efecto proliferativo en células MCF-7, por lo tanto se utilizaron las fracciones que tuvieron altos niveles de proliferación para realizar la prueba de inhibición. Obteniendo en la gráfica 40, que las fracciones de glucosa y arabinosa, en presencia del carbohidrato mantienen su efecto proliferativo; mientras las fracciones de galactosa y sorbitol tuvieron un efecto citotóxico en adición del carbohidrato.



### 7.3. Resumen de la caracterización Bioquímica Parcial y del Efecto Biológico de Lectinas Vegetales presentes en *R. graveolens*

Recopilando la información obtenida en este estudio sobre las proteínas tipo lectina presentes en los diferentes órganos de la *R. graveolens* y dos de los principales métodos de extracción, se generaron los siguientes cuadros sobre algunas de las características bioquímicas y su efecto biológico en el sistema ABO+ y en células tumorales de la línea MCF-7 de cáncer de mama.

#### Hoja extraída con NaCl

Fracción	[Proteína]	% Carb.	[Carb. Tot]	[Carb. Red]	[Carb. No Red]	Relac. P-C	UAH/mg	Afín Tip Sang	Máx. ° Aglut	Tiem Inc	# proteínas	PM kDa	Citotoxicidad [citotóxica]	Cito > 50%	Inhib. C o P	% Rto.	
Glucosa	121.5	1.33	1.65	0.06	1.59	0.01358	448.7	O+ y B+	3	4-5 hs	2	73.5-81.5	57.92 %	4 µg	48 hrs	+ 6.67	3.6
Arabinosa	11.42	71	29.17	28.54	0.63	2.554	1120	O+	3	2 hs	6	12.8-119	24.81 %	16 µg			1.1
Galactosa	9.475	70.37	22.5	22.19	0.31	2.374	3693.61	O+	2	3 hs	6	13-124	70.01 %	8 µg	36 hrs	3.27	0.95
Lactosa	27.16	66.26	53.35	53.191	0.159	1.964	640	O+, B+ y A+	2	3-4 hs	5	52.9-120	65.23 %	8 µg	48 hrs	1.99	0.39
Maltosa	51	40.7	35.01	34.7	0.31	0.6864	1493.33	O+	3	1 h	6	13-125	48.48 %	16 µg			0.61
Manitol	48.15	27.57	18.33	17.38	0.95	0.3806	7680	B+ y A+	3	1-2 hs	2	78-86.5	31.77 %	16 µg			1.36
Sacarosa	55.85	38.53	35.01	33.74	1.27	0.6268	5120	O+	2	1-2 hs	4	54-91.5	34.71 %	4 µg			2.82
Sorbitol	101	18.21	22.5	21.55	0.95	0.2227	4480	A+	3	2-5 hs	2	53.5-87	44.5 %	16 µg			1.51
Fructosa	48.93	21.41	13.33	11.42	1.91	0.2724	7680	O+ y B+	3	3-5 hs	8	13.5-120	31.03 %	16 µg			1.05

Tabla 17- Características bioquímicas de lectinas vegetales presentes en fracciones enriquecidas del extracto con NaCl de hoja de *R. graveolens*

### Hoja extraída con Tris-HCl

Fracción	[Proteína]	% Carb.	[Carb. Tot]	[Carb. Red]	[Carb. No Red]	Relac. P-C	UAH/mg	Afín Tip Sang	Máx. ° Aglut	Tiem Inc	# proteínas	PM kDa	Citotoxicidad [citotóxica]	Cito > 50%	Inhib. C o P	% Rto.	
Glucosa	169.2	46.18	145.2	136.4	8.8	0.8581	35.37	A+	1	3-4 hs	4	13.5-78	36.26 %	16 µg	48 hrs	+11.9	3.65
Arabinosa	51.72	68.58	113.03	112.0731	0.9569	2.185	160	O+, B+ Y A+	3	2-3 hs	2	49.5-79	48.08 %	16 µg	48 hrs	+0.93	1.11
Galactosa	44.28	58.14	61.52	60.758	0.762	1.389	1293.61	O+	3	2-4 hs	11	12.5-111	40.48 %	8 µg	Prolifera	+19.35	0.95
Lactosa	18.53	86.86	122.5	121.735	0.765	6.61	320	A+	2	2-3 hs	2	70.5-77	20.5 %	4 µg			0.39
Maltosa	28.53	86.06	176.5	176.309	0.191	6.186	320	A+	3	1-4 hs	2	70-78.5	42.72 %	2 µg	48 hrs	+ 6.4	0.61
Manitol	63.36	49.46	62.02	60.88	1.14	0.9788	4320	A+	3	2-3 hs	1	76.5	36.09 %	2 µg			1.36
Sacarosa	130.8	0.494	0.65	0.08	0.57	0.0049	1709.72	B+ Y A+	3	1-4 hs	5	14-74.5	39.49 %	16 µg			2.82
Sorbitol	70.2	5.31	3.94	0.12	3.82	0.05612	4284.44	A+	2	2-4 hs	2	67.4-75.5	32.64 %	8 µg			1.51
Fructosa	48.79	1.18	0.583	0.009	0.574	0.01194	1760	B+ Y A+	4	1 h	1	72	37.88 %	16 µg			1.05

Tabla 18- Características bioquímicas de lectinas vegetales presentes en fracciones enriquecidas del extracto con Tris-HCl de hoja de *R. graveolens*

### Tallo extraído con NaCl

Fracción	[Proteína]	% Carb.	[Carb. Tot]	[Carb. Red]	[Carb. No Red]	Relac. P-C	UAH/mg	Afín Tip Sang	Máx. ° Aglut	Tiem Inc	# proteínas	PM kDa	Citotoxicidad [citotóxica]	Cito > 50%	Inhib. C o P	% Rto.	
Glucosa	86.4	6.3	5.83	4.43	1.4	0.0674	1120	A+	3	2-4 hs	4	17.5-116.6	31.77 %	8 µg	48 hrs	5.25	5.86
Arabinosa	75.9	28.3	30.01	29.055	0.955	0.3953	5120	A+	2	2-5 hs	4	10.5-116.6	31.26 %	8 µg			5.15
Galactosa	61.65	1.9	1.23	0.115	1.115	0.0199	3520	A+	3	1-3 hs	6	17-113	26.32 %	16 µg			4.18
Lactosa	3.83	93.8	58.29	57.495	0.795	15.219	5120	A+	2	2-3 hs	5	17-133	11.64 %	16 µg			0.26
Maltosa	79.76	11.4	10.36	8.925	1.435	0.1298	1920	O+ Y A+	2	2-3 hs	5	14-126	32.81 %	16 µg	48 hrs	9.41	5.41
Manitol	43.06	18.8	10	9.0431	0.9569	0.2322	4320	A+	2	2-5 hs	3	100-132	22.16 %	16 µg			2.92
Sacarosa	208.9	11.7	27.85	25.94	1.91	0.1333	4480	A+	2	1-3 hs	4	18.9-127	32.29 %	16 µg	48 hrs	0.042	14.18
Sorbitol	35.3	39.8	23.34	21.91	1.43	0.6611	1120	A+	4	1-5 hs	3	10.6-122	34.83 %	16 µg	48 hrs	7.154	2.39
Fructosa	72.55	66.3	143	141.57	1.43	1.971	7040	B+ Y A+	1	1-4 hs	4	10-128	40.58 %	16 µg	48 hrs	+10.6	4.92

Tabla 19- Características bioquímicas de lectinas vegetales presentes en fracciones enriquecidas del extracto con NaCl de tallo de *R. graveolens*

**Tallo extraído con Tris-HCl**

Fracción	[Proteína]	% Carb.	[Carb. Tot]	[Carb. Red]	[Carb. No Red]	Relac. P-C	UAH/mg	Afin Tip Sang	Máx. ° Aglut	Tiem Inc	# proteínas	PM kDa	Citotoxicidad [citotóxica]	Cito > 50%	Inhib. C o P	% Rto.	
Glucosa	100.8	1.9	1.984	0.074	1.91	0.0196	1120	O+	2	1-3 hs	5	15.5-168	34.66 %	16 µg		5.07	
Arabinosa	61.62	2.1	1.373	0.043	1.33	0.0222	1760	B+ Y A+	3	3-5 hs	5	15.5-164.5	24.41 %	16 µg		3.1	
Galactosa	106.8	10.4	12.5	6.376	6.124	0.117	4480	O+	2	3-5 hs	6	15.5-166	62.86 %	8 µg	48 hrs	+0.83	5.37
Lactosa	49.92	47.4	45.01	43.1	1.91	0.901	3520	B+	3	3-4 hs	5	23-166	77.26 %	2 µg	48 hrs	15.33	2.51
Maltosa	68.4	13.8	11	9.86	1.14	0.160	1920	B+ Y A+	2	5 hs	5	24-159	72.36 %	4 µg	48 hrs	17.19	3.44
Manitol	100.44	2	2.143	0.043	2.1	0.0213	4320	B+	2	3-5 hs	2	127-151.5	75.19 %	2µg	48 hrs	+6.8	5.05
Sacarosa	76.8	75.8	241.0	239.3	1.72	3.139	4320	A+	2	4-5 hs	8	15-163.5	69.55 %	2 µg	36 hrs	+3.21	3.86
Sorbitol	30	9	3	0.9	2.1	0.1	5120	B+	3	3-5 hs	5	15.5-154	72.48 %	16 µg	48 hrs	4.13	1.5
Fructosa	2	94.7	36	35.04	0.956	18	1120	B+	2	3-5hs	8	15.5-175	73.47 %	2 µg	36 hrs	+4.41	0.1

Tabla 20- Características bioquímicas de lectinas vegetales presentes en fracciones enriquecidas del extracto con Tris-HCl de tallo de *R. graveolens*

**Raíz extraída con NaCl**

Fracción	[Proteína]	% Carb.	[Carb. Tot]	[Carb. Red]	[Carb. No Red]	Relac. P-C	UAH/mg	Afin Tip Sang	Máx. ° Aglut	Tiem Inc	# proteínas	PM kDa	Citotoxicidad [citotóxica]	Cito > 50%	Inhib. C o P	% Rto.	
Glucosa	97.55	11.7	13.05	5.15	7.9	0.1337	913.33	B+	1	4-5 hs	4	18.4-180.5	76.79 %	16 µg	48 hrs	+14.52	13.2
Arabinosa	16.2	74.6	47.78	45.87	1.91	2.9493	160	O+, B+ Y A+	1	5 hs	4	16-163	87.45 %	16 µg	24 hrs	30.05	2.1
Galactosa	66.85	39.1	43	40.13	2.87	0.6432	4320	A+	2	4-5 hs	5	14-171	83.93 %	2 µg	36 hrs	+59.15	9
Lactosa	33.8	73.4	93.5	90.63	2.87	2.766	7182	O+	3	4-5 hs	2	16-62.3	90.32 %	4 µg			4.5
Manitol	13.1	49.3	12.75	9.245	3.505	0.9732	480	O+ Y B+	2	4-5 hs	3	15.9-65.6	84.05 %	2 µg	48 hrs	+36.66	1.7
Sacarosa	38.1	70	89	85.175	3.825	2.3359	3426.66	B+	1	2-5 hs	5	15.8-165.2	83.99 %	4 µg	48 hrs	+49.9	5.1
Sorbitol	66.15	50.8	68.5	67.225	1.275	1.0355	960	A+	2	4-5 hs	8	34-165	85.08 %	4 µg	36 hrs	17.64	8.9
Fructosa	27.73	40.4	18.85	16.94	1.91	0.6797	4320	O+	2	4-5 hs	2	16.5-55.8	83.59 %	4 µg	36 hrs	+5.8	3.7

Tabla 21- Características bioquímicas de lectinas vegetales presentes en fracciones enriquecidas del extracto con NaCl de raíz de *R. graveolens*

**Raíz extraída con Tris-HCl**

Fracción	[Proteína]	% Carb.	[Carb. Tot]	[Carb. Red]	[Carb. No Red]	Relac. P-C	UAH/mg	Afín Tip Sang	Máx. ° Aglut	Tiem Inc	# proteínas	PM kDa	Citotoxicidad [citotóxica]	Cito > 50%	Inhib. C o P	% Rto.	
Glucosa	0.0918	99.7	43.2	41.34	1.86	470.58	480	O+ Y B+	2	4-5 hs	2	17-184	80.77 %	4 µg	36 hrs	+10.0	0.005
Arabinosa	22.08	65.5	42	39.72	2.28	1.9021	3644.44	O+	2	3-4 hs	4	17.5-141	5.35 %	16 µg			1.2
Galactosa	22.82	73.7	64.2	60.42	3.78	2.8133	4320	O+	2	2-5 hs	4	14.8-60.5	20.37 %	16 µg	36 hrs	37.29	1.2
Maltosa	15.76	86.6	102	96.48	5.52	6.472	3680	O+	2	4 hs	4	16.6-177.5	11.34 %	16 µg			0.8
Manitol	9.18	49.5	9	6.708	2.292	0.9803	913.33	A+	1	3-4 hs	2	16.8-58.8	26.19 %	16 µg			0.5
Sacarosa	22.34	87.3	153.6	150.96	2.64	6.8755	1120	B+	1	4-5 hs	5	16.5-175.5	33.56 %	16 µg	36 hrs	34.13	1.2
Sorbitol	23.72	50.9	24.6	23.1	1.5	1.037	4320	O+	3	4-5 hs	3	16.9-166.7	39.72 %	16 µg	36 hrs	+11.2	1.3
Fructosa	0.3	98.7	24.6	15.12	9.48	82	1920	O+ Y A+	3	4-5 hs	5	17.8-184.5	4.95 %	16 µg			0.01

Tabla 22- Características bioquímicas de lectinas vegetales presentes en fracciones enriquecidas del extracto con Tris-HCl de raíz de *R. graveolens*

**Raíz extraída con PBS**

Fracción	[Proteína]	% Carb.	[Carb. Tot]	[Carb. Red]	[Carb. No Red]	Relac. P-C	UAH/mg	Afín Tip Sang	Máx. ° Aglut	Tiem Inc	# proteínas	PM kDa	Citotoxicidad [citotóxica]	Cito > 50%	Inhib. C o P	% Rto.	
Glucosa	22.73	25.9	7.98	2.64	5.34	0.351	480	O+ Y B+	2	4 hs	2	18-59	5.52 %	16 µg	No Represe	+52.77	6.3
Arabinosa	10.08	71.7	25.56	22.884	2.676	2.535	3644.44	O+	2	3-5 hs	2	18-182	+ 32 %	8 µg	Proliferativo	+15.8	2.8
Galactosa	34.1	12.7	4.98	2.7	2.28	0.146	4320	O+	2	3-5 hs	2	18-61.3	5.64 %	16 µg	No Represe	18.9	9.5
Maltosa	16.77	27.4	6.36	3.72	2.64	0.3792	3680	O+	2	4 hs	6	63-188	+6.73 %	4 µg	Proliferativo		4.6
Manitol	14.09	24.8	4.653	0.093	4.56	0.3302	273.33	A+	1	4-5 hs	6	83.3-186	5.12 %	16 µg	No Represe		3.9
Sacarosa	1.168	66.3	2.302	0.01	2.292	1.97	1120	B+	2	4-5 hs	6	64.9-182	5.18 %	16 µg	No Represe		0.32
Sorbitol	11.78	43.7	9.18	5.358	3.822	0.7792	4320	O+	1	4-5 hs	6	59.6-170	+27.16 %	4 µg	Proliferativo	11.18	3.2
Fructosa	7.62	81.3	33.18	30.12	3.06	4.3543	1920	O+ Y A+	2	4-5 hs	6	18-103.4	2.76 %	4 µg	No Represe		2.1

Tabla 23- Características bioquímicas de lectinas vegetales presentes en fracciones enriquecidas del extracto con PBS de raíz de *R. graveolens*

## 8. Discusión

De acuerdo al Instituto Nacional de Cancerología, los tratamientos adyuvantes más utilizados para el cáncer de mama disminuyen en un 33 % la recurrencia sistémica de la enfermedad y un 27 % la mortalidad, lo cual es independiente del estado ganglionar, menopáusico, expresión de receptores hormonales u otras terapias adyuvantes (Arce *et al*, 2011; Moreno, 2009), es por ello que se requieren nuevas terapias neoadyuvantes o adyuvantes que incrementen estas cifras.

