



**Universidad Nacional
Autónoma de México.**

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**“Efecto antioxidante de fracciones
enriquecidas con lectinas de *Ruta
graveolens* en un modelo murino de
cáncer.”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

MINGUER URIBE ALAN GERARDO

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

Ciudad de México

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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **MINGUER URIBE ALAN GERARDO**, con número de cuenta **309128816**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **29 de noviembre de 2016** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. ALFONSO MACARIO LUNA VÁSQUEZ

VOCAL M. en C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ

SECRETARIO Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

SUPLENTE Dra. JUANA MONROY MORENO

SUPLENTE Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

El título de la tesis que presenta es: **Efecto antioxidante de fracciones enriquecidas con lectinas de *Ruta graveolens* en un modelo murino de cáncer.**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE, DE ESTUDIOS SUPERIORES
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
 Ciudad de México, a 31 de octubre de 2016

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
 DIRECTOR DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

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

Índice

Contenido

Abreviatura.....	1
Resumen.....	3
Introducción	4
Marco teórico.....	5
1. Lectinas.....	5
1.1 Importancia Biológica de las Lectinas	7
1.2 Aplicaciones.....	8
1.3 Efectos adversos.....	11
1.4 Otros efectos	12
1.5 Aplicaciones oncológicas.....	12
2. Cáncer.....	15
2.1 Tumores.....	15
2.2 Historia Natural del Cáncer	16
3. Estrés Oxidativo.....	17
3.1 Radicales libres	18
3.2 Especies reactivas.....	19
3.3 Peroxidación Lipídica.....	20
3.4 Biomarcadores de estrés oxidativo	21
3.5 Estrés oxidativo y cáncer	22
4. Glicosilación.....	23
4.1 Glicosilación aberrante y lectinas.....	26
5. La glándula mamaria	28
6. Cáncer de mama.....	29
6.1 Factores de riesgo	31
6.2 Tratamiento.....	33
7. <i>Ruta graveolens</i>	36
7.1 Sinonimia popular	36

7.2 Descripción botánica	36
7.3 Farmacología	37
Justificación	39
Hipótesis.....	39
Objetivo general:.....	40
Objetivos particulares:	40
Método.....	41
1. Obtención del material vegetal.....	41
2. Precipitación de proteínas por <i>Salting Out</i>	42
3. Purificación por diálisis.....	42
4. Obtención de proteínas tipo lectina mediante Cromatografía de afinidad.....	43
5. Cuantificación de proteínas, Carbohidratos totales y carbohidratos reductores.....	44
5.1. Cuantificación de proteínas.....	44
5.2. Cuantificación de carbohidratos	45
5.3 Método del ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS)	46
6. Cuantificación de la Hemaglutinación.....	47
7. Diseño biológico experimental.....	49
7.1 Inducción cancerígena.....	49
7.2 Tratamiento.....	50
7.3 Obtención del plasma sanguíneo	52
7.4 Preparación del hígado	52
7.5 Cuantificación de catalasa.....	52
7.6 Cuantificación de nitritos	54
7.7 Cuantificación de peroxidación lipídica.....	55
8. Análisis Estadístico	56
Resultados	57
1. Rendimiento	57
2. Hemaglutinación en sistema ABO	64
3. Peso corporal de los grupos	76
4. Evaluación de la actividad antioxidante.....	78
4.1 Presencia de masas tumorales.....	78
4.2 Concentración de nitritos en plasma e hígado.....	79

4.3 Actividad enzimática de la catalasa.....	81
4.4 Peroxidación lipídica en hígado y plasma	83
Discusión.	85
Conclusiones.	90
Bibliografía.	92

Abreviatura

• ΔA_{240}	Absorbancia a 240 nm
• $\bullet\text{NO}_2$	Radical de óxido nítrico
• 4-HNE 4	Hidroxinonenal (4-HNE),
• ABL	Lectina de <i>Agaricus bisporus</i>
• ACS	American Cancer Society
• ADN	Ácido desoxirribonucleico
• AECC	Asociación Española Contra el Cáncer
• AgNO_3	Nitrato de plata
• ANOVA	Análisis de Varianza Múltiple
• APA	Abrina
• Asn-X-Ser / Thr	Asparagina-X-Serina/Treonina
• ASTRO	American Society for Radiation Oncology
• ATP	Adenosín trifosfato
• ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
• BRCA 1	Breast Cancer 1
• BRCA 2	Breast Cancer 2
• CH	Colesterol
• CM	Cáncer de mama
• Con A	Concanavalina A
• Cu^{2+}	Catión de Cobre ⁺²
• DBA	Lectina de <i>Dolichos biflorus</i>
• DNS	Ácido 3,5 dinitro salicílico
• EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
• ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
• FD	Factor de Dilución
• Fe^{2+}	Catión de Hierro ⁺²
• FeSO_4	Sulfato ferroso
• GSA	Lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i>
• H_2O	Agua
• H_2O_2	Peróxido de Hidrogeno
• HNO_2	Ácido nitroso
• IARC	International Agency for Research on Cancer
• IMC	Índice Masa Corporal
• INC	Instituto Nacional del Cáncer
• LCA	Lectina de <i>Lens culinaris</i>
• LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
• MDA	Malondialdehído
• MOA	Lectina de <i>Marasmius oreades</i>

• NaCl	Cloruro de Sodio
• NED	N-1-naftiletildiamina
• NH	Grupo amino
• NTP	National Toxicology Program
• O.N.	Óxido de níquel
• O ₂ ^{·-}	Radical superóxido
• O ₃	Ozono
• OH	Radical hidroxilo
• ONOO-	Peroxinitrito
• PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
• PI3-kinasa	Fosfoinositida-3-quinasa
• PLs	Fosfolípidos
• PNA	Lectina de <i>Arachis hypogaea</i>
• PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
• RCA	Ricina
• RCS	Especies reactivas de cobre
• RIS	Especies reactivas de hierro
• RNS	Especies reactivas de nitrógeno
• ROS	Especies reactivas de oxígeno
• RPE	Resonancia Paramagnética Electrónica
• SB	Lectina de <i>Glycine max</i>
• SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
• STL	Lectina de <i>Solanum tuberosum</i>
• STM	Método de Atrapamiento de Spin
• TBA	Ácido tiobarbitúrico
• TCA Ácido	Tricloroacético
• TRIS-HCL	Tris hidrocloreuro
• UCAT	Unidades de Catalas
• UEA	Lectina de <i>Ulex europaeus</i> I
• UIO	University of Oslo
• UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
• UNQ	Universidad Nacional de Quilmes
• UV	Ultravioleta
• VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
• WGA	Lectina de <i>Triticum vulgare</i>
• ε	Coefficiente de extinción molar

Resumen

Se le da el nombre de *cáncer* a un conjunto de enfermedades correlacionadas que provocan la división celular descontrolada de un tejido con la capacidad de diseminarse a tejidos circundantes. Entre los factores de riesgo más frecuentes son la predisposición genética, además de factores ambientales y hábitos como la contaminación, luz solar, tabaco, alcohol, entre otros. Una de las características principales del cáncer es el aumento en la concentración de radicales libres y especies reactivas, generando niveles altos de estrés oxidativo.

El cáncer puede darse en casi cualquier tipo de tejido y cuenta con características diferentes dependiendo de la parte del cuerpo en el que ocurra. Uno de los tipos de cáncer más peligrosos es el de mama ya que tiene el primer lugar en incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial.

La mayoría de los fármacos citotóxicos que se usan en los tratamientos actuales contra el cáncer no distinguen las células y tejidos sanos respecto a otros afectados por tumores, lo que provocan en los primeros una serie de efectos secundarios que pueden ser leves, severos o potencialmente mortales. Las lectinas vegetales han mostrado tener alta selectividad citotóxica a las células cancerígenas debido a que ejercen un efecto modulador en la síntesis de proteínas e inductor de la apoptosis celular en células tumorales.