Una de las alternativas para la búsqueda de nuevos medicamentos se basa en el uso de la etnobotánica, tal es el caso de la *Ruta graveolens* a la que se le han atribuido efectos antitumorales induciendo la muerte celular en diferentes tipos de cáncer por la presencia de moléculas como el 8-metoxi-psoraleno y la rutina (Instituto Salud Publica de Chile, 2005), así mismo se ha reportado la presencia de lectinas vegetales que de igual forma ejercen efectos adversos en células tumorales (Hernández, 2011; Flores, 2012; Ribeiro *et al*, 2009).

En los últimos años el estudio de las lectinas vegetales ha cobrado gran importancia gracias a que presentan un efecto antitumoral tanto *in vivo* como *in vitro*, como en el caso de las lectinas de *Ricinus communis*, *Phaseolus vulgaris* y *Viscum álbum* (Hernández, 1999; Hernández, 2005; Castillo *et al*, 2005; Reyes y Gallegos, 2011; Fu *et al*, 2011; Ingale y Hivrale, 2013; Liang *et al*, 2014; Bo *et al*, 2009; Bo *et al*, 2010, Bo *et al*, 2009; Silva *et al*, 2013; Jiang *et al*, 2015).

Uno de los objetivos de este trabajo fue el análisis de las lectinas vegetales presentes en la ruda a partir de las partes aéreas (hoja y tallo) y subterráneas (raíz) de la planta. De acuerdo a la bibliografía existen diferentes métodos de extracción fundamentados en el *Salting out* que promueve la disminución de la solubilización de las proteínas por el aumento de la fuerza iónica del medio, disminuyendo la interacción proteína-H<sub>2</sub>O por la pérdida de la capa de solvatación y provocando la precipitación de una mezcla proteica, lo cual dependerá de la concentración y del número de cargas eléctricas existentes en los cationes y aniones aportados por la sal. Dicho fenómeno provoca cambios en la tendencia de ionización de los grupos R disociables de una proteína, lo cual permite la separación y purificación de proteínas particulares (Villarrubia *et al*, 1995).

Por otra parte, las lectinas se encuentran principalmente en órganos de reserva como semillas (Castillo y Abdullaev, 2005; Hernández, 2005). Sin embargo también

es posible encontrarlas en hojas, tallos, corteza y frutos, mostrando una variación de la concentración de lectinas de acuerdo a las diferentes partes de la planta (Vázquez *et al*, 2012; Jiang *et al*, 2015).

Aunque son pocos los reportes para la extracción de lectinas vegetales en órganos vegetativos, la mayoría de los métodos reportados tienen como base el uso de soluciones salinas, sin embargo algunos presentan variaciones de pH y la adición de otros compuestos como: ácido ascórbico, Triton X-100, entre otros (Pereira *et al*, 2015; Rafig *et al*, 2014; Komatsu *et al*, 2009). Si comparamos el rendimiento reportado por Adenike y Babalola (2004) para hoja de *Kalanchoe crenata*, Yan *et al* (2009) para raíz de *Astragalus mongholicus* y Liu *et al* (2010) para tallos de *Pinellia pedatisecda* que mostraron un rendimiento de proteínas totales del 4.8 %, 1.8 % y 3.5 %, respectivamente, lo que es muy parecido a lo encontrado en este estudio, aunque el método de extracción utilizado es con un buffer de fuerza iónica media (PBS); mientras Andrade *et al* (2005) para hojas de *Bauhinia monandra* y He *et al* (2011) para raíces de *Ophioglossum pedunculatum* obtuvieron un rendimiento de 1.6 %, en este caso utilizaron solución de NaCl únicamente. Así toda la evidencia indica que la utilización de soluciones salinas simples es un método adecuado de extracción de proteínas totales que permite la purificación de proteínas tipo lectina; sin embargo en el caso de la ruda los extractos crudos presentaron un olor parecido al aceite esencial, además de color lo que puede ser indicativo de la presencia de terpenos que en su mayoría son insolubles en agua, aunque se ha reportado que algunos son miscibles en agua (Ávalos y Pérez, 2009).

Para el caso de la extracción de proteínas tipo lectina los métodos más utilizados son la extracción salina con cloruro de sodio que presenta alta fuerza iónica y el buffer de Tris-HCl de baja fuerza iónica, sin embargo existen pocos estudios que realicen una comparación de estos métodos. Basados en lo anterior se realizaron ambos métodos de extracción, obteniendo para la extracción de NaCl una concentración total de proteínas para hoja del 1.45 %, tallo 1.47 % y raíz 0.737 %, respecto a la masa inicial. Mientras que para la extracción con Buffer Tris/HCl la concentración total de proteínas para hoja 4.63 %, tallo 1.98 % y raíz 1.82 %. Aunque lo reportado por Torres (2006) se basa en la extracción de lectinas de *Phaseolus acutifolius* sus resultados brindan información para hacer esta comparación con nuestros resultados. Al comparar de igual forma los métodos de extracción, las extracciones con Tris-HCl, presentan una mayor concentración proteica; corroborando que la extracción con este buffer es adecuada para la



obtención de proteínas totales. Sin embargo no se corrobora con lo reportado por Flores (2012), en donde al utilizar una extracción con NaCl para lectinas de *R. graveolens*, se reportan concentraciones de 3.34 %, 2.55 % y 1.51 %, para cada órgano de la planta, respectivamente; lo anterior podría estar relacionado con la época del año en que se realizó la obtención de la planta, ya que el presente estudio se llevó a cabo cerca de la época de floración mientras que lo reportado en 2012 corresponde a los meses de enero y febrero, existiendo evidencia que se da una modificación en la producción de lectinas en respuesta al frío y en la época de floración (Komatsu *et al*, 2009).

Posterior al proceso de diálisis se obtuvo que los extractos con Tris-HCl presentaron principalmente proteínas con un peso menor a 3 kDa en comparación con los extractos hechos con NaCl, donde lo reportado indica que el peso molecular de las lectinas vegetales oscila entre 12 a 65 kDa (Hernández, 2005). Lo que sugiere que el buffer de baja fuerza iónica genera la precipitación de proteínas con un peso molecular más bajo al de las proteínas tipo lectina.

Una de las técnicas ampliamente reportadas para la semipurificación de proteínas tipo lectina es la cromatografía de afinidad la cual aprovecha la alta afinidad de las proteínas por grupos químicos específicos estableciendo enlaces no covalentes, para después ser eluida por un ligando libre (Berg *et al*, 2008; Nelson y Cox, 2008). Siendo las matrices más utilizadas para la purificación de lectinas vegetales el Sephadex que es un complejo de glucosa que presentan grupos OH y CH<sub>2</sub>, y la Sepharosa que son complejos de 2 galactosas con grupos CH<sub>2</sub> y OH además puede contener un grupo tiol activo, grupos oxiranos libres y grupos éster; la presencia de todos estos grupos funcionales permite que haya una unión con enlaces C=O, N=N, C=C, interacción con grupos OH, NH<sub>2</sub> y SH (Sigma Aldrich); sin embargo para la cromatografía de afinidad se ha reportado la utilización de otras matrices como: acrilamida y silica gel (Valcarcel, 1988). En el caso de la silica gel presenta dos oxígenos unidos al sílice por dobles enlaces, estableciendo una conformación muy parecida a la que presentan los oxígenos del grupo éster lo cual permitiría el establecimiento de uniones entre los oxígenos de la silica y la proteína, similares a los presentados con el grupo éster.

Pereira *et al* (2015) reporta la utilización de una matriz de sílice, como una segunda cromatografía para la obtención de lectinas de *Colocasia esculenta*; mientras en este estudio se utilizó una matriz de sílice para una cromatografía única, en donde se encontró que se puede dar la separación de proteínas con capacidad de aglutinación de eritrocitos.

Los estudios sobre la purificación de lectinas vegetales que utilizan la técnica de cromatografía de afinidad (Ganem *et al*, 2000, Sierra *et al*, 1999 y Mendoza *et al*, 2006) establecen una elución cromatográfica por medio de glucosa, mientras los resultados reportados por Flores (2012) para lectinas de *R. graveolens* establecen un rango de 6 a 13 % del total proteico al utilizar una extracción de alta fuerza iónica; sin embargo los resultados obtenidos en este estudio muestran un rendimiento del 32 al 49 % para el mismo tipo de extracción salina, las diferencias obtenidas podrían estar asociadas a la modificación en la elución de la columna para cromatografía de afinidad, en donde la elución se realizó con nueve azúcares diferentes; demostrando que dentro de las proteínas de la ruda se presenta una variedad de proteínas tipo lectina con afinidad a diferentes azúcares.

Completados los procesos de semipurificación (diálisis y cromatografía de afinidad) se obtuvo que el rendimiento de lectinas vegetales respecto al total de proteína en las extracciones realizadas con NaCl fue para hoja 32.5 %, tallo 45.3 % y raíz 48.78 %, mientras que las extracciones de Tris-HCl tuvieron una concentración de 13.49 % para hoja, 30 % en tallo y 6.58 % en raíz; los cuales son superiores a lo reportado por Castillo y Abdullaev (2005) donde las proteínas tipo lectinas constituyen de 2 a 10 % del total de proteína. Aunque con Tris-HCl se obtuvo aproximadamente entre 2 y 3 veces más de la concentración de proteínas con respecto a la extracción con NaCl; el rendimiento para la obtención de lectinas vegetales respecto al total proteico es menor. Lo anterior permite refutar lo reportado por Torres (2006) que establece la extracción con Tris-HCl como el mejor método de extracción de proteínas tipo lectina, ya que en este estudio se establece un mayor rendimiento al utilizar una extracción de alta fuerza iónica (NaCl).

Dentro de las características estructurales de las proteínas tipo lectina está la presencia de hojas  $\beta$  en barril que constituyen la cadena polipeptídica, con 2 a 15 monosacáridos residuales constituidos por 2 o más azúcares (Hernández, 2011; Vázquez *et al*, 2012; Jiamg *et al*, 2015), los cuales son adquiridos por el proceso de glicosilación.

La glicosilación de proteínas puede ser de dos tipos N-glicosilación cuando la unión de oligosacáridos se da en un residuo de asparagina que pueden presentar manosa, N-acetil-D-glucosamina, y la O-glicosilación cuando se da la unión de un monosacárido en un residuo serina/treonina que presentan N-acetil-D-galactosamina (Toscano *et al*, 2006; Gallegos *et al*, 2008; Jiménez *et al*, 2002 ); este proceso de glicosilación genera cadenas oligosacáridicas constituidas por tres

regiones: a) el núcleo o core, que es la región donde se encuentran los carbohidratos más cercanos al sitio de unión con la cadena polipeptídica, b) el esqueleto, que es la región en donde se determina la longitud del oligosacárido y c) la región periférica, donde se encuentran los antígenos de importancia biológica (Gallegos *et al*, 2008), esta conjugación se produce con un total de 13 monosacáridos y 8 aminoácidos que forman por lo menos 41 tipos de enlaces glicosídicos (Gabiús *et al*, 2011). Para las lectinas vegetales se han identificado otros azúcares unidos en la glicosilación como son: D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido salicílico, glucosamina y galactosamina (López, 2013).

Como parte de la caracterización parcial se llevó a cabo la cuantificación de azúcares totales, reductores y no reductores, donde los datos obtenidos muestran que existe una mayor presencia de azúcares no reductores dentro de la estructura proteica, al constituir aproximadamente el 95 % del total de azúcares presentes en las fracciones obtenidas de los extractos de ruda con una correlación proteína-carbohidrato de 0.1 a 5 mg de carbohidrato por cada mg de proteína; sin embargo la mayoría de los carbohidratos asociados a la estructura de las proteínas tipo lectina son de tipo reductor (López, 2013) los cuales constituyen los cores de elongación del oligosacárido, mientras que los azúcares no reductores presentes en estas muestras podrían estar constituyendo la región periférica de la cadena. Por otra parte, comparando ambos métodos de extracción, se encontró que las fracciones de los extractos hechos con Tris-HCl, aunque presentan una mayor concentración de proteínas tuvieron una menor relación P-C en comparación con las fracciones del extracto de NaCl; lo anterior puede sugerir que el método de extracción de baja fuerza iónica puede generar la obtención de otras lectinas vegetales respecto a las obtenidas con NaCl o la posible pérdida del enlace glicosídico disminuyendo la concentración de carbohidratos.

De acuerdo a la definición de lectinas vegetales son proteínas que presentan la capacidad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos y moléculas glicosiladas (Hernández, 1999). Esta capacidad de reconocer carbohidratos específicos les brinda su principal efecto biológico, la hemaglutinación.

El proceso de aglutinación consiste en la agregación sistemática de células, mediada por macromoléculas específicas (anticuerpos o lectinas) que reconocen estructuras moleculares determinadas (antígenos) sobre la superficie celular, que

estará determinada por el número de determinantes antigénicos y de su localización sobre la superficie de la célula. (Rodríguez *et al*, 2004). En el caso de los eritrocitos presentan en sus membranas moléculas lipídicas, proteicas y carbohidratos, formando oligosacáridos y polisacáridos que forman los grupos sanguíneos (Gallegos, 2008 y Santoyo *et al*, 2003).

La especificidad que tienen las lectinas vegetales sobre los grupos sanguíneos del sistema ABO está mediada por los antígenos sanguíneos, generados por la variación en la presencia de carbohidratos de los glicoconjugados de la superficie del eritrocito. Todos los humanos presentan el gen *H*, que codifica a la transferasa H, que se encarga de la unión de una molécula de L-fucosa a la galactosa terminal de un precursor común denominado sustancia precursora que se encuentra unida a lípidos o proteínas de la membrana de los eritrocitos, formando al antígeno H, que es el precursor del sistema ABO. Por su parte el gen *ABO* posee los alelos A, B y O, donde el alelo A codifica la transferasa A que cataliza la adición de N-acetilgalactosamina al antígeno H dando una secuencia de Gal-Fuc-GalNAc, el alelo B codifica la transferasa B que cataliza la adición de un residuo de D-galactosa al antígeno H generando una secuencia Gal-Fuc-Gal, y el alelo O solo difiere del alelo A en la delección de un nucleótido lo que tiene como consecuencia la producción de una transferasa sin actividad por lo cual se forma una secuencia Gal-Fuc (Arbeláez, 2009 y Santoyo *et al*, 2003).