En este trabajo se realizó una caracterización biológica, mediante un modelo de hemaglutinación ABO+, de las lectinas procedentes de dos extractos de *Ruta graveolens* obtenidos con dos variantes de la técnica *Salting Out*. Se evaluó la actividad antioxidante de fracciones proteicas de tipo lectina afines a diversos carbohidratos en un modelo murino de cáncer de mama para comprobar la relación que existe entre las lectinas y la actividad antitumoral. Se obtuvo que las fracciones con mejor actividad hemaglutinante y antioxidante fueron las obtenidas con glucosa, sin ninguna diferencia dependiente del extracto de procedencia

Introducción

En 1888 Stillmark fue el primero en describir el proceso de la hemoaglutinación por lectinas, específicamente con extractos de semillas de ricino (*Ricinus communis*), quien demostró que la toxicidad de las semillas se debía a la presencia de un factor proteico aglutinante de eritrocitos (Shiniti, 2007). La proteína responsable de la aglutinación de los eritrocitos fue denominada ricina (RCA) (Stillmark, 1888). Posteriormente, Hellín observó la presencia de una proteína tóxica, la abrina (APA), en los extractos del Regalíz americano (*Abrus precatorius*) (Sharon y Lis, 2004).

En 1898, Elfstand propuso el nombre genérico de "hemoaglutininas" para el grupo de proteínas citotóxicas y hemoaglutinantes. Sin embargo, la idea de que la toxicidad era una característica intrínseca de las hemaglutininas tuvo que ser abandonada, cuando en 1907, K. Landsteiner y H. Raubitschek encontraron hemaglutininas inocuas en semillas de alubias (*Phaseolus vulgaris*), guisante (*Pisum sativum*) y lenteja (*Lens culinaris*) (Shiniti, 2007).

Summer (1919), aisló de frijol canavalia (*Canavalia ensiformis*) una proteína que llamó Concanavalina A (Con A) y de esta manera obtuvo una hemaglutinina pura por primera vez. Sin embargo, casi dos décadas pasaron antes de que Sumner y Howell (1936) reportaran que Con A provocaba aglutinación en células como eritrocitos y levaduras y también precipitaban glucógeno a partir de una solución. Además mostraron que la hemoaglutinación por Con A fue inhibida por la sacarosa, lo que demostró por primera vez la especificidad a carbohidratos de las lectinas. Con mucha previsión, sugirieron que la hemaglutinación inducida por Con A podría ser consecuencia de una reacción de la proteína con los carbohidratos de superficie en glóbulos rojos. (Sharon y Lis, 2004).

Entre 1948 y 1949, K. O. Renkonen, y de forma independiente W. C. Boyd y R. M. Reguera, mostraron que algunas hemaglutininas de leguminosa aglutinaban preferentemente eritrocitos humanos de determinados grupos sanguíneos del sistema ABO. El descubrimiento de esta selectividad motivó la adopción del término "lectina" (del latín "legere", escoger) para designar a las hemaglutininas (Gallego del Sol et al., 2006).

Desde los años cincuenta hasta nuestros días, se han identificado cientos de lectinas, de origen no inmunitario y ubicadas en toda la escala evolutiva (virus, microorganismos, plantas, hongos y animales). En su mayoría, estas proteínas privadas de actividad enzimática no aglutinan glóbulos rojos. Presentan, entre otros caracteres comunes, un dominio de reconocimiento de azúcares, al menos (Gallego del Sol et al., 2006).

Marco teórico

1. Lectinas

El término lectina se aplica a proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que reconocen de manera específica carbohidratos de la superficie celular o en suspensión, aglutinan células y precipitan glicoconjugados; las lectinas poseen por los menos dos sitios de reconocimiento a carbohidrato, por ejemplo los tres sitios presentes en la MOA (lectina de *Marasmius oreades*) (Figura.1), de ahí su capacidad para aglutinar células, aunque en la actualidad el término de lectina se ha aplicado a proteínas con un solo sitio de reconocimiento a carbohidrato como las selectinas. Las lectinas no poseen actividad enzimática y no son producto de una respuesta inmune (Hernández et al., 2005)

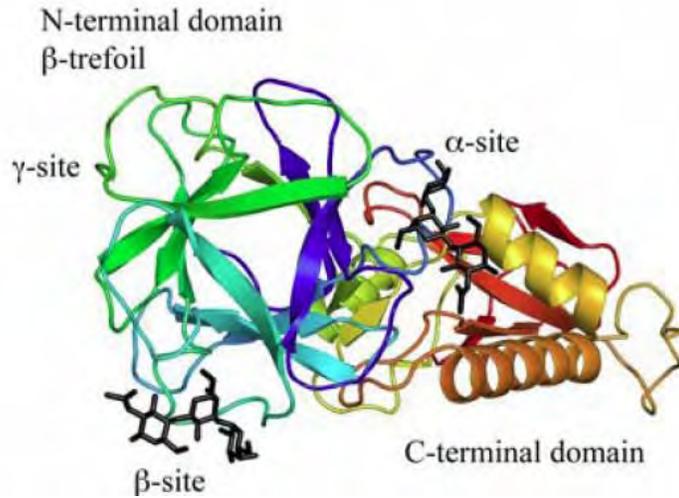


Figura. 1 - Estructura de la lectina MOA que muestra los potenciales tres sitios de reconocimiento a carbohidratos (UIO,2010).

Las lectinas están presentes en el reino vegetal, animal y en microorganismos como los virus y bacterias (Hernández et al., 1999). En los vegetales, la mayoría de las lectinas se encuentran en órganos de reserva, lo cual es una evidencia indirecta de su papel como proteínas de defensa. Aún después del descubrimiento de las lectinas, los científicos han estado intrigados por sus posibles papeles biológicos. Un avance se presentó cuando se comprendió que la mayoría de las lectinas vegetales no sólo cumplen un papel en la misma planta, por ejemplo, como una fuente de nitrógeno o como un factor de reconocimiento específico, sino que también interactuarían con los glicoconjugados de otros organismos (Mendoza, 2007).

1.1 Importancia Biológica de las Lectinas

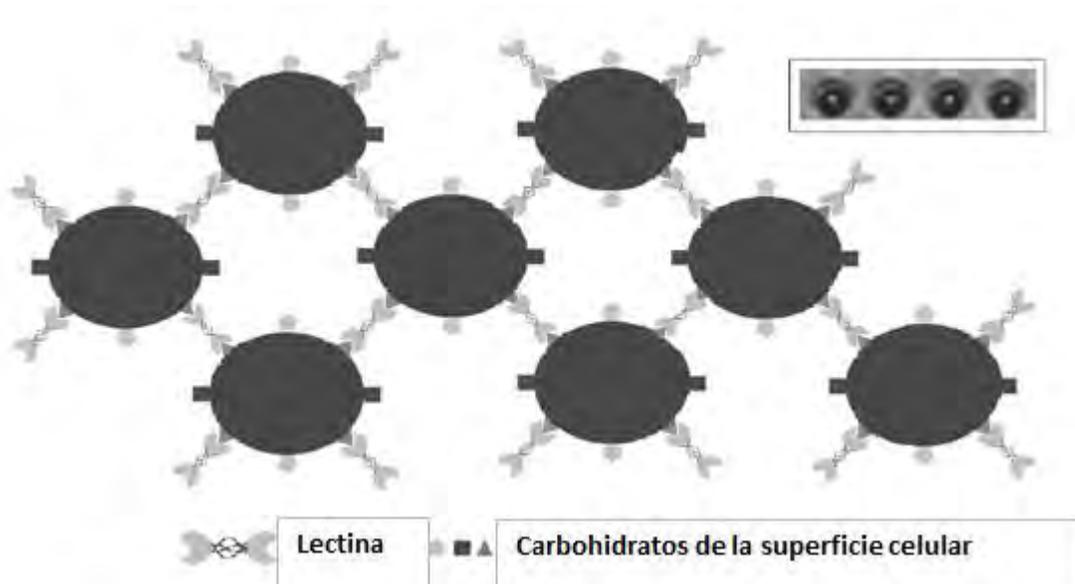


Figura. 2 - Aglutinación de células por la acción de lectinas bivalentes (dos sitios de unión) (Santos et al., 2012).