En el proceso de hemaglutinación se presentan interacciones lectina-carbohidrato, que pueden generar entrecruzamientos de dos tipos: I) una lectina divalente forma un entrecruzamiento con un carbohidrato monovalente en una dimensión y II) se refiere al entrecruzamiento entre lectinas y carbohidratos multivalentes de los cuales una de las dos moléculas posee una valencia mayor a dos y forma complejos entrecruzados en dos o tres dimensiones, los cuales pueden precipitar en solución (Bernal, 2007), siendo este tipo de entrecruzamiento el que se genera en la hemaglutinación.

Se determinó que el grupo sanguíneo A+ fue el que presenta un mayor efecto hemaglutinante en la mayoría de las fracciones de hoja y tallo, mientras que las fracciones de raíz tuvieron mayor actividad en el tipo O+. Lo anterior se correlaciona con lo reportado por Hernández (2011) y Flores (2012), sugiriendo que las lectinas de hoja y tallo presentan una mayor afinidad al carbohidrato N-acetilgalactosamina y las de raíz mostraron mayor afinidad a la L-fucosa.

Aunque las lectinas de la ruda presentan mayor afinidad por un grupo sanguíneo, también presentan un efecto hemaglutinante en otros grupos de sangre del sistema ABO, por lo tanto se podrían clasificar dentro de las lectinas no específicas (Adenike y Babalola, 2004). Sin embargo, tomando en consideración que las fracciones obtenidas están semipurificadas puede indicar que existe una mezcla de proteínas tipo lectina con afinidad a diferentes azúcares, así como la presencia de más de un dominio de reconocimiento a carbohidratos.

La interrupción de diversas interacciones no covalentes que estabilizan la estructura proteica por modificaciones térmicas, de pH y la unión de iones metálicos pueden resultar en la pérdida parcial o completa de la estructura y la actividad biológica de las lectinas vegetales (Biswas, 2014; Gabius *et al*, 2011). Debido a su carácter anfoterico, las lectinas pueden aceptar o donar protones, por lo que los cambios en pH afectan su estado de ionización lo que genera cambios en su punto isoeléctrico dando como resultado cambios en la hidrofobicidad, en las fuerzas de Van der Waals, en la formación de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas, lo que promueve cambios en la estructura (Berg *et al*, 2008; Nelson y Cox, 2008) y por consiguiente pueden afectar la unión de iones metálicos y repercuten en su efecto biológico.

Por otra parte se encontraron diferencias significativas en la actividad hemaglutinante dadas por el método de extracción utilizado, ya que al comparar fracciones de un mismo órgano eluidas con el mismo carbohidrato presentaron diferencias en la hemaglutinación, siendo las fracciones de los extractos de NaCl las que presentan un mayor rango de AEU/mg en comparación con las fracciones del extracto hecho con Tris-HCl. De acuerdo a lo reportado por Hernández (2011) y Torres (2015), el rango de estabilidad a pH de las lectinas de *Ruta graveolens* es de 5.4 a 8.4, aunque estas diferencias podrían estar asociadas a la diferencia en el pH de ambas soluciones; sin embargo ambas soluciones de extracción se encuentran dentro de este rango de estabilidad, lo cual hace suponer que la diferencia en el efecto hemaglutinante puede estar relacionado con la obtención de lectinas diferentes, por la pérdida de carbohidratos en su estructura (que se observó en la cuantificación de carbohidratos), por diferentes grados de ionización o por la captura de iones metálicos por parte del Tris-HCl, dando como resultado un posible cambio conformacional de las lectinas, generando cambios en la afinidad y exposición u ocultamiento de sitios de unión específicos diferentes (Rodríguez *et al*, 2004).

Ponce *et al* (2007) define a la cinética de la hemaglutinación como la extinción óptica relativa producida por un haz de luz transmitido a través de una suspensión de pequeñas partículas (glóbulos rojos y aglutinados), siendo que la extinción óptica relativa decrece cuando aumenta el tamaño de los aglutinados por unidad de tiempo. Tomando en consideración el tipo de aglutinados y el tiempo mínimo para alcanzar la aglutinación, se obtuvo que las lectinas de *R. graveolens* en su mayoría alcanzan su máximo grado de aglutinación de eritrocitos a las 3-5 hrs de incubación a concentraciones de 100 µg, así como el incremento del tiempo de incubación conforme disminuye la concentración de proteína.

Comparando la cinética de hemaglutinación entre los métodos de extracción se observó que a las mismas concentraciones de proteína presentan grados de aglutinación iguales; lo cual sugiere que la actividad hemaglutinante hace referencia a la concentración en la que aún se presentan una aglutinación, mientras el grado de aglutinación se refiere al número de moléculas o células que puede unir una misma lectina. Por otra parte, se observó que sí bien se presentan los mismos grados de aglutinación, el tiempo de incubación es mayor para las fracciones de la extracción de baja fuerza iónica; lo cual puede corroborar la presencia de diferentes lectinas que presentan una afinidad a un mismo carbohidrato o diferente número de dominios de reconocimiento, o que la posible pérdida de carbohidratos modifique la exposición de dominios de reconocimiento.

Inmunológicamente la inhibición de la hemaglutinación por lectinas se basa en que la lectina incubada previamente con carbohidratos, es inhibida cuando se incuba con eritrocitos que presentan el antígeno sanguíneo que esta lectina puede reconocer y por lo tanto en presencia de eritrocitos, estos no pueden ser aglutinados (Rodríguez *et al*, 2004, Aguilar, 2004).

Mientras que las lectinas generalmente tienen afinidades bastantes bajas a sus carbohidratos afines que pueden variar de M a mM. Estas moléculas son con frecuencia multivalentes, permiten no sólo su unión a monómeros u oligosacáridos más afines a través de interacciones de cadena principal, sino a otros carbohidratos a los cuales presentan menor afinidad (De HoV *et al*, 2009; Rafiq *et al*, 2014).

En el caso de lectinas vegetales de *R. graveolens* se requiere una concentración mínima de carbohidrato para inhibir la actividad hemaglutinante de 10 µM para azúcares como glucosa, arabinosa, lactosa, manitol, sacarosa, sorbitol y fructosa; mientras que azúcares como galactosa y maltosa la concentración es de 200 a 50

$\mu\text{M}$ . De acuerdo a lo reportado por Hernández (2011) para las lectinas de hoja de ruda y lo reportado por Necib *et al* (2014) son inhibidas con azúcares como galactosa, glucosa, sacarosa, lactosa y fructosa a concentraciones similares a las utilizadas en este estudio.

Reportes como los de De HoV *et al* (2009), Agrawal *et al* (2011), Biswas *et al* (2009) y Pereira (2015) demuestran que al realizar la extracción de lectinas vegetales de diferentes órganos de una misma planta pueden localizar lectinas específicas en un órgano como semillas, pero también encontrarlas en niveles muy bajos en órganos vegetativos presentando una similitud de secuencia del 30 al 60 % con las lectinas de semillas, a las cuales se les denomina isolectinas que tiene alto impacto en la función biológica por modificación de sus estructuras cuaternarias ofreciendo una alternativa en el reconocimiento a carbohidratos, lo que se ha generado como una estrategia adaptativa para recompensar la falta de alta especificidad (Bo *et al*, 2010); mientras que en otros casos se han encontrado lectinas en órganos vegetativos con secuencias diferentes a las lectinas encontradas en órganos de reserva. Estas dos alternativas se pueden presentar debido a que las lectinas vegetales pueden ser producto de los mismos genes y sufren splicing alternativo, mutaciones puntuales, modificaciones post-traduccionales o escisiones proteolíticas (Agrawal *et al*, 2010), y por la síntesis a partir de genes independientes (Agrawal *et al*, 2011).

Hernández (20011) y Flores (2012) reportan la presencia de una proteína tipo lectina en la hoja de *R. graveolens* de 25 kDa, sin embargo esta misma lectina solo se identifica en la fracción de glucosa del extracto realizado con Tris-HCl, por otra parte lo obtenido en este trabajo corrobora la presencia de proteínas entre un peso de 12 a 75 kDa que concuerda con la bibliografía anterior. En el caso de tallo y raíz, Flores (2012) reporta la presencia de proteínas con un peso de 34 a 38 kDa, sin embargo este estudio muestra en cada órgano una diversidad de proteínas con un peso de 10.5 a 188 kDa con una amplia abundancia de proteínas con pesos entre 14 y 70 kDa, lo cual esta correlacionado con lo reportado por Hernández (2005) respecto al peso molecular de la mayoría de las lectinas encontradas en la naturaleza. Al presentarse un rango de proteínas similar en los tres órganos, podría ser indicativo de la presencia de isoformas de lectinas vegetales y lectinas específicas para cada órgano que pueden estar formadas por subunidades proteicas lo cual puede estar relacionado con la cantidad de bandas presentes; además se debe tomar en cuenta que posiblemente se presentan otras proteínas ya que las fracciones son semipurificadas, por lo cual se requiere la utilización de otra técnica como la tinción

de Shiff para determinar cuáles de esas bandas corresponde a glicoproteínas y posteriormente enfocarse en realizar la purificación completa de esas bandas.

Al comparar los perfiles electroforéticos de los dos métodos de extracción se presentan diferencias entre fracciones eluidas con un mismo carbohidrato, siendo que las fracciones del buffer de baja fuerza iónica presentan un mayor número de bandas con un menor peso molecular, así como un rango de peso molecular mayor; sugiriendo la obtención de moléculas diferentes o por la posible pérdida de carbohidratos de la estructura de la proteína.

Dentro de los cambios estructurales sufridos por las células durante la transformación maligna se encuentran los cambios asociados a los estados de glicosilación de las proteínas de superficie (Saeland *et al*, 2011). Estas modificaciones en el glicocódigo son fundamentales en procesos clave como la comunicación celular, la transducción de señales al modificar la intensidad de la señal (dependiente de la cantidad de glicano detectado) (Fry *et al*, 2011), el plegamiento de proteínas y su estabilidad, además de potenciar la diseminación metastásica (Neela *et al*, 2011).

Muchas lectinas vegetales han sido utilizadas en concentraciones nanomolares por sus propiedades mitogénicas para el estudio de la proliferación y migración de linfocitos en cultivo (Hernández, 1999). También han sido empleadas para el análisis de funciones linfoproliferativas y citotóxicas a altas concentraciones en células mononucleares (Castillo *et al*, 2005).

Muchos autores como Castillo *et al* (2005) denotan el uso de las lectinas vegetales como agentes anticancerígenos, ya que reconocen con mayor eficiencia los cambios en la glicosilación de las células tumorales, esto mediado por la unión a carbohidratos permitiendo estudiar los cambios que ocurren en la superficie celular (Valadez *et al*, 2006). Además del reconocimiento de células tumorales, se ha adjudicado a las lectinas un efecto antiproliferativo y citotóxico, generando su potencial uso como anticancerígenos (Castañeda *et al* 2006; Hernández, 2005; Zhao *et al*, 2014; Valadez *et al*, 2014; Liang *et al*, 2014; Bo *et al*, 2009; Zhang *et al* 2015).

El mecanismo que presentan las lectinas vegetales es por medio del enlazamiento a monosacáridos de la membrana celular y actúan enviando señales que generan cambios bioquímicos en la célula que son los responsables de la unión con la lectina, mientras otras unidades de carbohidratos que se extiende sobre la



membrana son responsables de la transmisión del mensaje y la activación de segundos mensajeros, como es el caso de las lectinas de muérdago y *Euphorbia trigona* (Ingale y Hivrale, 2013; Villanueva *et al*, 2015); por lo que los diferentes estados de glicosilación presentes en una célula generan respuestas diferentes a diferentes tipos de lectinas y diferente concentración de las mismas (Vázquez *et al*, 2012). Dentro de los mecanismos de acción propuestos se encuentra la unión a moléculas de adhesión, una internalización de la lectina afectando la división celular o a través de la inducción de la apoptosis por diferentes vías (Castañeda, 2006).

En el caso de lectinas vegetales de *R. graveolens* existen pocos reportes sobre su actividad antitumoral; sin embargo la planta ha sido ampliamente utilizada como anticancerígeno mediado posiblemente por la presencia de lectinas vegetales. En este trabajo se evaluó el efecto citotóxico de las lectinas presentes en la ruda sobre células MCF-7 de cáncer de mama, obteniendo que las fracciones de tallo (Tris-HCl) y raíz (NaCl) presentaron un mayor efecto citotóxico en concentraciones de 2 y 4 µg con una reducción de la viabilidad celular del 60 % aproximadamente, lo cual concuerda con lo reportado por Flores (2012) donde las lectinas de estos mismos órganos presentaron un efecto citotóxico en células MCF-7.

El efecto citotóxico presentado por la lectinas extraídas de la ruda pueden tener diferentes mecanismos de acción como los que se han reportado para lectinas de otras plantas (Fu *et al*, 2011; Ingale y Hivrale, 2013; Liang *et al*, 2014; Bo *et al*, 2009; Bo *et al*, 2010, Bo *et al*, 2009; Silva *et al*, 2013; Jiang *et al*, 2015); como es a través de la unión a moléculas de superficie celular y activar vías de señalización como la apoptosis vía extrínseca o por la inhibición de vías de supervivencia como PI3k/Akt (Fu *et al*, 2011); así como por medio de la internalización presentando un mecanismo similar a las lectinas inactivadoras de ribosomas, las cuales impiden la síntesis de proteínas (el proceso inicia con la unión de una de las subunidades con restos de carbohidratos constituyentes de gliconjugados, seguido por la internalización de una segunda subunidad y su transporte al retículo endoplasmático) (Gallego, 2014; Villanueva *et al*, 2015); lo cual debe ser evaluado para corroborar el mecanismo por el que se ejerce el efecto citotóxico de las lectinas de ruda.

Es importante mencionar que se encontraron diferencias significativas en el efecto citotóxico mostrado, lo cual depende del tipo de extractante utilizado. Ya que en los casos de hoja y raíz se obtuvo un mejor efecto de las fracciones extraídas con NaCl en comparación con las fracciones de Tris-HCl. Sin embargo, en el caso de tallo las

fracciones que presentaron un mejor efecto fueron las del extracto de Tris-HCl; estas diferencias pueden estar relacionados con un posible cambio conformacional causado por la pérdida de carbohidratos o por la obtención de diferentes lectinas vegetales, como se mencionó anteriormente.

Por otra parte, en este estudio se observó que otras fracciones enriquecidas con lectinas de *R. graveolens* tienen un efecto mitogénico en células MCF-7, lo anterior puede estar relacionada a la presencia de varias lectinas con efectos diferentes, a su capacidad de reconocer distintos carbohidratos o la formación de conjugados lectina-lectina que pueden generar diferentes efectos dentro de la célula, lo cual también puede estar asociado con las concentraciones utilizadas; ya que también se observó que en concentraciones bajas algunas fracciones presentan un efecto proliferativo, pero en concentraciones altas presentan un efecto citotóxico.

También se debe recordar que las diferentes lectinas vegetales que se presentan dentro de una misma planta reconocen diferentes carbohidratos y además de mostrar diferencias en la afinidad, lo que además puede generar uniones célula-lectina y activación de señales de forma subsecuente, dada por la diferencia en afinidades y el conjunto de todas genere respuestas finales diferentes.