Todas las células cuentan con un recubrimiento de azúcares, que consiste en cadenas de hidratos de carbono, glicoproteínas de membrana y glicolípidos, o polisacáridos. Estos carbohidratos son sitios potenciales de fijación para lectinas. La unión puede inducir la variedad de cambios en la célula, tales como aglutinación celular, estimulación mitogénica, citotoxicidad y efectos similares a los de la insulina (Sharon y Lis, 2003)

La unión de una lectina a carbohidratos en la superficie celular, por ejemplo eritrocitos, causa una unión cruzada de las células y su subsiguiente precipitación, evento que se denomina aglutinación celular, mostrada en la Figura. 2. (Berg et al., 2002).

La aglutinación es determinada por una serie de parámetros interrelacionados, donde la modificación de una variable podría alterar la capacidad aglutinante celular; estos parámetros son pero no se limitan a: la estructura química de los sitios receptores en la superficie celular, el número de moléculas directamente involucradas en la aglutinación y la cantidad, movilidad y distribución de los sitios disponibles capaces de interactuar con las lectinas. La estructura de la superficie celular también afecta la factibilidad de aglutinación en un sistema celular dado (Katzin et al., 1979).

Otra propiedad de algunas lectinas es la estimulación de la actividad mitogénica, en la que promueven la transformación de células en fase de reposo hacia la mitosis. (Tashfeen et al., 2003).

1.2 Aplicaciones

Las lectinas se consideran elementos valiosos en el campo de la Genética, la Biomedicina y la Inmunología. Su utilidad está basada en la propiedad que tienen de combinarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en las superficies celulares y fluidos corporales. Sus propiedades mitogénicas permiten que se utilicen en estudios que tienen como base la proliferación de linfocitos en cultivos, como son: (Hernández et al., 1999).

- La evaluación de la producción de citocinas (interferón e interleucinas) y la expresión de sus receptores en sobrenadantes de cultivos de linfocitos provenientes de pacientes con enfermedades de alto impacto social como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la tuberculosis y la leishmaniosis, entre otras.
- La caracterización de algunos aspectos relacionados con la respuesta inmune y fenómenos asociados con ellas como la inmunosupresión.

- La interacción entre virus, como por ejemplo entre el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis B, así como la susceptibilidad y resistencia a éstos.
- Análisis de funciones linfoproliferativas y citotóxicas en células mononucleares causadas por algunas drogas.
- Estudios acerca de la influencia nutricional en la proliferación de linfocitos y su cinética de proliferación.
- La inducción de genes en linfocitos.
- La detección de anomalías cromosómicas.

1.2.1 Plantas Plaguicidas

Las lectinas han surgido como uno de los agentes prometedores contra plagas de insectos y han sido diseñadas y sintetizadas con éxito en una variedad de cultivos como el trigo, arroz, tabaco, y patatas. Este enfoque podría ser utilizado como parte de las estrategias de manejo integrado de plagas (Kwan y Bun, 2011).

En general, parece que la implementación a gran escala de estas plantas transgénicas y tolerantes a los herbicidas no muestra efectos negativos considerables sobre el medio ambiente. Además, al menos algunas plantas transgénicas pueden mejorar los entornos correspondientes y la salud humana debido a que su producción se reduce considerablemente la carga de insecticidas y herbicidas químicos (Velkov et al. 2005).

1.2.2 Actividad Antifúngica

A pesar del gran número de lectinas y hemaglutininas que han sido caracterizadas y purificadas, sólo unas pocas de ellas manifestaron actividad antifúngica. La expresión de lectinas de *Gastrodia elata* en las células vasculares de sus raíces y tallos fue fuertemente inducida por el hongo *Trichoderma viride*, lo que indica que la

lectina es una proteína importante en la defensa en plantas. Después de la inserción del gen precursor de la isolectina de *Urtica dioica* en el tabaco, la germinación de esporas de *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lindemuthianum*, y *T. viride* se redujo significativamente. Por lo tanto, las lectinas pueden introducirse en plantas para protegerlos contra el ataque de hongos (Kwan y Bun, 2011).

1.2.3 Actividad Bactericida

Diversas lectinas con especificidad a diferentes carbohidratos son capaces de promover la inhibición del crecimiento o la muerte de algunas bacterias. Existen diversas aplicaciones propuestas con lectinas para la detección y el control de bacterias que causan daño a las plantas y los seres humanos. La actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y Gram-negativas se produce a través de la interacción de una lectina con los componentes de la pared celular bacteriana, incluyendo los ácidos teicoico y teicurónico, peptidoglicanos y lipopolisacáridos (Hamid et al., 2013).

1.2.4 Actividad Antiviral

La lectina (D-manosa-específica) de *Gerardia savaglia* fue la primera lectina reportada como herramienta en la prevención para la infección de las células H9 con VIH. Las lectinas vegetales muestran actividad antiviral, especialmente lectinas manosa-específicas. Interfirieron con la unión del virus en la etapa temprana de ciclo de replicación y suprimen el crecimiento mediante la interacción en el final del ciclo de virus infeccioso (Keyaerts et al., 2007).

1.3 Efectos adversos

1.3.1 Malestar digestivo

Las lectinas pueden causar síntomas gastrointestinales agudos, incluyendo náuseas y vómitos. Se unen a la superficie luminal de los enterocitos de absorción en el intestino delgado. Esto daña severamente las microvellosidades de los enterocitos, interrumpiendo la digestión y absorción. Las lectinas pueden aumentar el peso intestinal y el número de células en un 60-80%, además de promover la creación de gas, líquido y moco, e incluso la proliferación de bacterias dañinas en el intestino (Power, 1991).

1.3.2 La mala absorción de Proteínas

Las lectinas pueden alterar la absorción de proteínas. Causan lesiones e inflamación, el bloqueo de la producción de enteroquinas. Esto interfiere con la degradación de las proteínas y con la absorción de nitrógeno en el intestino. Esto explica el por qué los animales con dietas altas en lectinas tienen una mayor pérdida de nitrógeno fecal y urinario, lo que resulta en un desajuste en el equilibrio de nitrógeno (Power, 1991).

1.3.3 La mala absorción de Carbohidratos

Las lectinas también pueden alterar la absorción y el metabolismo de carbohidratos. Pueden reducir la absorción intestinal de glucosa en un 50% (Freed, 1979). Con A y otras lectinas pueden incluso unirse a los receptores de insulina en las células, lo que detiene el transporte de glucosa al interior de la célula por la proteína PI3-Kinasa (Liener et al., 1986). Por último, debido al alto contenido de lectina en los granos, se especula que pueden causar inflamación intestinal y la enfermedad celiaca en humanos. De hecho, se ha encontrado que la toxina Gliadina es una isolectina de aglutinina proveniente del germen de trigo. (Power, 1991).

1.4 Otros efectos

Diversas investigaciones muestran un vínculo de unión entre el consumo de lectinas y el surgimiento o promoción, o ambos, de enfermedades (Freed, 1999) como:

- artritis, tanto reumatoide y osteoartritis
- alergias
- enfermedad celíaca
- diabetes dependiente de insulina
- úlceras pépticas

1.5 Aplicaciones oncológicas

En el campo del cáncer, el estudio de las lectinas ha jugado un rol importante. Diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* con numerosas lectinas derivadas de plantas han mostrado que poseen actividad antitumoral (efecto inhibitorio en el crecimiento del tumor) y actividad anticarcinogénica (efecto inhibitorio en la inducción del cáncer por carcinógenos). Los estudios experimentales que utilizaron diferentes lectinas de plantas en casos de cáncer, nos permiten entender que 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 (Castillo y Abdullaev, 2005).