Estudios como los de Silva *et al* (2013), Valadez *et al* (2014) y Zhao *et al* (2014) que evalúa la cinética del efecto citotóxico en células MCF-7 de lectinas de *Bauhinia forticata*, frijol tepari y frijol moteado japonés, respectivamente, muestran que a concentraciones similares a las utilizadas en este estudio, se presenta un efecto citotóxico dependiente de la concentración y del tiempo de incubación ya que reportan una disminución celular del 40 % a las 48 hrs de incubación a concentraciones de 10  $\mu$ M; lo anterior se correlaciona con los resultados obtenidos, ya que en el caso de las lectinas de *R. graveolens* a concentraciones de 4, 8 y 16  $\mu$ g después de 48 hrs de incubación se presenta una reducción del 58 %.

Estructuralmente las lectinas vegetales están formadas por una cadena polipeptídica con o sin residuos de carbohidratos, con al menos dos sitios de unión permitiendo su enlace a un azúcar específico y a una molécula glicosilada. Sin embargo, existen algunas lectinas que pueden reconocer hasta diez carbohidratos diferentes de forma específica (Hernández, 1999 y Vázquez *et al*, 2012).

Al presentar varios sitios de reconocimiento dentro de una misma lectina se puede explicar que en presencia del azúcar al que presenta una mayor afinidad, pierdan o modifiquen su efecto citotóxico o proliferativo sobre células MCF-7 al permitir que uno o más sitios con afinidad a diferentes azúcares puedan ejercer su efecto. Lo que podría explicar que en las lectinas de la *R. graveolens* que presentan un efecto citotóxico o proliferativo, en presencia del azúcar utilizado en la elución

cromatografía sature sus sitios de reconocimiento o formar conjugados y puedan generar un cambio conformacional que exponga otros dominios de unión que les permita modificar el efecto presentado sin el carbohidrato.

Una de las consecuencias de la transformación maligna son los cambios en la glicosilación lo que determina que algunos tipos de cores, que en las células normales se encuentran enmarcados por la adición de azúcares queden expuestos en la superficie celular, resultando en la formación de antígenos asociados al cáncer. En el caso del cáncer de mama los antígenos que se han encontrado son: 1) antígeno Tn que presenta una O-glicosilación en Ser/Thr con la unión de N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) formando un core, 2) antígeno sialil-Tn que presenta una O-glicosilación en Ser/Thr con la unión de ácido siálico (NeuA) y un core GalNAc, 3) antígeno T o TF presenta una O-glicosilación en Ser/Thr con la unión de D-galactosa (Gal) a un core de GalNAc y 4) antígeno sialil-T presenta una O-glicosilación en Ser/Thr con la unión de un NeuA unido una Gal+GalNAc (Gallegos *et al*, 2008). Así las lectinas vegetales de la ruda pueden reconocer a las células tumorales y por ende generar un efecto citotóxico a través de diferentes mecanismos como los que se proponen en la figura 28.

Además, al comparar la actividad hemaglutinante y el efecto citotóxico se encontraron diferencias, ya que en la hemaglutinación las fracciones de los extractos hechos con NaCl fueron las que tuvieron un mayor efecto mientras que en la acción citotóxica tienen menor función, y de forma inversa en las fracciones de los extractos de Tris-HCl. De acuerdo a lo reportado por la bibliografía, las células de cáncer de mama van a expresar antígenos específicos que presentan residuos de carbohidratos como GalNAc y Gal. De igual forma, Torres (2010) reporta que la línea MCF-7 presenta en mayor proporción el antígeno Tn, por lo que la mayoría de las glicosilaciones membranales presentarían el residuo GalNAc y por tanto se esperaría que las lectinas que presentaron un efecto hemaglutinante mayor para el tipo sanguíneo A+ fueran las que presentaran un mayor reconocimiento y efecto citotóxico, y de la misma forma para las lectinas que reconocen el tipo B+ y por consecuencia podría reconocer al antígeno T por su residuo de galactosa. Sin embargo tomando en consideración que las secuencias oligosacáridicas son diferentes a las que se presentan en los eritrocitos, puede generar diferencias en el reconocimiento aunque presenten afinidad al mismo monosacárido.

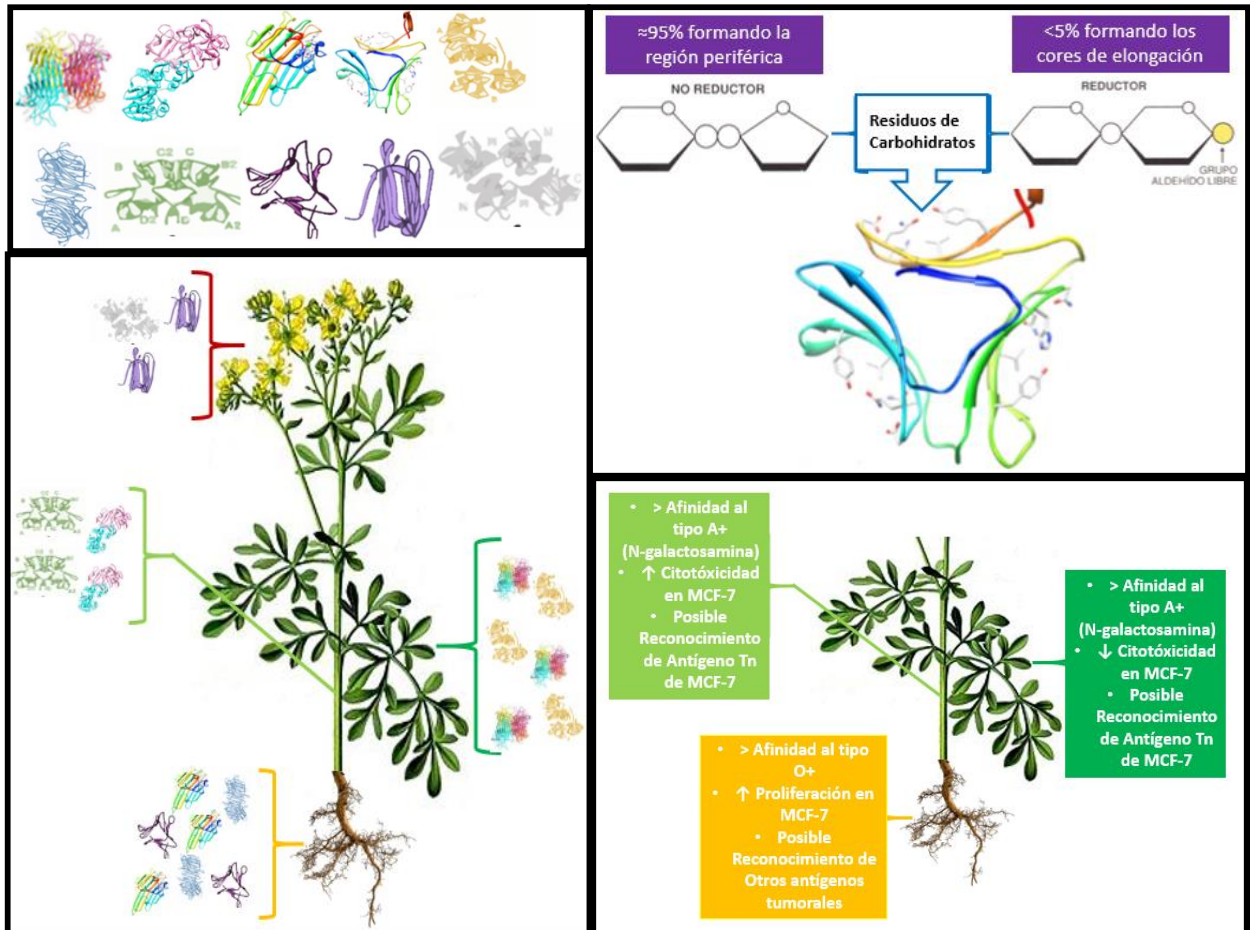


Fig. 27. Distribución de lectinas vegetales en *R. graveolens*. Superior Izquierda- Mezcla de Proteínas tipo Lectina presentes en la *R. graveolens*. Inferior Izquierda- Lectinas Vegetales distribuidas diferencialmente a través de toda la planta. Superior Derecha- Estructura de lectinas Vegetales de *R. graveolens* conformada principalmente por carbohidratos de tipo no reductor. Inferior Derecha- Lectinas de cada órgano presentan diferencias en su actividad biológica.

## Mecanismos de Acción

Citotoxicidad

Proliferación

Externa

Interna

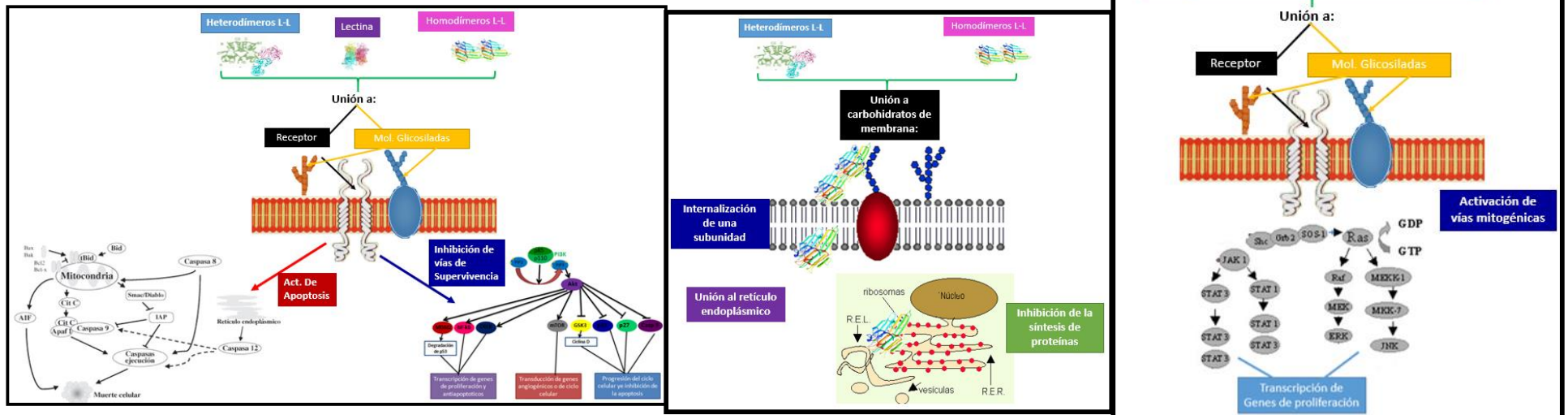


Fig. 28. Mecanismos de Acción ejercidos por lectinas vegetales de *R. graveolens*. Izquierda- Efecto citotóxico a nivel de membrana mediado por receptores o moléculas glicosiladas de la superficie celular que pueden activar la apoptosis o inhibir vías de supervivencia. Central- Efecto citotóxico a nivel interno, donde el conjunto de subunidades reconocen un carbohidrato de membrana lo que permite internalización de una de las subunidades que impide la síntesis de proteínas. Derecha- Mecanismos de proliferación por medio de la unión a receptores o moléculas de superficie celular que median la activación de vías de señalización inductoras de proliferación

## 9. Conclusiones

- La *Ruta graveolens* presenta una variedad de lectinas vegetales que tienen afinidad a diferentes carbohidratos por la obtención de diferentes fracciones eluidas con diferentes azúcares.
- La extracción con el buffer de baja fuerza iónica (Tris-HCl) presentó un rendimiento de proteínas totales mayor en comparación al buffer de alta fuerza iónica (NaCl), sin embargo el mayor rendimiento de proteínas tipo lectina se presentó en las extracciones con NaCl.
- El órgano de la ruda que presenta una mayor proporción de proteínas tipo lectina es raíz con el 48.78 %, seguido de tallo con 32.08 % y hoja con el 12.57 %.
- Los carbohidratos presentes en la estructura tipo lectina son de tipo reductor en los cores de glicosilación y de tipo no reductor en los residuos de las cadenas glicosiladas.
- Se presentó una disminución en la concentración de carbohidratos presentes en las fracciones extraídas con el buffer de baja fuerza iónica.
- La relación promedio proteína-carbohidrato en las fracciones enriquecidas con lectinas vegetales de ruda es aproximadamente 0.1 a 5 mg por cada 1 mg de proteína.
- El efecto hemaglutinante de las lectinas vegetales de ruda se presenta a una concentración mínima de 12.5 µg. Donde las lectinas de hoja y tallo reconocen con mayor afinidad al tipo sanguíneo A+, mientras las lectinas de raíz reconocen principalmente al tipo O+; donde el efecto dado es mayor en los extractos proteicos totales, que en las fracciones enriquecidas con lectinas vegetales.
- La extracción con NaCl tiene más fracciones con actividad aglutinante, pero las fracciones del extracto de Tris-HCl en su mayoría reconocen los mismos grupos sanguíneos que el buffer de alta fuerza iónica (NaCl), no obstante con menor actividad.
- Las lectinas de ruda requieren un tiempo de incubación de 3 hrs para alcanzar su máximo grado de aglutinación, lo cual aumenta al disminuir la concentración de proteína.
- La mayoría de las fracciones con alta actividad aglutinante, presentan altos grados de aglutinación en tiempos más cortos.
- Las lectinas vegetales de *R. graveolens* presentan alta afinidad a concentraciones µM de azúcares como Glu, Ara, Lac, Man, Sac, Sor y Fru; contrario a su baja afinidad por azúcares como Gal y Mal.

- La *R. graveolens* presenta proteínas tipo lectina con un peso aproximado de 10.5 a 180 kDa.
- El número de bandas proteicas presentes en las fracciones, está relacionado con una mayor concentración de proteína y una mayor actividad aglutinante.
- El tallo y la raíz de *R. graveolens* contienen lectinas vegetales que presentan un efecto citotóxico sobre células MCF-7, dependiente de la concentración y del tiempo de incubación. Con una reducción del 60 % en un rango de concentración de 2 a 8 µg y un tiempo de 48 hrs.
- Las lectinas de raíz extraídas con Tris-HCl y PBS presentaron un efecto mitogénico en células MCF-7 en concentraciones de 2 y 4 µg.
- Al inhibir el efecto citotóxico o mitogénico de las lectinas vegetales de ruda en células MCF-7, presentan un cambio en su efecto o una drástica reducción del mismo.
- De todo el conjunto de lectinas vegetales la fracción de raíz extraída con NaCl con alta afinidad a arabinosa, presenta un efecto citotóxico del 80 % en células MCF-7, además de mantener el efecto citotóxico aun en presencia del carbohidrato.
- Fracciones con actividad hemaglutinante presentan efecto citotóxico en células MCF-7, excepto las fracciones de Raíz extraídas con Tris-HCl y PBS

## 10. Perspectivas

- Realizar la purificación de las lectinas presentes en la fracción RNaCl Ara y probar su actividad citotóxica en células MCF-7.
- Completar la caracterización bioquímica de las lectinas vegetales presentes en la ruda.
- Probar a nivel *in vivo* el efecto citotóxico dado por las lectinas presentes en la *Ruta graveolens*.
- Determinar la farmacocinética y farmacodinamia de las lectinas presentes en la *Ruta graveolens*.
- Determinar el mecanismo por el cual las lectinas vegetales de ruda ejercen un efecto citotóxico.