Desde los años setenta se reporta la actividad antitumoral de las lectinas de plantas. La administración intraperitoneal de RCA y APA en ratones inducidos inhibe el crecimiento de los tumores derivados del carcinoma ascítico Ehrlich (Lin et al., 1970) y en reportes recientes se describe el mecanismo de toxicidad tanto de la RCA como de APA (Doan, 2004; Dickers et al., 2003), En otro estudio, se demostró que la inyección de Con A produce la inhibición del desarrollo tumoral en hamsters (células de polioma transformado 3T3) (Shoham et al., 1970). A partir de entonces se han

reportado muchos estudios con diferentes lectinas de plantas y su efecto en las células tumorales (Castillo y Abdullaev, 2005):

- La administración intraperitoneal de la lectina GSA (*Griffonia simplicifolia*) en ratones con células ascítica inhibe el crecimiento de los tumores. (Chen et al., 1994; Knibbs et al., 1994).
- Otros autores examinaron la actividad antitumoral de diferentes lectinas derivadas de: *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Glycine max* (SBA) y *Triticum vulgare* (WGA) en células murinas de linfoma ascítico *in vivo* y encontraron que las cuatro lectinas inhibieron el crecimiento del tumor y aumentaron la posibilidad de vida (Ganguly y Das, 1994).
- Por otro lado, se han reportado estudios que muestran el efecto citotóxico de las lectinas en células tumorales *in vitro* (Faheina et al., 2012; Janssen et al., 1993; Kelter et al., 2007; Valadez et al., 2011). El estudio con cinco diferentes lectinas: PHA, GSA, Con A , WGA, PNA (Lectina de *Arachis hypogaea*), en el crecimiento celular de tres líneas de cáncer colorectal humano (LoVo, HCT-15 y SW837) se ve afectado de manera diferente dependiendo de la concentración y el tipo de lectina, concluyendo que estas lectinas tienen un potencial para afectar (efecto citotóxico) el crecimiento de las colonias cancerígenas *in vitro* (Kiss et al. 1997)

En la Tabla 1 y 2 se muestran algunos de los mecanismos que se cree que se llevan a cabo en ensayos *in vitro* e *in vivo* sobre células cancerígenas.

Tabla. 1 - Mecanismos de acción de las lectinas de plantas en diferentes células malignas *in vitro*

In vitro			
Lectina	Mecanismo de acción	Línea celular	Tipo
PHA-L (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones	LoVo, HCT-15, SW837	Cáncer colorrectal humano
Con A (<i>Concavalina A</i>)	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones	LoVo, HCT-15, SW837	Cáncer colorrectal humano
GSA (<i>Griffonia simplicifolia I-A</i>)	Estimula el crecimiento celular a altas y bajas concentraciones. Inhibe el crecimiento celular a altas concentraciones	SW837 LoVo.	Cáncer colorrectal humano
WGA (<i>Triticum vulgare</i>)	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones	LoVo, HCT-15, SW837	Cáncer colorrectal humano
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

Tabla. 2 - Mecanismos de acción de las lectinas de plantas en diferentes células malignas *in vivo*

In vivo		
Lectina	Mecanismo de acción	Tipo
PHA (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Inhibición del crecimiento de tumores	Murina linfomas ascíticos
SBA (<i>Glycine max</i>)	Fortalecimiento del sistema inmune del huésped	Murina linfoma ascítico
TMA I y II (<i>Tricholoma mongolicum</i>)	Inhibición del tumor y prolongación de la vida de los animales	Ratón con células de sarcoma 180
GS-1 (<i>Griffonia simplicifolia</i>)	Inhibición del crecimiento de tumor	Ratón con células ascíticas Ehrlich

2. Cáncer

El cáncer no es una sola enfermedad sino que es un grupo de más de 200 enfermedades diferentes. Puede describirse generalmente como un crecimiento y una propagación descontrolados de células anormales en el cuerpo (ATSDR, 2007).

La transformación de células a cancerosas es resultado de mutaciones en genes concretos que regulan el crecimiento y desarrollo de las células dentro de un tejido determinado (principalmente en células somáticas (Beker y Díaz, 2013). Algunos de estos genes se les conocen como genes supresores de tumores. Las mutaciones también pueden causar que genes en estado normal se conviertan en genes causantes de tumores conocidos como oncogenes (ACS, 2014).

2.1 Tumores

Inicialmente el término tumor se aplicó a la tumefacción o hinchazón en un tejido u órgano causado por una inflamación, pero en la práctica la utilización de este término para designar un proceso no neoplásico ha desaparecido y se lo aplica como sinónimo de neoplasia (alteración de la proliferación y diferenciación celular que se lleva a la formación de una masa o tumor) (Zicre, 2012).

Las neoplasias se clasifican en benignas o malignas según el comportamiento clínico-biológico que presente (Zicre, 2012):

- Las neoplasias benignas son en general masas bien delimitadas, que permanecen localizadas sin diseminarse a otros sitios, por lo tanto pueden curar por extirpación quirúrgica.
- Los tumores malignos, en cambio, tienden a invadir o infiltrar y destruir los tejidos adyacentes y pueden diseminarse a sitios distantes (metastatizar), lo que dificulta el tratamiento.

2.2 Historia Natural del Cáncer

El proceso que va desde que se producen las primeras mutaciones de las células hasta que la enfermedad llega a su etapa final se llama historia natural (AECC, 2014).

La duración de este proceso en adultos depende del tipo de cáncer y oscila entre meses y décadas. En el caso de los niños todo este proceso se produce con mucha mayor rapidez e incluso durar sólo unos meses. Esto es debido a que las células que constituyen los tumores en la infancia son células más inmaduras, que se dividen y multiplican con mayor rapidez que las que constituyen los cánceres del adulto, por lo que el desarrollo y evolución de los tumores en niños se producen en un periodo de tiempo menor (AECC, 2014).

Los estadios clínicos de una enfermedad neoplásica son: la metaplasia (célula genéticamente alterada), hiperplasia, displasia, el cáncer in situ y cáncer invasivo. En cada una de estas etapas la célula experimenta modificaciones en sus genes (mutaciones) y entorno. Así partiendo de un epitelio normal, el tejido pasa por diferentes estadios (Pañihuara, 2015):

- Metaplasia: Así el proceso comienza con una etapa de iniciación, en la que una célula normal sufre una mutación genética que altera sus características, esta etapa se conoce con el nombre de metaplasia.
- Hiperplasia: Después de esta fase inicial sigue un período de hiperplasia, en donde la célula alterada y su progenie conservan su apariencia normal pero se reproducen en exceso.
- Displasia: Al cabo de los años, una de estas células sufre otra mutación que altera, todavía más, el control del crecimiento celular, reproduciéndose aún más. El proceso continúa evolucionando de tal manera que además de una proliferación de manera desmesurada, la progenie de esta célula presenta un aspecto anormal en su morfología; se dice entonces que el tejido presenta displasia.

- **Cáncer *in situ*:** De nuevo, y al cabo del tiempo estas células pueden desarrollar anomalías crecientes en su desarrollo y aspecto, y es entonces cuando empezamos a hablar de cáncer. Si el tumor no ha traspasado aún ninguna barrera para invadir otro tejido, se habla de un cáncer *in situ* o cáncer localizado.
- **Cáncer invasivo:** El tumor puede permanecer localizado indefinidamente, sin embargo algunas células pueden sufrir nuevas mutaciones y el tumor localizado puede ir adquiriendo todavía más rasgos malignos que le facilitan la capacidad invasiva del tejido circundante y la entrada de las células en el torrente sanguíneo o en la linfa, calificamos entonces la masa tumoral como maligna. Así, las células invasoras pueden iniciar nuevos tumores en otras partes del cuerpo (metástasis), que pueden ser letales si afectan a un órgano vital y nos encontramos ante un cáncer invasivo.

Por otro lado se considera que el cáncer induce un aumento en los niveles del estrés oxidativo.

3. Estrés Oxidativo

El cuerpo humano mantiene un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes. La pérdida en este balance de óxido-reducción lleva a un estado de estrés oxidativo y este estado se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas, que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes causando daño y muerte celular. Esto ocurre en patologías degenerativas, de tipo infeccioso, inmune, inflamatorio, etc. (Dorado et al., 2003).