## 11. Literatura Citada

- Adenike K and Babalola E (2004) **“Purification and Partial Characterization of a Lectin From the Leaves of *Kalanchoe crenata* (Andr.) Haw”** Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol.37, No. 2 pp.229-233
- Agrawal P, Kumar S and Das H (2010) **“Mass spectrometric characterization of isoform variants of peanut (*Arachis hypogaea*) stem lectin (SL-I)”** Journal of Proteomic Vol. 73 pp 1573-1586
- Agrawal P, Kumar S, Jaiswal Y, Das H and Das R (2011) **“A Mesorhizobium lipopolysaccharide (LPS) specific lectin (CRL) from the roots of nodulating host plant, *Cicer arietium*”** Biochimic Vol. 93 No. 44
- Aguilar V, (2004) **“Reacciones de aglutinación”** Gac Méd Méx Vol. 140, Suplemento No. 3
- Alessandra C, Marjolein R and Carl G (2005) **“How C-type lectins detect pathogens”** Cellular Microbiology 7 (4) 481-488
- Alonso J, (2004) **“Tratado de fitofármacos y nutracéuticos”** 1ªEd. Editorial Corpus Libros. Rosario. Argentina. Pág. 939-944
- Ambrosi M, Cameron N and Davis B (2005) **“Lectins: tolos for the molecular understanding of the glycode”** Org. Biomol. Chem Vol. 3 pp 1593-1608
- American Cancer Society (2013) **“Breast Cancer Facts & Figures 2013-2014. Atlanta”** American Cancer Society, Inc.
- Andrade C, Baszkin A, Santos N, Coelho L and Melo C (2005) **“Dielectric properties of *Bauhinia monandra* and Concanavalin A lectin monolayers, part I”** Journal of Colloid and Interface Science 289 pp 371-378
- Arbeláez C (2009) **“Sistema de grupos sanguíneo ABO”** Medicina & Laboratorio vol. 15 Número 7 pp:329-348
- Arce C, Bargalló E, Villaseñor E, Villaseñor Y, Gamboa C, Lara F, Pérez V y Villareal P (2011) **“Onco Guía Cáncer de Mama”** Instituto Nacional de Cancerología, México, pp: 77-86
- Beltrán A (2010) **“Cáncer de mama-México”** Instituto Nacional de Cancerología, México, pp:27-45
- Benavides V, Trujillo G, DÁrrigo G, Paredes U y Pino J (2000) **“Evaluación Toxicológica Preliminar de *Ruta graveolens*, *Origanum vulgare* y *Persea americana* sobre embriones preimplantacionales de ratón”** Rev. Peru. Biol. 7(1): 86-88
- Berg J, Tymoczko J and Stryer L (2008) **“Bioquímica”** Editorial Reverté, Sexta edición pág. 70
- Bernal C (2007) **“Estudios fisicoquímicos y estructurales de la interacción proteína-proteína y proteína-ligando de una lectina del mejillón *Mytilus edulis*”** Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México
- Biswas S, Agrawal P, Saroha A and Das H (2009) **“Purification and Mass Spectrometric Characterization of *Sesbania aculeata* (Dhaincha) Stem Lectin”** Protein Journal Vol. 28 pp 391-399
- Biswas H and Chattopadhyaya R (2014) **“Thermal, Chemical and pH Induced Unfolding of Tumeric Root Lectin: Modes of Denaturation”** PLoS One 9(8)



- Bo L, Zhang B, Min M, Biam H, Chen L, Liu Q, Bao J (2009) **“Induction of apoptosis by *Polygonatum odoratum* lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells”** Biochimica et Biophysica Acta pp:840-844
- Bo L, Cheng Y, Zhang B, Biam H, Bao J (2009) **“*Polygonatum cyrtoneuma* lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated Ros-P38-P53 pathway”** Cancer Letters 275 pp:54-60
- Bo L, Biam H, Bao J (2010) **“Plant Lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic”** Cancer Letters 287 pp:1-12
- Castañeda A, López J, Yllesca L, Mendiola E, Blanco A y García T (2006), **“Efecto antiproliferativo in vitro de una lectina de frijol tépari sobre diferentes tipos de cáncer humano”**. Unidad Bioquímica y biotecnológica de plantas. CIVESTAV-Irapuato.
- Castillo A y Abdullaev F (2005) **“Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer”** Revista de Investigación Clínica, Vol. 57, Núm. 1, pp 55-64
- Carreño N (2013) **“Evaluación preliminar de actividad insecticida de lectina ASA II a partir de ajo (*Allium savitum*), sobre *Tecia solanivora*”** Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Colombia
- De HoV P, Brill L and Hirsch A (2009) **“Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense”** Mol Genet Genomics Vol. 282 pp 1-15
- Elias S, Contreras A. y Llanque C, (2008), **“Cáncer o Carcinoma de Mama”**, Rev. Paceaña Med. Fam, vol.5 pp 14-23
- Ferriz R, Torres I, Blanco A and García T (2010) **“The role of plant lectins in cancer treatment”** Nova Science Publisher, Inc, Chapter IV
- Flores L (2012), **“Evaluación de la citotoxicidad de lectinas de *Ruta graveolens* en células de Cáncer de mama”** Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México
- Fry SA, Afroug B, Loma-Browne HJ, Timms JF, Velentzis LS, Leathem AJC (2011), **“Lectin microarray profiling of metastatic breast cancers”**. Glycobiology, vol. 21: 1060-1070.
- Fu L, Zhou C, Yao S, Yu J, Liu B, Bao J, (2011), **“Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents”**. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, vol. 43:1442-1449.
- Gabius H, André S, Jiménez J, Romero A and Solís D (2011) **“From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code”** Trends in Biochemical Sciences Vol. 36 No.6
- Gallego M (2014), **“Lectinas inactivadoras de ribosomas: aplicaciones y usos más importantes”** Facultad de Valladolid, Facultad de Medicina. España
- Gallegos IB, Coutiño R, Martínez G y Hernández P, (2008) **“Marcadores glicosilados en cáncer de mama”** Revista de Bioquímica Glicosilación en cáncer 27(2): 52-59
- Gonzales J, Benavides V, Rojas R y Pino J (2007) **“Efecto embriotóxico y teratogénico de *Ruta chalepensis* L. <ruda>, en ratón (*Mus musculus*)”** Rev. Peru. Biol. 13 (3): 223-225
- He X, Ji N, Xiang X, Luo P and Bao J (2011) **“Purification, Characterization, and Molecular Cloning of a Novel Antifungal Lectin From the Roots of *Ophioglossum pedunculatum*”** Appl Biochem Biotechnol Vol. 165 pp1458-1472

- Hernández P, Martín O, Rodríguez Y, Ganem F, (1999), “**Aplicaciones de las Lectinas**”. Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter, vol. 15:91-96.
- Hernández P, Pérez E, Martínez L, Ortiz B, Martínez G, (2005), “**Las Lectinas Vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato**”. Revista de Bioquímica Interacciones proteína-carbohidrato, vol. 24:21-27.
- Hernández J (2011), “**Lectinas en Hojas de ruda (*Ruta graveolens* L.). Purificación y Caracterización**” Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México
- IMSS, (2012) “**Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de mama en Segundo y Tercer nivel de Atención**” Secretaría de Salud, México
- INEGI (2009), “**Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer**”, México
- INEGI, (2013) “**Estadísticas a propósito del Día mundial contra el cáncer 2013**”, México
- Ingale A and Hivrale A (2013) “**Plant as a plenteous reserve of lectin**” Plant Signaling and Behavior 8:12
- Instituto Salud Publica de Chile, (2005) “**Ruta graveolens**” [http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fce.77s/doc/monografias/Ruta\\_graveolens.pdf](http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fce.77s/doc/monografias/Ruta_graveolens.pdf)
- Jiang Q, Zhang S, Tian M, Zhang S, Xie T, Chen D, Liu J, Ouyang L, Jiang X (2015) “**Plant lectins from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy**” Cell Proliferation 48 pp:17-28
- Kabir S, Zubair M, Nurujjaman M, Haque A, Hasan I, Islam F, Hossain T, Hossain A, Rakib A, Alam M, Shaha R, Hossain T, Kimura Y and Absar N (2011) “**Purification and characterization of a Ca<sup>2+</sup>-dependent novel lectin from *Nymphaea nouchali* tuber with antiproliferative activities**” Biosci. Rep Vol. 31 pp 465-475
- Kenmochi E, Kabir S, Ogawa T, Naude R, Tateno H, Hirabayashi J and Muramoto K (2015) “**Isolation and Biochemical Characterization of Apios Tuber Lectin**” Molecules Vol. 20 pp 987-1002
- Knaul F, Nigenda G, Lozano R, Arreola H, Langer A, (2009) “**Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante**” Salud Publica de México, vol. 51, suplemento 2, 2009
- Komatsu S, Yamada E and Furukawa E (2009) “**Cold stress changes the concanavalin A-positive glycosylation pattern of proteins expressed in the basal parts of rice leaf sheaths**” Amino Acids Vol. 36 pp 115-123
- Kong Y.C., Lau CP, Wat KH, Ng KH, But PP, Cheng KF, Waterman PG, (1989). “**Antifertility principle of *Ruta graveolens***”. Planta Med. 55:176-8.
- Lannoo N, Van Damme E, Albenne C, Jamet E (2014) “**Plant Glycobiology – a diverse world of lectins, glycoproteins, glycolipids and glycans**” Frontiers in Plant Science vol.5 Art 604
- Liang O, Chen Y, Wang X, Lu R, Zhang S, Tian M, Xie T, Liu B, He G (2014) “**Polygonatum odoratum lectin induces apoptosis and autophagy via targeting EGFR-mediated Ras-Raf-Mek-ERK pathway in human MCF-7 breast cancer cells**” Phytomedicine 21 pp:1658-1665
- Liu X, Tian X and Liang J (2010) “**Disclosure of the Tuberous Lectin Composed of Homogeneous Tetramers in *Pinellia pedatisecda* Schott**” Appl Biochem Biotechnol Vol.162 pp 1214-1223

- Lloret MT, Camps J, Sentis M, Ricart V, Martínez C, Torregrosa A, Bernet J, Cuevas M, Ballester B, González P, Castería A (2004) **“Utilidad de la resonancia magnética en la evaluación local del cáncer de mama: impacto en el cambio de actitud terapéutica en una serie prospectiva de 338 pacientes”** Revista de Senología y Patología Mamaria. 20:53—66
- López I, (2013) **“Importancia y uso de lectinas de *Pleurotus sp.*”** Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, México
- Machín R, Rodríguez Y y Vega M, (2006) **“La ruta mTOR como diana terapéutica”** BioCáncer 3 <http://www.biocancer.com/journal/194/la-ruta-mtor-como-diana-terapeutica>
- Maza M y Vecchi E, (2009) **“El cáncer de mama en México: evolución, panorama actual y retos de la sociedad civil”** Salud Publica México; vol. 51, suplemento 2 329-334
- Moreno (2009), **“Variabilidad del gen CYP19 y su asociación con el cáncer de mama”** Instituto Politécnico Nacional, México
- Muñoz K, Londoño J, Arango G, Sierra J y Bravo K, (2007) **“Efecto de la técnica de extracción de ruta graveolens sobre la actividad antitirosinasa y correlación entre la inhibición enzimática, el contenido de compuestos fenólicos y la citotoxicidad”** Revista de la Facultad de Química Farmacéutica ISSN 0121-4004 Volumen 14 número 2 pp:78-83
- National Cancer Institute, (2012) **“Breast Cancer”** <http://www.cancer.gov/types/breast>
- Nagasuma C, Kumar N, Jeyakani J, Singh DD, Gowda SB, Prathima MN (2006) **“Lectindb: a plant lectins database”** *Glycobiology* 16 (10): 938-946.
- Necib Y, Bahi A, Merouane F, Bouadi H y Boulahrouf K, (2014), **“Comparative Study of a New Lectin Extracted from roots of plants: *Cyperus rotundus*, *Pistacia lentiscus* and *Ruta graveolens*”** World Journal of Pharmaceutical Research Vol. 4 Issue 1, 1720-1733
- Nelson D and Cox M (2008) **“Lenhinger Principles of Biochemistry”** W.H. Freeman and Company, Fifth Edition pag. 88
- Pathak S, Multani A y Banerji P, (2003) **“Ruta 6 selectively induces cell death in brain cancer cells but proliferation in normal peripheral blood lymphocytes: A novel treatment for human brain cancer”** Int J Oncol. 23(4):975-82
- Pereira P, Winter H, Verícimo M, Meagher J, Stuckey J, Goldstein I, Paschoalin V and Silva J (2015) **“Structural analysis and binding properties of isoforms of tarin, the GNA-related lectin from *Colocasia esculenta*”** Biochimica et Biophysica Acta 1854 pp. 20-30
- Ponce de León P, Foresto P y Valverde J, (2007) **“Ascaris lumbricoides: epitopes del Sistema P por método de cinética de la hemaglutinación”** Acta Bioquím Clín Latinoam; 41 (1): 77-81
- Rafiq S, Qadir S, Wani I, Ganie S, Masood A and Hamid R (2014) **“Purification and partial characterization of a Fructose-binding lectin from the leaves of *Euphorbia helioscopia*”** Pak. J. Pharma. Sci. Vol. 27 No. 6 pp. 1805-1810
- Rambaruth NDS, Dwek MV, (2011), **“Cell surface glycan-lectin interactions in tumor metastasis”**. Acta Histochemica vol. 113:591-600.
- Rameshwaram N and Nadimpalli (2008) **“An efficient method for the purification and quantification of a galactose-specific lectin from**

**vegetative tissues of *Dolichos lablab***” Journal of Chromatography B Vol. 861 pp 209-217

- Raghav S, Gupta B, Agrawal C, Goswami K and Das H (2006) “**Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells**” Journal of Ethnopharmacology 104: 234-239
- Reyes B, Gallegos R (2011) “**Lectinas Vegetales: Una alternativa terapéutica para el cancer**” Desarrollo Científico Enfer Vol. 19 N° 5
- Rincón M, (2014) “**Lectinas de leguminosas: significación nutricional, toxicidad y aplicaciones**” Universidad de Valladolid, España
- Ríos J (2015) “**Apoptotic activities of Mediterranean plant species**” The Mediterranean diete d Preedy (Países Bajos: Elsevier) 65-72
- Robles J, Ruvalcaba E, Maffuz A y Rodríguez S, (2011) “**Cáncer de mama en mujeres mexicanas menores de 40 años**” Ginecol Obstet Mex ;79(8):482-488
- Roche (2011), “**Hablemos de cáncer de mama con Roche**” ACV ediciones
- Rodríguez M, 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**” 247 ANALES AFA Vol. 16 pp:246-248
- Ruan Y (2014) “**Sucrose metabolism Gateway to diverse carbón use and sugar signaling**” Annu. Rev. Plant. Biol. 65, 26.1-26.35
- Rudiger H and Rouge P (1998) “**Structure and function of plant lectin**” Carbohyd. Eur. 23 16-22
- Saeland E, Belo AI, Mongera S, van Die I, Meijer GA, van Kooyk Y, (2011), “**Differential glycosylation of MUC1 and CEACAM5 between normal mucosa and tumor tissue of colon cancer patients**”. International Journal of Cancer131 (1): 117-128
- Sánchez R, Scheneider E, Martínez G y Fonfach C (2008), “**Cáncer de mama Modalidades terapéuticas y marcadores tumorales**” Cuad. Cir. Vol. 22 pág. 55-63
- Santoyo V, Mendiola E, Blanco A y García T (2003), “**Afinidad de Fracciones Concentradas de Lectinas de Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) por eritrocitos humanos**”, CINVESTAV-Irapuato
- Secretaria de salud (2002), “**Compendio de Patología Mamaria** “Primera Edición México D.F.
- Silva M, de Paula C, Ferreira J, Paredes E, Vaz A, Sampaio M, Correia M, Oliva M (2013) “***Bauhinia forticata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF-7 human breast cancer cells**” Biochimica et Biophysica Acta 1840 2262-2271
- Torres (2006), “**Purificación y caracterización parcial de una lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) con actividad citotóxica sobre células cancerígenas**”. Universidad Autónoma de Querétaro, México
- Torres M (2015) “**Efecto de las lectinas de tallo de *Ruta graveolens* L. en un modelo murino de cancer**” Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
- Toscano M, Ilarregui J, Bianco G, Rubinstein N y Rabinovich G, (2006), “**Interacción entre proteínas y glicanos en la regulación fisiológica de las células T**”, Medicina, vol. 66, pp. 357-362.

- Valadez M, Riverón L, Abdullaev F, Álvarez G, García A, (2007) **“Efecto antitumoral de lectinas de frijol sobre células cancerosas SW480”** Revista de Investigación Clínica, Vol. 72, Núm. 1, pp 27-33
- Valadez C, Morales J, Sumaya M, Delgado L, Cruz A, Bautista M, Sánchez M and Zúñiga C (2014) **“Cytotoxic and antiproliferative effect of Tepari Bean lectins on C33-A, MCF-7, SKNSH, and SW480 cells lines”** Molecules 19 pp: 960-972
- Valcarcel M (1998) **“Técnicas analíticas de separación”** Editorial Reverté. España pp 335-336
- Van den Ende W (2014) **“Sugars take a central position in plant growth, development and, stress responses. A focus on apical dominance”** Front. Plant Sci. S: 313
- Vanaclocha, B. & Cañigüeral, S., eds. (2003), **“Fitoterapia: vademecum de prescripción”** 4a ed.,. Masson, Barcelona.
- Vázquez A, Rivadeneyra E y Díaz R, (2012) **“Lectinas en frutas y plantas comestibles: nuevas posibilidades de interacción entre la ciencia de los alimentos y la biomedicina”** CienciaUat VOL. 23(1): 60-66. ISSN 2007-0624
- Vidal Millán, (2008) **“Cáncer de mama hereditario: identificación y elección de pacientes para estudio molecular de los genes BRCA”** Cancerología 3: 51-61, México
- Villanueva J, Quiroz L, Castañón S (2015) **“Purification and partial characterization of a ribosome inactivating protein from the latex of *Euphorbia trigona* Miller with citotoxic activity toward Human cancer cell lines”** Phytomedicine 22 pp: 689-695
- Yan Q, Jiang Z, Sun Y, Zhu L, Ding Z (2009) **“Antiproliferation and apoptosis of human tumor cell lines by a lectin (AMML) of *Astragalus monholicus*”** Phytomedicine Vol. 16 pp 586-593
- Zhang C, Fei Fang E, Zhang H, Liu L, Yun J (2015) **“Momordica charactia lectin exhibits antitumor activity towards hepatocellular carcinoma”** Invest New Drugs 33: 1-11
- Zhao Y, Maysood A, Randy A, Cheing C and Bun T (2014) **“Isolation and Characterization of a lectin from Japanese mottled beans”** Protein & Peptide Letters Vol. 21 pp: 696-704

## 12. Anexos

### 12.1. Extracción y Enriquecimiento de Lectinas Vegetales de *Ruta graveolens* por Cloruro de Sodio al 5 %, Tris-HCl 50 mM y PBS

Las lectinas vegetales son proteínas de origen no inmune que presentan la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos, las cuales presentan al menos dos sitios de unión, que permiten su enlace en primer lugar a un azúcar específico y en forma secundaria a una molécula glicosilada, sin presentar actividad enzimática y no son producto de una respuesta inmune. Estas proteínas están presentes en todos los organismos vivos; en plantas se han detectado principalmente en los cotiledones y endospermo, constituyendo del 2 al 10 % del total de las proteínas; además de estar presentes en órganos de reserva mostrando su papel como proteínas de defensa. Estas pueden tener diversas funciones: participan en las interacciones entre las bacterias fijadoras de nitrógeno con la raíz, presentan actividad mitogénica, efecto protector contra la acción patogénica de microorganismos, entre otras.

Siguiendo el método de Villarrubia *et al.* (1995) la extracción de lectinas vegetales por cloruro de sodio se llevó a cabo con la modificación de la concentración del 10% a una concentración del 5%. Esta técnica promueve la solubilización de proteínas por el aumento de la fuerza iónica del medio, disminuyendo la interacción proteína-H<sub>2</sub>O al quitar la capa de solvatación; promoviendo la precipitación de una mezcla proteica, lo que dependerá de la concentración salina utilizada.

Otra de las técnicas para la extracción de lectinas vegetales es por Tris/HCl que presenta el fundamento del *Salting out* que permite la disminución de las interacciones proteína-H<sub>2</sub>O que genera la precipitación de una mezcla proteica manteniendo en condiciones estables a las moléculas extraídas.

La extracción de lectinas vegetales por PBS promueve la solubilización de proteínas y otras moléculas de la célula vegetal, manteniendo las condiciones óptimas para su preservación.

Posteriormente para comenzar con la semipurificación de una mezcla proteica se realiza el proceso de diálisis, que consiste en la separación de moléculas en una solución por la diferencia en sus índices de difusión o presión osmótica a través de una membrana semipermeable, en donde la moléculas suficientemente pequeñas pueden pasar por los poros moviéndose hacia el exterior, mientras las moléculas más grandes que la dimensión del poro de la membrana son retenidas, permitiendo la selección de moléculas de interés por sus pesos moleculares.

Uno de los métodos más utilizados para la purificación de lectinas vegetales es la cromatografía de afinidad, que se basa en la separación de solutos de acuerdo a la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos, que se establece por el arrastre de una fase móvil a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria; permitiendo la separación de una mezcla proteica por su afinidad a un determinado ligando.

#### Reactivos:

Solución salina de NaCl al 5 %  
Buffer PBS  
Solución de AgNO<sub>3</sub> al 0.1 N  
Solución de D-Glucosa al 0.1 M  
Solución de Galactosa al 0.1 M  
Solución de Maltosa al 0.1 M  
Solución de Sacarosa al 0.1 M  
Solución de Fructuosa al 0.1 M

Buffer de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> al 0.1 M pH8  
Solución de Tris/HCl 50 mM pH 8  
Silica G-60 para columna  
Solución de Arabinosa al 0.1 M  
Solución de Lactosa al 0.1 M  
Solución de Manitol al 0.1 M  
Solución de Sorbitol al 0.1 M

## **Materiales:**

Material Vegetal de <i>Ruta graveolens</i>	Papel Whatman #41
Gasas	Centrifuga
Membrana de Diálisis de 3 kDa	Buretas
Tubos para centrifuga de 50 ml	Vasos de precipitados de 2 L
Parrilla de agitación	Agitadores magnéticos

## **Procedimiento**

- 1- Se tomaron 100 gr de hoja, tallo y raíz de ruda, que fueron lavados con agua de grifo.
- 2- Posteriormente fueron macerados con 300 ml de la solución de cloruro de sodio en una proporción 3:1, 500 ml del buffer de PBS en una proporción 5:1 y 400 ml de la solución de Tris-HCl en una proporción 4:1, en hielo.
- 3- Una vez terminada la maceración los extractos obtenidos fueron conservados a 4°C, dejando reposar durante toda la noche.
- 4- Se eliminaron los residuos vegetales presentes en los extractos por medio de la filtración con gasas y papel Whatman #41.
- 5- Se procedió a la centrifugación de los extractos a 3000 rpm durante 20 minutos, recuperando el sobrenadante y fue conservado a 4°C.
- 6- Para continuar con la semipurificación, los extractos fueron dializados en una membrana de 3 kDa en buffer de bicarbonato de amonio. Para comprobar la eliminación de sales se tomaron alícuotas del buffer y adicionando gotas de la solución de nitrato de plata. El proceso de diálisis continuó hasta la comprobación de la eliminación total de sales y se realizaron cambios del buffer de bicarbonato de amonio cada 6 hrs.
- 7- Después se procedió a llevar a cabo la cromatografía de afinidad, preparando buretas de 25 ml con silica gel G-60.
- 8- Posteriormente los extractos fueron pasados por la columna, donde las lectinas retenidas fueron desplazadas por 50 ml de las soluciones de glucosa, arabinosa, galactosa, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa, sorbitol y fructuosa; que fueron puestas secuencialmente y recolectando el mismo volumen introducido. Las fracciones obtenidas fueron conservadas a 4°C.

### **12.2. Cuantificación de Proteínas por el Método de Biuret y el Método UV**

Para la cuantificación de proteínas en una mezcla biológica existen diferentes métodos que se basan en a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber la luz en el UV, b) para la formación de derivados químicos o c) la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes.

En el caso de la determinación de la concentración de proteínas por el método de Biuret, se basa en la formación de un complejo coloreado entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. Donde una molécula de  $\text{Cu}^{2+}$  se acompleja con 4 NH. La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos).

En la determinación por UV, es importante mencionar que todas las proteínas pueden ser detectadas, sin embargo solo ciertos residuos de aminoácidos son los que permiten la determinación en la región del UV. Donde las bandas de absorción más significativas en el ultravioleta cercano son en el intervalo de longitud de onda entre 230 y 300 nm.

Concretamente se absorben las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos a 260-290 nm como la histidina, cisteína y fenilalanina. La tirosina presenta un máximo de absorción a 275 nm; mientras el triptófano tiene una absorción a 280 nm. También se va a presentar la cuantificación por la absorción del enlace peptídico.

Método	Rango de sensibilidad (µg)	Coefficiente de extinción o Cálculo de la concentración
<b>Métodos de Absorción</b>		
$A_{280}$	100-3000	$\epsilon_{280} = 1 \text{ mL/mg cm}$
$A_{205}$	3-100	$\epsilon_{205} = 31 \text{ mL/mg cm}$
$A_{280} - A_{260}$	100-3000	Proteína (mg/mL) = $(1.55A_{280} - 0.76A_{260})$
$A_{235} - A_{280}$	25-700	Proteína (mg/mL) = $(A_{235} - A_{280})/2.51$
$A_{224} - A_{236}$	5-180	Proteína (mg/mL) = $(A_{224} - A_{236})/0.6$
$A_{215} - A_{225}$	2-45	Proteína (µg/mL) = $144(A_{215} - A_{225})$

**Reactivos:**

Reactivo de Biuret:

- 1.5 gr de sulfato cúprico pentahidratado
- 6 gr de tartrato de sodio y potasio
- 500 ml de agua destilada
- 300 ml de hidróxido de sodio 2.5 M
- 1 gr de ioduro de potasio
- Añadir agua destilada hasta aforar 1L

Albumina Sérica Bovina 10 mg/ml

Ácido Tricloroacético 10%

Cloruro de Sodio 0.9%

SDS (10%)/NaOH (0.8 N)

**Material:**

Espectrofotómetro

Pipetas

Centrifuga

Celdas de espectrofotómetro

Micropipetas

Puntas para micropipeta

Tubos de vidrio

Gradilla

Espectrofotómetro UV

Celdas para espectrofotómetro UV

Tubos para centrifuga de 15 ml

**Procedimiento:**

Método de Biuret

- 1- Preparar la curva patrón poniendo tubos de vidrio con:

[ ] BSA mg/ml	µl stock BSA	µl H <sub>2</sub> O Destilada
0	0	1000
1	100	900
2	200	800
4	400	600
6	600	400
8	800	200
10	1000	0



- 2- Posteriormente añadir 4 ml del reactivo de Biuret, mezclando y dejando incubar por 20 min.
- 3- Calibrar el espectrofotómetro con el blanco en una longitud de onda de 545 nm.
- 4- Leer las muestras anteriores de BSA generando la curva patrón.
- 5- Para preparar las muestras tomar 200 y 800 µl de muestra, respectivamente, y completar el volumen a 1 ml. Agregar 4 ml del reactivo de Biuret, dejar incubar por 20 min y leer a 545 nm.
- 6- Para determinar la concentración de proteína presente en las muestras utilizar la siguiente fórmula:

$$[ ] = \frac{\text{Absorbancia}}{m}$$

Donde m es la pendiente de la gráfica de la curva patrón.

#### Método UV

- 1- Las muestras a evaluar fueron previamente precipitadas por el método de TCA (10%)-SDS (10%)-NaOH (0.8N).
- 2- Una vez obtenidos los precipitados proteicos se diluyeron en 1 ml de la solución de SDS-NaOH. Y utilizando como blanco la solución de SDS-NaOH.
- 3- Midiendo las absorbancias a 280-260 nm
- 4- Para determinar la concentración de proteínas para un mg/ml de disolución se utilizó la siguiente fórmula:

$$A_{280} - A_{260} = (1.55 * A_{280} - 0.76 * A_{260})$$

### 12.3. Cuantificación de Azúcares totales en Lectinas Vegetales de *Ruta graveolens* por el método de Dubois (Fenol- Ác. Sulfúrico)

Las lectinas vegetales presentan una estructura conformada por una cadena polipeptídica, que puede o no presentar residuos de carbohidratos, de 2-15 monosacáridos residuales constituidos por 2 o más azúcares. Por lo tanto es necesario identificar el tipo de azúcares presentes dentro de la estructura de la proteína tipo lectina.

El método de Dubois es utilizado para la cuantificación de azúcares totales presentes en una muestra. Donde los azúcares presentes reaccionan con el fenol utilizando el ácido sulfúrico para formar hidroximetil-furfural, el cual es un compuesto coloreado que permite su lectura a una absorbancia determinada.

#### Reactivos:

Fenol 5%  
 Ácido Sulfúrico concentrado  
 Stock de Glucosa 1mg/ml

#### Material:

Micropipetas	Puntas para micropipetas
Tubos de vidrio	Espectrofotómetro
Celda de vidrio para espectrofotómetro	pipetas

**Procedimiento:**

- 1- Preparar la curva patrón poniendo tubos de vidrio con:

[ ] Glucosa mg/ml	µl stock Glu	µl H <sub>2</sub> O Destilada
0	0	1000
0.1	100	900
0.2	200	800
0.3	300	700
0.4	400	600
0.5	500	500
0.6	600	400
0.7	700	300
0.8	800	200
0.9	900	100
1	1000	0

- 2- Posteriormente añadir 100 µl de fenol al 5 % dejando reposar por 15 min.  
 3- Se añaden 3 ml de ácido sulfúrico concentrado, agitar y dejar incubar por 30 min.  
 4- Calibrar el espectrofotómetro con el blanco en una longitud de onda de 540 nm.  
 5- Leer las muestras anteriores de glucosa generando la curva patrón.  
 6- Para preparar las muestras tomar 100 µl de muestra y completar el volumen a 1 ml. Agregar 100 µl de fenol, dejar incubar por 15 min.  
 7- Añadir 3 ml de ácido sulfúrico, agitar y dejar reposar por 30 min y leer a 540 nm.  
 8- Para determinar la concentración de proteína presente en las muestras utilizar la siguiente fórmula:

$$[ ] = \frac{\text{Absorbancia}}{m}$$

Donde m es la pendiente de la gráfica de la curva patrón.