La alteración del balance entre pro-oxidantes y antioxidantes, puede tener diversos grados de magnitud. En el estrés oxidativo leve, las defensas antioxidantes bastan para restablecer dicho balance, pero en el estrés oxidativo grave se llega a graves

alteraciones en el metabolismo celular, como rompimiento de ADN, aumento de la concentración de calcio intracelular, descompartamentalización de iones de Fe^{2+} y Cu^{2+} catalíticos, daño a los transportadores membranales de iones y otras proteínas específicas, y peroxidación de lípidos. El daño por estrés oxidativo, puede ser reversible o irreversible dependiendo de factores como el tiempo que dure el estrés, la efectividad de las defensas antioxidantes, la edad del organismo, el estado nutricional y factores genéticos que codifican sistemas antioxidantes (Dorado et al., 2003).

3.1 Radicales libres

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, señalado por el punto situado a la derecha del símbolo. Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar. Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo (Venereo, 2002).

3.2 Especies reactivas

Las especies reactivas incluyen a las de oxígeno (ROS), las especies reactivas de hierro (RIS), las especies reactivas de cobre (RCS), así como a las especies reactivas de nitrógeno (RNS). Las especies reactivas se forman como productos del metabolismo de los radicales libres, y aunque no todas son radicales libres, son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en radicales libres lo que les confiere la característica de ser compuestos muy dañinos para las células (Dorado et al., 2003).

Estas especies reactivas dañan tanto al ADN como a las proteínas transportadoras. Las de cobre a través de proteínas detectoras específicas de oxidación, pueden alterar la expresión genética; asimismo causan daño en las enzimas reparadoras y las polimerasas y dejan pasar una mayor cantidad de errores. Aunado a esto los productos finales de la lipoperoxidación provocan daño a las proteínas y al ADN. El radical hidroxilo ataca las bases del ADN, este daño se suma al de los productos derivados del $\bullet\text{NO}_2$ (HNO_2 y ONOO^-), los cuales provocan nitración y desaminación (en adenina, guanina y citosina), lo que ocasiona alteraciones en la codificación y transcripción del material genético (Dorado et al., 2003).

3.2.1 Especies reactivas de oxígeno

Las ROS son compuestos que se derivan de la molécula de oxígeno (O_2) por reducción química parcial (Baizabal, 2010).

Engloba no solamente a los verdaderos radicales derivados del oxígeno, como el superóxido (O_2^-) o el hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) (No confundir con el ión hidroxilo OH^- que no es un radical libre), sino que en él se incluyen además moléculas no radicales como: peróxido de Hidrogeno (H_2O_2), ozono (O_3), etc. Bajo el punto de vista químico tanto el O_2^- como el H_2O_2 no son muy reactivos frente a la mayoría de las biomoléculas en soluciones acuosas y en condiciones fisiológicas (aunque lo son bastante más que el O_2) si las comparamos con la actividad del radical $\text{OH}\cdot$; el problema que plantean aquellos es que, en determinadas circunstancias del entorno celular, se

transforman en radicales hidroxilo. Otro aspecto a tener en cuenta es la capacidad del H_2O_2 para difundir a través de la bicapa lipídica, lo que hace posible su presencia por difusión en diferentes compartimentos celulares. Esta circunstancia aumenta las probabilidades de que el H_2O_2 pueda reaccionar con átomos de Fe^{2+} celular produciendo radicales hidroxilo (Crespo, 2006).

3.2.2 Especies reactivas de Nitrógeno

Las RNS son diversos compuestos derivados del óxido nítrico, incluyendo el anión nitroxilo, cationes nitrosonio, óxidos de nitrógeno (ejemplo. Óxido Nítrico, S-nitrosotioles y complejos de hierro). Las RNS han sido reconocidas por su papel crucial en la regulación fisiológica de muchas, si no todas, las células vivas, como las células musculares lisas, cardiomiocitos, plaquetas y células nerviosas y yuxtglomerulares. Poseen propiedades pleiotrópicas sobre células diana después de dos modificaciones postraduccionales y las interacciones con las especies reactivas del oxígeno. Los niveles elevados de RNS han sido implicados en las lesión celulares y la muerte mediante la inducción de estrés nitrosativo (Martínez y Andriantsitohaina, 2009).

3.3 Peroxidación Lipídica

La peroxidación es un proceso en el que los oxidantes reaccionan a los lípidos que contienen dobles enlaces carbono-carbono, ácidos grasos especialmente poliinsaturados (PUFAs) que implica la abstracción de hidrógeno de un carbono, con la inserción de oxígeno resultante en los radicales peroxilos e hidroperóxidos lipídicos (Yin et al, 2011). Los glicolípidos, fosfolípidos (PLs) y el colesterol (Ch) son objetivos conocidos de las modificaciones peroxidativas dañinas y potencialmente letales. Los lípidos también son oxidados por enzimas como lipoxigenasas, ciclooxigenasas y citocromo P_{450} . En respuesta a la peroxidación de lípidos de membrana, y de acuerdo a las circunstancias metabólicas celulares específicas y las capacidades de reparación, las células pueden promover la supervivencia

celular o inducir la muerte celular. Bajo condiciones de peroxidación de lípidos bajas (condiciones subtóxicas), las células estimulan su mantenimiento y la supervivencia a través de sistemas antioxidantes de defensa constitutiva o de señalización de activación de las vías que regulan el alza de proteínas antioxidantes que resultan en una respuesta de estrés adaptativo. Por el contrario, bajo las altas tasas de peroxidación de lípidos (condiciones tóxicas) el daño oxidativo abruma la capacidad de reparación, y las células inducen la apoptosis o necrosis; ambos procesos pueden dar lugar a daño celular molecular que puede facilitar el desarrollo de diversos estados patológicos y el envejecimiento acelerado (Ayala et al., 2014).

La peroxidación lipídica produce una amplia variedad de productos de oxidación. Los principales productos primarios de la peroxidación lipídica son los hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Entre los muchos aldehídos diferentes que se pueden formar como productos secundarios durante la peroxidación lipídica se encuentran el malondialdehído, propanal, hexanal, y 4-hidroxinonenal (4-HNE), los cuales han sido ampliamente estudiados por Esterbauer y sus colegas en los años 80. El malondialdehído parece ser el producto más mutagénico de la peroxidación de lípidos, mientras que el 4-HNE es el más tóxico (Ayala et al., 2014).

3.4 Biomarcadores de estrés oxidativo

Debido a la complejidad de las enfermedades asociadas al estrés oxidativo, es muy improbable que un solo biomarcador del estrés oxidativo sustituya los resultados de un diagnóstico clínico o investigación. Por esta razón, el desarrollo de un grupo de biomarcadores es esencial para un diagnóstico o control de progresión más acertado de la enfermedad. Aunque existen técnicas directas para la medición de especies reactivas y otros radicales libres, tales como la Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) y el Método de Atrapamiento de Spin (STM); lo más común en la medición de biomarcadores del estrés oxidativo son las técnicas indirectas, mediante las cuales las ROS son capturadas por un reactivo adecuado para formar una entidad química estable que posteriormente se analiza por técnicas

gasométricas, espectrofotométricas, inmuno-enzimáticas (ELISA) y cromatográficas (Rossi et al., 2016).

3.5 Estrés oxidativo y cáncer

El cáncer es *per se* una enfermedad inductora de estrés oxidativo. Las células neoplásicas producen de forma intrínseca una mayor cantidad de ROS que las células normales. Algunos estudios han observado que pacientes con cáncer avanzado presentan concentraciones plasmáticas de ROS más elevadas que los sujetos sanos, mientras que los niveles de actividad enzimática de los sistemas antioxidantes como glutatión peroxidasa se hallan disminuidos (Viñas et al., 2012).

Los mecanismos por los cuales las células neoplásicas presentan niveles de ROS más elevados que las células normales pueden ser múltiples. En primer lugar, las células neoplásicas tienen incrementadas sus necesidades metabólicas, por lo que requieren mayores cantidades de ATP producido por las mitocondrias para mantener su elevado ritmo de crecimiento y proliferación. La síntesis desmesurada de ATP mitocondrial contribuye a la producción de ROS. A esto se le añade que las células tumorales utilizan en mayor grado la vía de la glucólisis para la síntesis de ATP (efecto *Warburg*), que es mucho menos efectiva que la cadena respiratoria mitocondrial. Esta alteración en el funcionamiento mitocondrial favorece la filtración de electrones cuando estos pasan a través de los complejos de la cadena respiratoria de electrones, específicamente los complejos I, II y III, generando una mayor cantidad de radicales libres (Viñas et al., 2012).