#### 12.4. Cuantificación de Azúcares reductores en Lectinas Vegetales de *Ruta graveolens* por el método de Miller

El método de Miller se fundamenta en que los azúcares reductores van a reducir al ácido 3-5 dinitrosalicílico en presencia de calor, produciendo un cambio de coloración, permitiendo la determinación de la concentración por la lectura de las densidades ópticas.

**Reactivos**

Reactivo DNS

- 0.8 gr de NaOH
- 15 gr de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado
- 0.5 gr de ácido 3-5 dinitrosalicílico
- Aforar a 50 ml con agua destilada

Stock de Glucosa 1 mg/ml

**Material:**

Micropipetas

Tubos de vidrio

Celda de vidrio para espectrofotómetro

Puntas para micropipetas

Espectrofotómetro

pipetas

**Procedimiento:**

- 1- Preparar la curva patrón poniendo tubos de vidrio con:

[ ] Glucosa mg/ml	µl stock Glucosa	µl H <sub>2</sub> O Destilada
0	0	1000
0.1	100	900
0.2	200	800
0.3	300	700
0.4	400	600
0.5	500	500
0.6	600	400
0.7	700	300
0.8	800	200
0.9	900	100
1	1000	0

- 1- Posteriormente añadir 500 µl del reactivo DNS.
- 2- Colocar los tubos en baño maría en ebullición por 5 min e inmediatamente detener la reacción en baño de agua y hielo.
- 3- Posteriormente agregar 5 ml de agua destilada, agitar y dejar en reposo por 15 min.
- 4- Calibrar el espectrofotómetro con el blanco en una longitud de onda de 540 nm.
- 5- Leer las muestras anteriores de glucosa generando la curva patrón.
- 6- Para preparar las muestras tomar 500 µl de muestra y completar el volumen a 1 ml. Agregar 500 µl del reactivo DNS, colocar en baño maría en ebullición por 5 min, detener la reacción en baño de agua y hielo.
- 7- Añadir 5 ml de agua destilada, agitar y dejar reposar por 15 min y leer a 540 nm.
- 8- Para determinar la concentración de proteína presente en las muestras utilizar la siguiente fórmula:

$$[ ] = \frac{\text{Absorbancia}}{m}$$

Donde m es la pendiente de la gráfica de la curva patrón.

### 12.5. Determinación del Efecto Aglutinante y Cinética de Hemaglutinación de Lectinas Vegetales de *Ruta graveolens* en el sistema ABO

La aglutinación de eritrocitos consiste en la agregación sistemática de células medida por macromoléculas específicas que reconocen estructuras moleculares determinadas (antígenos) sobre la superficie celular, el cual depende del número de determinantes antigénicos y de su localización sobre la célula, así como del tipo de macromolécula y el medio de reacción. Además de la distribución de los ligandos en la superficie de la membrana es diferente para cada aglutinina, lo cual depende de la afinidad y del sitio de unión específico.

La actividad aglutinante de la lectina será evaluada segundo lo descrito por Acosta *et al* en eritrocitos intactos de los grupos sanguíneos del sistema ABO con factor Rh+.

#### Reactivos:

Buffer PBS pH 7.4

#### Materiales:

Centrifuga

Placas de 96 pozos

Micropipetas

Puntas para micropipetas

Tubos para centrifuga de 15 ml

Probeta

Vacutainers con EDTA

Agujas para vacutainer

#### Procedimiento

- 1- La sangre será recolectada y mantenida en un tubo vacutainer con EDTA al 0.9 M a 4°C hasta su uso.

- 2- Centrifugar a 3000 rpm durante 10-15 min. Eliminando el sobrenadante y los leucocitos, aspirando cuidadosamente la capa superior.
- 3- Los eritrocitos se resuspenden en aproximadamente 10 volúmenes de buffer de fosfato salino (PBS) y se centrifugan en las condiciones anteriormente descritas.
- 4- Se elimina el sobrenadante y el lavado se repite dos veces más, finalmente el volumen de eritrocitos sedimentados se resuspenden en PBS hasta obtener una dilución al 3%.
- 5- Se preparan pozos con 50 µl de una solución con lectinas vegetales de la ruda a una concentración inicial de 100 µg y realizando diluciones serias hasta obtener la mínima concentración requerida para que se presente el efecto de aglutinación.
- 6- Posteriormente se colocan 50 µl de la solución de eritrocitos.
- 7- Dejando incubar a temperatura ambiente por 1, 2, 3, 4, 5 y 24 hrs y realizando la lectura al microscopio y por el escaneo de las placas.
- 8- Utilizando las siguientes fórmulas para determinar la capacidad hemaglutinante:

$$AE \left( \frac{U}{mg} \right) = \frac{2^n}{mg}$$

$$UHA = 2^n$$

Donde:

AE= Actividad Especifica Aglutinante

UHA= Unidad de Hemaglutinación

n= ultima dilución con aglutinación

mg= cantidad de proteína en mg

### **12.6. Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación de lectinas de *R. graveolens* en Células MCF-7 por Carbohidratos**

La inhibición de la aglutinación de eritrocitos es un método sensible y específico para la identificación de pequeñas cantidades de antígeno soluble. El principio de este análisis es que se inhibe la aglutinación por la adición de un azúcar sencillo o complejo que es reconocido por el dominio de unión a carbohidratos presente en la lectina, de esta manera puede ser determinada la especificidad de la lectina para los carbohidratos.

#### **Reactivos:**

PBS pH 7.4  
 Glucosa 0.1 M  
 Arabinosa 0.1 M  
 Galactosa 0.1 M  
 Sorbitol 0.1 M

Lactosa 0.1 M  
 Maltosa 0.1 M  
 Manitol 0.1 M  
 Sacarosa 0.1 M  
 Fructuosa 0.1 M

#### **Materiales:**

Centrifuga  
 Placas de 96 pozos  
 Micropipetas  
 Vacutainers con EDTA

Puntas para micropipetas  
 Tubos para centrifuga de 15 ml  
 Probeta  
 Agujas para vacutainer

#### **Procedimiento**

- 1- La sangre será recolectada y mantenida en una vacutainer con EDTA al 0.9 M a 4°C hasta su uso.

- 2- Centrifugar a 3000 rpm durante 10-15 min. Eliminando el sobrenadante y los leucocitos, aspirando cuidadosamente la capa superior.
- 3- Los eritrocitos se resuspenden en aproximadamente 10 volúmenes de buffer de fosfato salino (PBS) y se centrifugan en las condiciones anteriormente descritas.
- 4- Se elimina el sobrenadante y el lavado se repite por dos veces más, finalmente el volumen de eritrocitos sedimentados se resuspenden en PBS hasta obtener una dilución al 3%.
- 5- Se preparan pozos con 50 µl de una solución con lectinas vegetales de la ruda a concentraciones de 100 75 y 50 µg.
- 6- Añadiendo 50 µl de la solución de azúcares 0.1, así mismo se realizó la dilución seria de la solución de azúcares hasta obtener la mínima concentración requerida para que se inhiba la aglutinación.
- 7- Posteriormente se colocan 50 µl de la solución de eritrocitos.
- 8- Dejando incubar a temperatura ambiente por 1, 2, 3 y 4 hrs y realizando la lectura al microscopio y por el escaneo de las placas.

### **12.7. Electroforesis SDS-PAGE y Tinción de Plata para extractos proteicos de *Ruta graveolens***

La electroforesis SDS-PAGE permite la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico, separándose en función de su carga eléctrica. En el caso de la electroforesis SDS-PAGE se emplean geles de poliacrilamida en presencia del dodecilsulfatosódico que genera la desnaturalización de las proteínas y el rompimiento de las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria dando como resultado que la separación de las proteínas en función de la masa molecular, debido a que los grupos alifáticos docecil se colocan en el interior y los grupos sulfato en la superficie de la proteína, formando complejos SDS-proteína que toman carga neta negativa.

La tinción de plata es un procedimiento extremadamente sensible para detectar pequeñas cantidades de proteínas en gel, donde la unión de los iones de plata a las cadenas laterales de los aminoácidos en condiciones básicas se reducen a plata metálica, lo que permite visualizar las proteínas fijadas en el gel como bandas o manchas color marrón.

#### **Reactivos:**

Solución de Tris/HCl 1.5 M pH 8.8	Solución de Tris/HCl 1M pH 6.8
SDS 10% (p/v)	Glicerol 50% (v/v)
Azul de Bromofenol 1% (m/v)	Acrilamida 30%
Persulfato de Amonio 10% (m/v)	Tampón de corrida pH 8.3
Tampón de muestras 5x	Ácido Tricloroacético 20%
Metanol-Ácido Acético 40%-10%	Glutaraldehído 10%
Tinción de plata	Solución de Revelado 500 ml
- 21 ml de NaOH 0.36%	- 2.5 ml ácido cítrico 1%
- 1.4 ml Hidróxido de Amonio 35%	- 260 µl Formaldehido
- 4 ml Nitrato de Plata 20%	
- 73.6 ml agua destilada	

#### **Material:**

Cámara de electroforesis	Vidrios para electroforesis
Centrifuga	Micropipetas
Puntas para micropipetas	Tubos eppendorf
Fuente de poder	Vidrios para electroforesis
Cámara de electroforesis	Centrifuga

### Procedimiento:

- 1- Preparación Gel separador 12%
  - 7ml H<sub>2</sub>O destilada
  - 8ml Acrilamida 30%
  - 5ml Tris/HCl 1.5 M pH 8.8
  - 200µl SDS 10%
  - 20ml + 20 µl TEMED+ 200 µl PSA 10%
- 2- Preparación Gel Concentrador
  - 6.2ml H<sub>2</sub>O destilada
  - 1.33ml Acrilamida 30%
  - 2.5ml Tris/HCl 1.5 M pH 8.8
  - 100µl SDS 10%
  - 10ml + 10 µl TEMED+100 µl PSA 10%
- 3- Las muestras de las fracciones obtenidas de los extractos de *R. graveolens* se prepararán con 40 µl de muestra+ 10 µl de buffer de corrida a una concentración de 20 µg de proteína. Una vez preparadas las muestras se colocan en baño maría por 5 min y posteriormente se pasan a hielo por 2 min (para desnaturalizar las proteínas). Se centrifugan, vortexean y se centrifugan.
- 4- Una vez colocado el gel separador llenar con agua destilada hasta el tope del vidrio, antes de la polimerización. Terminada la polimerización del gel separador se quita el agua y se coloca el gel concentrador y el peine, posteriormente a la polimerización quitar el peine cuidadosamente y los pozos se lavan con tampón de corrida, colocando las muestras.
- 5- El corrimiento es de 85 a 95 volts por 2 hrs o hasta que se dé la separación deseada.
- 6- Después de la electroforesis el gel se fija toda la noche en ácido tricloroacético al 20%, en agitación constante.
- 7- Posteriormente se elimina el TCA y se colocan en metanol-ácido acético 40%-10%, dando dos lavados de 30 min, en agitación constante.
- 8- Se lavan 2 veces con agua destilada por 20 min, en agitación constante.
- 9- Un lavado con glutaraldehído por 30 min, en agitación constante.
- 10- Eliminar totalmente el glutaraldehído y dar 4 lavados con agua destilada por 20 min, en agitación constante.
- 11- Dejar 30 min con la solución de tinción, en agitación constante.
- 12- Dar 3 lavados con agua destilada por 5 min, en agitación constante.
- 13- Colocar la solución de revelado hasta la aparición de las bandas y detener la reacción con la solución de paro (metanol-ác. Acético 40%-10%).

### 12.8. Prueba de Citotoxicidad en Células MCF-7 por lectinas de *R. graveolens* por Cristal Violeta

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas causada por drogas o compuestos químicos.

Se utilizarán células MCF-7 para determinar la LD50 de lectinas vegetales de *R. graveolens* por medio de la técnica de cristal violeta, la cual se basa en la tinción de la pared celular de las células que permanecen adheridas a la placa y que representa a las células vivas. Determinando la relación del porcentaje de células vivas por medio de:

$$\% \text{ células vivas} = \frac{D.O. \text{ de células tratadas}}{D.O. \text{ de células control}} \times 100$$

**Reactivos:**

Tripsina 0.25%  
 Verseno  
 Medio de Cultivo DMEM suplementado

Metanol Puro  
 Cristal Violeta 0.4% en ácido fórmico  
 Ácido Acético 10%

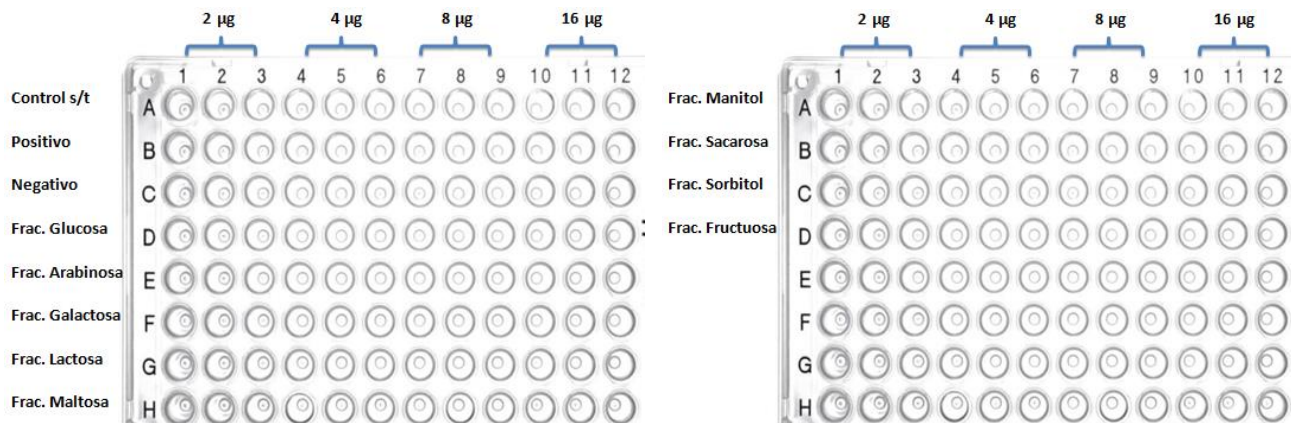
**Material:**

Placas de 96 pozos para cultivo  
 Pipetas  
 Micropipetas  
 Incubadora  
 Lector para ELISA

Centrifuga  
 Tubos para centrifuga  
 Microscopio  
 Cámara de Neubauer

**Procedimiento**

- 1- Despegar las células en cultivo de proliferación iniciando con la eliminación del medio con una pipeta en la orilla de la caja.
- 2- Enjuagar con verseno una o dos veces.
- 3- Agregar de 2-3 ml de Tripsina 0.25% dejando actuar por 3-5 minutos a 37°C.
- 4- Golpear y pipetear suavemente la caja para generar el desprendimiento de las células.
- 5- Para inactivar la tripsina colocar medio en una proporción 1:1, disgregando con la micropipeta sin sacar la punta.
- 6- Recolectar todo el medio en un tubo y centrifugar a 3000 RPM (3ml: 1-3min, 5ml: 3-5min, 10ml: 5-10min).
- 7- Eliminar el sobrenadante dejando aproximadamente 200 µl y agregar 6 ml de medio, resuspendiendo.
- 8- Realizar el conteo celular colocando 10 µl de la solución celular en la cámara de Neubauer y contar mínimo 4 cuadrantes y el cuadrante central. Determinando el número celular por:  $\text{suma}/\# \text{ pozos contados} = \text{resultado} \times 10000$ .
- 9- Posteriormente se pondrán 10 000 células por pozo, teniendo el siguiente esquema agregando la concentración de proteína indicada, dejando incubar por 48 hrs:



- 10- El resto de las células se ponen en 7 ml de medio para volver a sembrar.
- 11- Una vez pasado el tiempo de tratamiento se retira el medio de cultivo y las células se lavan dos a tres veces con solución fisiológica (fría).
- 12- Posteriormente las células se fijan con aproximadamente 200-250 µl de metanol puro (frío), cubriendo las células y dejando actuar por 5 minutos; dejando en la campana y sin tapar la placa.
- 13- Retirar el fijador y dejar secar completamente hasta observar el fondo blanco opaco.
- 14- Añadir 200 µl de cristal violeta y dejar actuar por 10 minutos en agitación constante.
- 15- Eliminar el colorante y enjuagar en el chorro de agua, dejar secar.
- 16- Adicionar 500 µl de ácido acético para leer en un lector de Elisa a 595 nm.

## 12.9. Cinética de la Citotoxicidad de lectinas de *R. graveolens* en Células MCF-7

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas causada por drogas o compuestos químicos. La cinética del efecto citotóxico de lectinas vegetales de *R. graveolens* se llevará a cabo por medio del tratamiento de células MCF-7 de cáncer de mama tratadas con las fracciones enriquecidas de lectinas que presentaron un efecto citotóxico.

La determinación se realizó por medio de la técnica de cristal violeta la cual se basa en la tinción de la pared celular de las células que permanecen adheridas a la placa y que representa a las células vivas. Determinando la relación del porcentaje de células vivas por medio de:

$$\% \text{ células vivas} = \frac{\text{D.O. de células tratadas}}{\text{D.O. de células control}} \times 100$$

### Reactivos:

Tripsina 0.25%

Verseno

Medio de Cultivo DMEM suplementado

Metanol Puro

Cristal Violeta 0.4% en ácido fórmico

Azul Tripano 0.4%

Ácido Acético 10%

Fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*

### Material

Placas de 96 pozos

Micropipetas

Pipetas

Centrifuga

Cámara de Neubauer

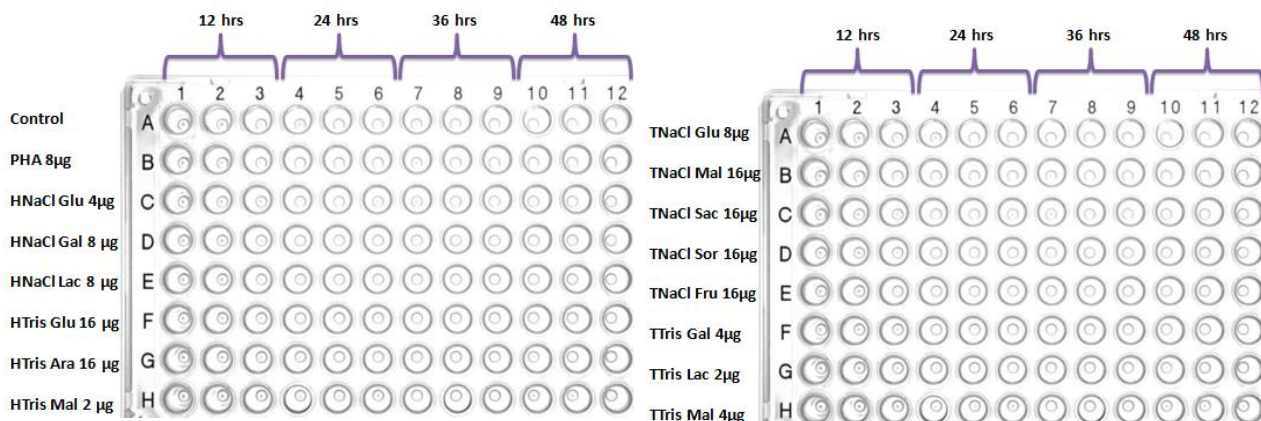
Microscopio Invertido

Incubadora

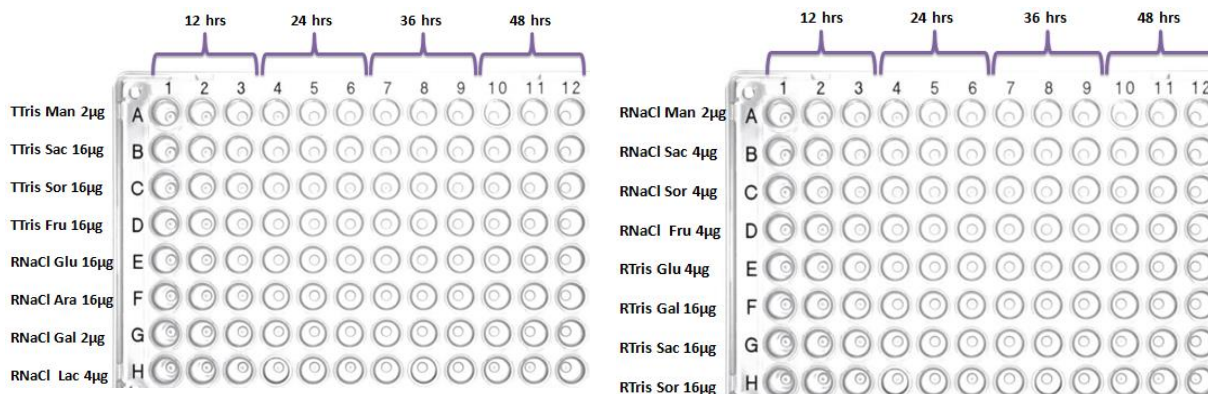
Lector de ELISA

### Procedimiento

- 1- Despegar las células en cultivo de proliferación iniciando con la eliminación del medio con una pipeta en la orilla de la caja.
- 2- Enjuagar con verseno una o dos veces.
- 3- Agregar de 2-3 ml de Tripsina 0.25% dejando actuar por 3-5 minutos a 37°C.
- 4- Golpear y pipetear suavemente la caja para generar el desprendimiento de las células.
- 5- Para inactivar la tripsina colocar medio en una proporción 1:1, disgregando con la micropipeta sin sacar la punta.
- 6- Recolectar todo el medio en un tubo y centrifugar a 3000 RPM (3ml: 1-3min, 5ml: 3-5min, 10ml: 5-10min).
- 7- Eliminar el sobrenadante dejando aproximadamente 200 µl y agregar 6 ml de medio, resuspendiendo.
- 8- Realizar el conteo celular colocando 10 µl de la solución celular en la cámara de Neubauer y contar mínimo 4 cuadrantes y el cuadrante central. Determinando el número celular por: suma/# pozos contados= resultadox10000.
- 9- Posteriormente se pondrán 10 000 células por pozo, teniendo el siguiente esquema agregando la concentración de proteína indicada, dejando incubar por 12, 24, 36







- 10- El resto de las células se ponen en 7 ml de medio para volver a sembrar.
- 11- Una vez pasado el tiempo de tratamiento se tomarán 90 µl del medio de cultivo a los cuales se les añadirá 10 µl de azul tripano dejando incubar por 3 min.
- 12- Se tomarán 10 µl de la preparación y se colocaron en la cámara de Neubauer y observar en el microscopio invertido.
- 13- Por otra parte se retira el resto del medio de cultivo de los pozos y las células se lavan dos a tres veces con solución fisiológica (fría).
- 14- Posteriormente las células se fijan con aproximadamente 200-250 µl de metanol puro (frío), cubriendo las células y dejando actuar por 5 minutos; dejando en la campana y sin tapar la placa.
- 15- Retirar el fijador y dejar secar completamente hasta observar el fondo blanco opaco.
- 16- Añadir 200 µl de cristal violeta y dejar actuar por 10 minutos en agitación constante.
- 17- Eliminar el colorante y enjuagar en el chorro de agua, dejar secar.
- 18- Adicionar 500 µl de ácido acético para leer en un lector de Elisa a 595 nm.

### 12.10. Inhibición de la Citotoxicidad de lectinas de *R. graveolens* en Células MCF-7

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas causadas por drogas o compuestos químicos. La inhibición del efecto citotóxico de lectinas vegetales de *R. graveolens* se llevará a cabo por medio del tratamiento de células MCF-7 de cáncer de mama tratadas con las fracciones enriquecidas de lectinas que presentaron un efecto citotóxico a la concentración que se determinó presentan un mayor efecto citotóxico; sin embargo dado que las lectinas vegetales presentan varios sitios de unión a carbohidratos, en presencia de este tipo de moléculas su actividad citotóxica será inhibida.

La determinación se realizó por medio de la técnica de cristal violeta la cual se basa en la tinción de la pared celular de las células que permanecen adheridas a la placa y que representa a las células vivas. Determinando la relación del porcentaje de células vivas por medio de:

$$\% \text{ células vivas} = \frac{D.O. \text{ de células tratadas}}{D.O. \text{ de células control}} \times 100$$

#### Reactivos:

Tripsina 0.25%	Glucosa 0.1 M
Verseno	Arabinosa 0.1 M
Medio de Cultivo DMEM suplementado	Galactosa 0.1 M
Metanol Puro	Lactosa 0.1 M
Cristal Violeta 0.4% en ácido fórmico	Maltosa 0.1 M
Ácido Acético 10%	Manitol 0.1 M
Fitohemaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>	Sacarosa 0.1 M
PBS pH 7.4	Sorbitol 0.1 M
Fructuosa 0.1 M	

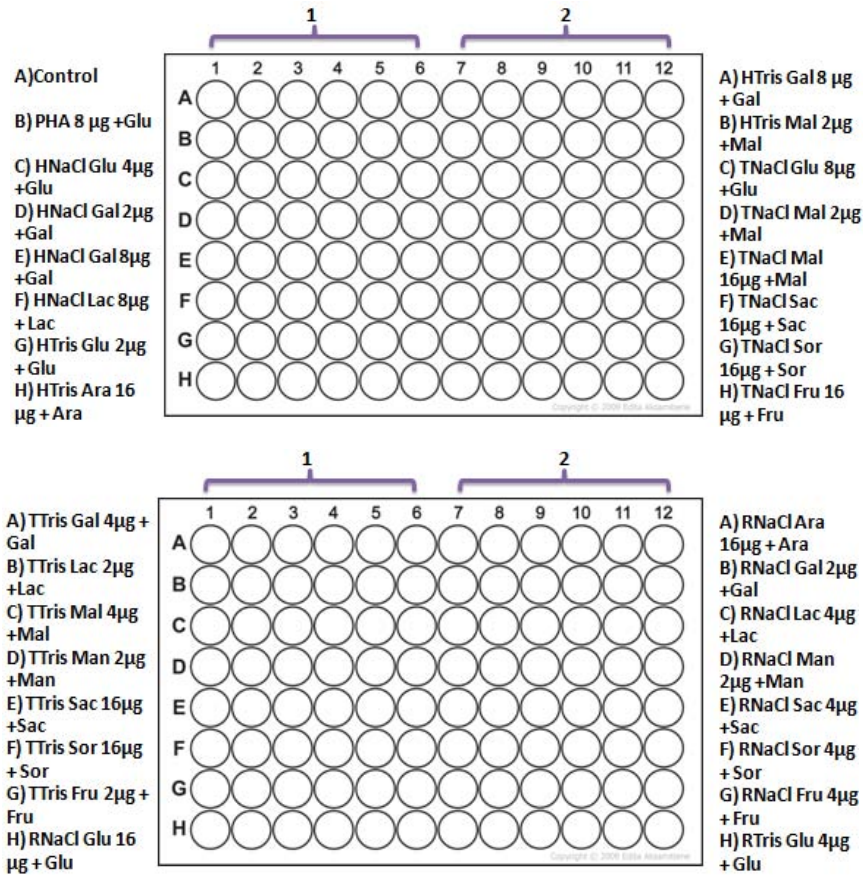
## Material

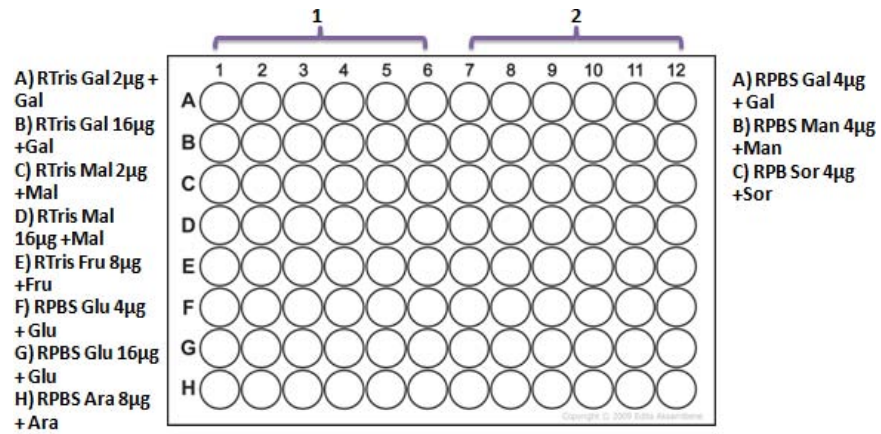
Placas de 96 pozos  
 Micropipetas  
 Pipetas  
 Centrifuga

Cámara de Neubauer  
 Microscopio Invertido  
 Incubadora  
 Lector de ELISA

## Procedimiento

- 1- Despegar las células en cultivo de proliferación iniciando con la eliminación del medio con una pipeta en la orilla de la caja.
- 2- Enjuagar con verseno una o dos veces.
- 3- Agregar de 2-3 ml de Tripsina 0.25% dejando actuar por 3-5 minutos a 37°C.
- 4- Golpear y pipetear suavemente la caja para generar el desprendimiento de las células.
- 5- Para inactivar la tripsina colocar medio en una proporción 1:1, disgregando con la micropipeta sin sacar la punta.
- 6- Recolectar todo el medio en un tubo y centrifugar a 3000 RPM (3ml: 1-3min, 5ml: 3-5min, 10ml: 5-10min).
- 7- Eliminar el sobrenadante dejando aproximadamente 200 µl y agregar 6 ml de medio, resuspendiendo.
- 8- Realizar el conteo celular colocando 10 µl de la solución celular en la cámara de Neubauer y contar mínimo 4 cuadrantes y el cuadrante central. Determinando el número celular por: suma/# pozos contados= resultadox10000.
- 9- Posteriormente se pondrán 10 000 células por pozo, teniendo el siguiente esquema agregando la concentración de proteína indicada+5µl carbohidrato utilizado para la elución en la cromatografía de afinidad, dejando incubar por 48hrs:





- 10- El resto de las células se ponen en 7 ml de medio para volver a sembrar.
- 11- Una vez pasado el tiempo de tratamiento se retira el medio de cultivo y las células se lavan dos a tres veces con solución fisiológica (fría).
- 12- Posteriormente las células se fijan con aproximadamente 200-250 µl de metanol puro (frío), cubriendo las células y dejando actuar por 5 minutos; dejando en la campana y sin tapar la placa.
- 13- Retirar el fijador y dejar secar completamente hasta observar el fondo blanco opaco.
- 14- Añadir 200 µl de cristal violeta y dejar actuar por 10 minutos en agitación constante.
- 15- Eliminar el colorante y enjuagar en el chorro de agua, dejar secar.
- 16- Adicionar 500 µl de ácido acético para leer en un lector de Elisa a 595 nm.