Al estrés oxidativo generado por las alteraciones metabólicas de las células neoplásicas se le añade la producción de grandes cantidades de ROS por parte de las células inflamatorias que infiltran el tejido tumoral y que incrementan el estrés oxidativo en el microambiente tumoral. Además, la mayoría de los pacientes oncológicos padecen anorexia, hecho que impide el correcto aporte de nutrientes y por lo tanto un déficit de vitaminas y otros antioxidantes que compensen la

producción de radicales libres. Este déficit puede verse agravado por las náuseas y los vómitos originados por los tratamientos oncológicos o por la propia enfermedad, que dificultan la ingesta de alimentos. A todos estos factores hay que añadirles los radicales libres generados por los tratamientos oncológicos específicos como la quimioterapia y/o la radioterapia (Viñas et al., 2012)

4. Glicosilación

La glicosilación es la modificación post-traducciona covalente más frecuente y compleja en proteínas presentes en células eucariotas, involucrando aproximadamente el 50% de las mismas. Consistente en la adición de uno o más residuos glucídicos a los aminoácidos que las conforman, en una compleja red de reacciones que involucran a diversas enzimas (Rodríguez, 2012).

El papel de los carbohidratos presentes en glicoproteínas y sus derivados, es particularmente importante en el desarrollo de organismos multicelulares, ya que su presencia es esencial para establecer interacciones entre las células y la matriz extracelular, la regulación de la actividad enzimática, conferir estabilidad y solubilidad a las proteínas secretadas, modificar la funcionalidad del sistema inmune, entre otros (Rodríguez, 2012).

Existen dos tipos básicos de glicosilación: la N-glicosilación y O-glicosilación. (Figura. 3) Estas presentan significativas diferencias en términos de su biosíntesis y estructura, así como en la ubicación dentro de la cadena proteica.

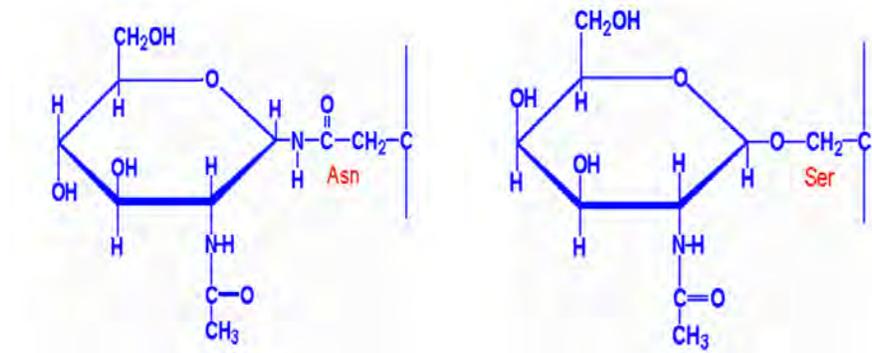


Figura. 3 - Representación del enlace N-glucosídico (izquierda) y O-glucosídico (derecha) (Javed, 2002).

Los N-glicanos (ejemplos en la Figura. 4) son producidos a partir de una estructura peptídica precursora fosforliada (dolicol o undecaprenol) de 14 péptidos, un oligosacárido preformado, compuesto por N-acetil glucosamina, manosa y glucosa (Gorocica et al., 2008), que se une a los residuos de asparagina en la secuencia de consenso Asn-X-Ser / Thr (Asparagina-X-Serina/Treonina) donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina, perdiendo la estructura peptídica precursora. No todas las secuencias de consenso son glicosiladas debido a la tridimensionalidad de la estructura de la proteína glicosilada, la cual provoca que la región de a secuencia de consenso no interaccione con la oligosacariltransferasa. El precursor degrada a una estructura *Core* invariante (residuos de tres manosa y dos N-acetilglucosamina) que se reconstituye utilizando el repertorio de glicosiltransferasas presentes en la célula tomando en cuenta la tridimensionalidad de la molécula (Easton, 2011).

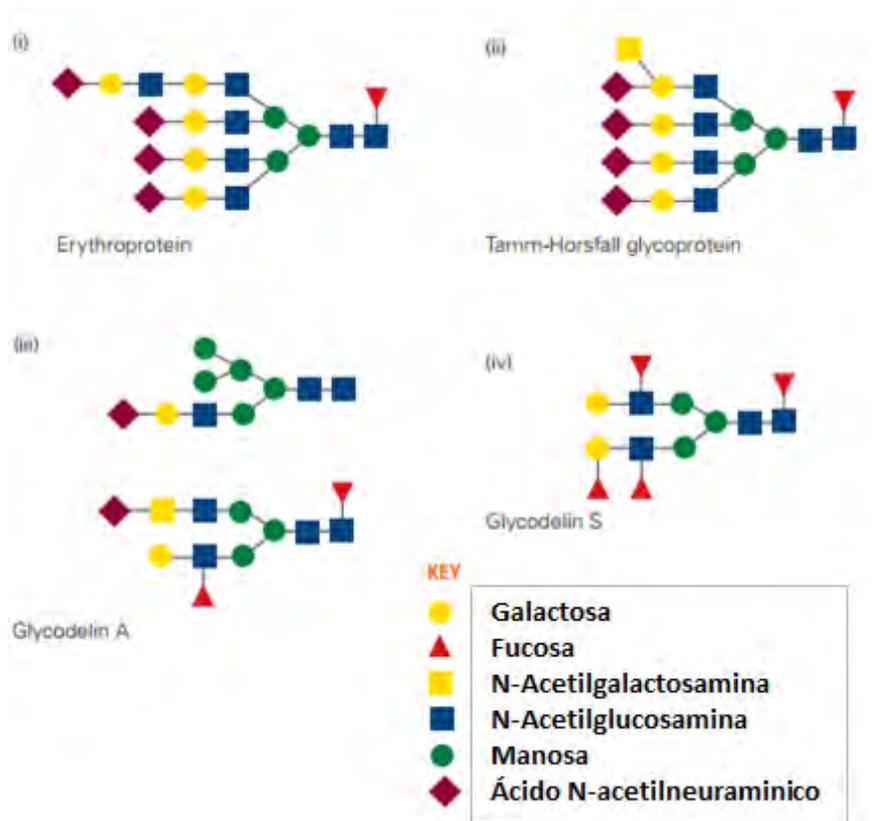


Figura. 4 - Ejemplos de N-glicanos y glicoproteínas o tipos celulares donde se encuentran (Easton,2011).

Los O-glicanos (ejemplos en la Figura. 5) se unen a residuos de serina o treonina y no cuentan con una secuencia consenso por la cual identificarlos. Se forman por la unión de un monosacárido que casi siempre es N-acetil galactosamina al grupo hidroxilo de un residuo de serina o de treonina, aunque en raras ocasiones el monosacárido puede ser manosa o fucosa (Easton, 2011).

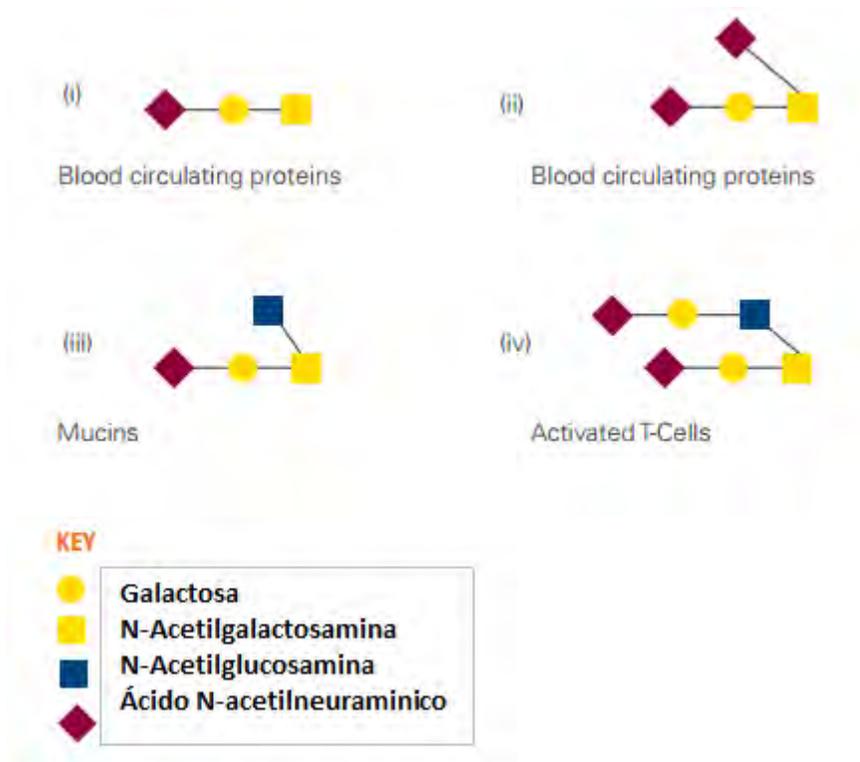


Figura. 5 - Ejemplos de N-glicanos y glicoproteínas o tipos celulares donde se encuentran (Easton, 2011).

4.1 Glicosilación aberrante y lectinas

Las células tumorales muestran patrones aberrantes de glicosilación en carbohidratos ligados a ceramidas y proteínas de la superficie celular. Las alteraciones en la glicosilación se encuentran en todas las células neoplásicas y algunas de ellos son bien conocidas como marcadores de progresión. Cada tipo de neoplasia presenta patrones de alteración diferencial, incluso durante las diferentes etapas de la enfermedad. Dos grandes cambios característicos en la glicosilación se presentan en las células neoplásicas: el bloqueo de síntesis de carbohidratos y la neo-síntesis (Ferriz et al., 2010).

Entre las alteraciones más comunes en las células neoplásicas son el aumento de N-glicanos y de ácido siálico en la superficie celular, la producción anormal de mucina, la expresión de estructuras de Lewis X/A en glicoesfingolípidos

(identificados en un principio como un antígeno tumoral), y el aumento de la expresión de las galectinas. Todos estos cambios se correlacionan con la capacidad de las células neoplásicas de metástasis y / o el aumento de la migración y su capacidad para evadir la respuesta inmune. En algunos casos, las glicoproteínas de membrana también se modifican, de manera que actúan como antígenos oncogénicos (Ferriz et al., 2010).

Las alteraciones que se producen en el cáncer implican la pérdida o cambios en la función de ciertas estructuras, la presencia de estructuras truncadas y sus precursores y, en menor medida, la aparición de nuevas estructuras (Ferriz et al., 2010).

Esta es la base de que las lectinas alteran la respuesta de las células cancerosas. El conocimiento de la interacción de lectinas con las células cancerosas y la forma en que puede afectar a la biología del tumor explica el papel de los carbohidratos en la adquisición de una forma maligna y por lo tanto su inhibición (Cummings y Etzler, 2009).

Varios estudios se han centrado en su capacidad de mostrar aglutinación preferencial en las células neoplásicas, por lo tanto, una importante área donde se utilizan lectinas es la detección de cambios malignos en las células transformadas debido a las alteraciones en su superficie celular (Valadez et al., 2014). Se ha observado mayor afinidad entre células neoplásicas y lectinas, que entre las células sanas y las mismas lectinas (Clark y Mao, 2012; Mody et al., 1995; Yau et al., 2015; Zhou et al., 2015). A través de este mecanismo, las lectinas pueden inducir apoptosis, citotoxicidad, y la inhibición del crecimiento tumoral (Ferriz et al., 2010).

Por ejemplo, se han reportado estudios de las lectinas y su unión a carbohidratos en tres líneas celulares de carcinoma colorectal humano (CaCo-2, HT-29 y HCT-8), con diferentes lectinas marcadas con fluorescencia: DBA (*Dolichos biflorus*), PNA, LCA (*Lens culinaria*), STL (*Solanum tuberosum*), UEA-I (*Ulex europaeus* I), y WGA. Se describió la tasa de unión a las diferentes líneas celulares, lo que refleja el patrón de glicosilación de las células. (Garbor et al., 1998). La unión

específica de las lectinas sobre residuos de azúcares ha permitido realizar otros estudios con lectinas como la ABL (*Agaricus bisporus*) que se unen a un disacárido galactosilado expresado en queratinocitos. Con estos estudios Castillo y Abdullaev (2005) proponen que las lectinas inhiben la proliferación de líneas celulares de cáncer y con potencial terapéutico en situaciones como la psoriasis.

5. La glándula mamaria

En la mujer adulta las glándulas mamarias (Figura. 6) se localizan en la pared anterior del tórax y se extienden verticalmente desde la segunda a la sexta costilla inclusive y horizontalmente, desde el esternón (paraesternal) a la línea axilar media. Presentan una prolongación axilar (cola de Spence), por lo que el cuadrante superoexterno contiene la mayor cantidad de tejido glandular. La porción lateral mamaria se conecta a las digitaciones del músculo serrato mayor y la medial con la porción superior del músculo oblicuo anterior abdominal (Vinagre, 2015).

La mama está compuesta por 15 a 20 lóbulos de tejido glandular túbulo-alveolar que aparecen separados por bandas fibrosas de tejido conectivo, en forma radiada, que alcanzan la dermis formando los ligamentos suspensorios de Cooper.

El tejido adiposo se distribuye preglandularmente (excepto en la región retroareolar) en pequeños pelotones o celdas adiposas de Duret separados por las crestas fibrosas. Posteriormente, conforma la capa adiposa retroglandular. Cada lóbulo mamario termina en un conducto excretor lactífero o galactofórico. Antes de abrirse en el pezón, presenta una dilatación llamada seno o ampolla galactofórica (Vinagre, 2015).

La porción central anterior de la mama está ocupada por una elevación cilíndrica llamada pezón, rodeada de un disco de piel altamente pigmentada conocido como la areola. Fibras musculares areolares, radiales y circunferenciales son las responsables de la erección del pezón. La areola contiene glándulas sebáceas y accesorias de Morgagni que forman pequeñas eminencias llamadas tubérculos de

Montgomery. En el pezón existen numerosas terminaciones sensitivas libres así como corpúsculos de Meissner y discos de Merkel (Vinagre, 2015).

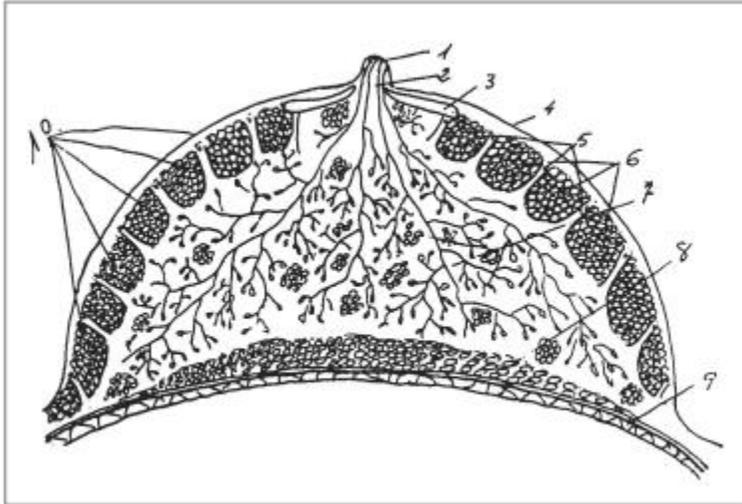


Figura. 6 Proyección craneo-caudal de una mama normal (según Gros). 1. Pezón; 2. Galactóforos; 3. Aréola; 4. Contorno de la piel; 5. Ligamentos de Cooper; 6. Lagos adiposos cuyo conjunto (forma la capa grasa anterior; 7. Tejido glandular fibro-adiposo; 8. Capa grasa retromamaria; 9. Aponeurosis pectoral mayor (Vinagre, 2015).

6. Cáncer de mama

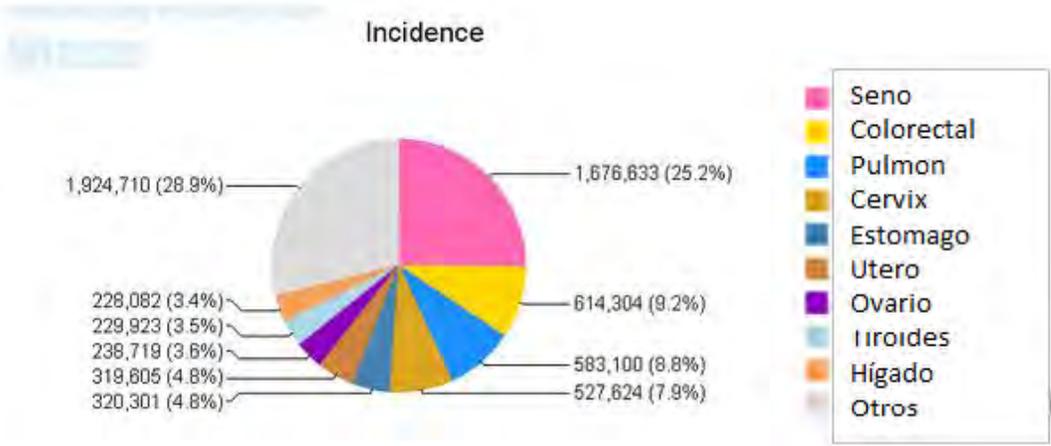
El cáncer de mama (CM), (adenocarcinoma) es una enfermedad maligna en donde la proliferación acelerada, desordenada y no controlada de células pertenecientes a distintos tejidos de la glándula mamaria forman un tumor que invade los tejidos vecinos y metastatiza a órganos distantes del cuerpo. Como otros tumores malignos, el cáncer de mama es consecuencia de alteraciones en la estructura y función de los genes. Los carcinomas de mama suponen más de 90% de los tumores malignos (Secretaría de Salud, 2007).

El C.M. es la neoplasia más frecuente a nivel mundial (Gráfica 1.) y con el mayor grado de mortalidad (Gráfica 2) en mujeres, aunque puede presentarse en hombres, la proporción es de 1 caso por 150 mujeres (Beltrán, 2010).

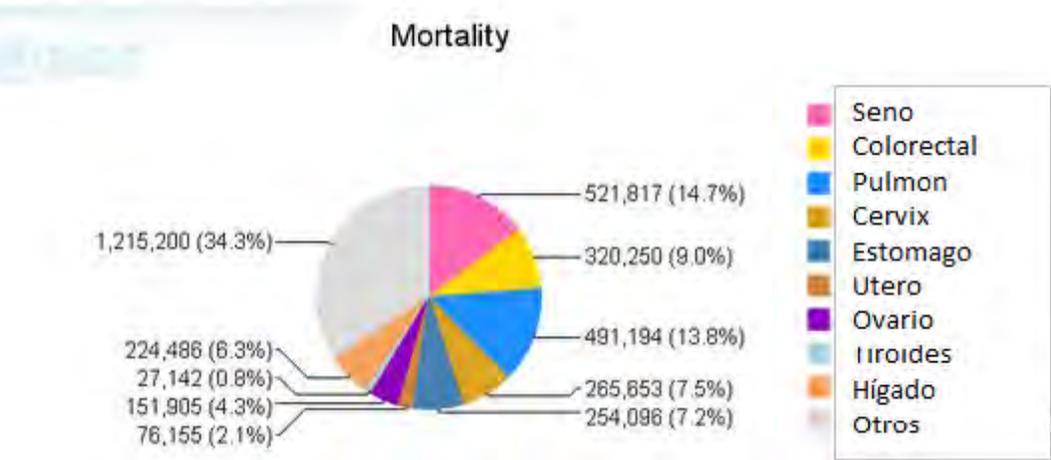
De acuerdo al informe de la *International Agency for Research on Cancer* (IARC), en el año 2012, se diagnosticaron 1.67 millones de nuevos casos, representando el 25 % de los cánceres en las mujeres. El número de casos fue casi igual en los países desarrollados que en las que vivían en países en desarrollo, 794,000 en los

primeros y de 883,000 en los segundos. Sin embargo, es de hacer notar que la población en los primeros países se calculó en 1 billón y en los segundos de 6 billones, de acuerdo a cifras del Banco Mundial en el 2006.

El cáncer de mama es la quinta causa de muerte de manera general (522 mil muertes), manteniendo el primer lugar como causa de muerte entre las mujeres con cáncer (IARC, 2012).



Gráfica. 1 - Distribución de la incidencia de casos de cáncer a nivel mundial en mujeres (Rishendran et al. 2013).



Gráfica. 2 - Distribución de la mortalidad por cáncer a nivel mundial en mujeres (Rishendran et al. 2013).

El síntoma más común del cáncer de seno es una nueva masa o protuberancia. Una masa no dolorosa, dura y con bordes irregulares tiene más probabilidades de ser cáncer, aunque los tumores cancerosos del seno pueden ser sensibles a la palpación, blandos y de forma redondeada. Incluso pueden causar dolor. Por este motivo, es importante que un médico con experiencia en las enfermedades de los senos examine cualquier masa o protuberancia nueva, o cualquier cambio en los senos (ACS, 2016).

Otras posibles señales de cáncer de seno incluyen las siguientes:

- Hinchazón de parte o de todo el seno (aunque no se sienta una protuberancia definida).
- Irritación o hendiduras en la piel.
- Dolor en el seno o en el pezón.
- Retracción (contracción) de los pezones.
- Enrojecimiento, descamación o engrosamiento de la piel del seno o del pezón.
- Secreción del pezón que no sea leche materna.

6.1 Factores de riesgo

Estudios observacionales han permitido identificar estos factores (Tabla 3) y estimar la magnitud del riesgo asociado a ellos. Se han clasificado en factores de riesgo mayores aquellos que aumentan en 2 o más veces el riesgo y factores de riesgo menores los que aumentan en menos de 2 veces el riesgo (Peralta et al., 2010).

Tabla. 3- Factores de riesgo mayores y menores para la incidencia de cáncer de mama.

FACTORES DE RIESGO MAYORES	FACTORES DE RIESGO MENORES
Portadores de mutaciones de alta penetrancia en los genes BRCA1 y BRCA2, además de otras mutaciones en otros genes, aún desconocidos.	Edad. Como factor aislado es muy importante en el riesgo de cáncer de mama. A mayor edad, mayor riesgo. La incidencia de cáncer de mama a los 80-85 años es 15 veces más alta que a los 30-35 años. En estudios de prevención se considera alto riesgo a partir de los 60 años.
Historia familiar: Familiares de 1° o 2° grado con cáncer de mama bilateral; cáncer mamario antes de los 50 años sin mutaciones demostradas; familiares con cáncer de mama en dos generaciones; cáncer de mama y ovario; familiar varón con cáncer de mama. Se recomienda investigar la historia familiar de cáncer en tres generaciones sucesivas.	Historia familiar en parientes de 1°, 2° o 3° grado, después de los 60 años de edad.
Radioterapia de tórax antes de los 30 años de edad por cáncer, usualmente de origen linfático.	Factores reproductivos. 1) Menarquia precoz y menopausia tardía. Ello conlleva a una mayor exposición a ciclos menstruales durante la vida de la mujer lo que aumenta en alrededor de 30% el riesgo de cáncer de mama. Por la misma razón, la ooforectomía bilateral antes de los 40 años disminuye el riesgo en aproximadamente 50%. 2) Nuliparidad y 1° parto después de los 30 años se asocia con aumento del riesgo en un tercio.
Antecedentes de lesiones histológicas precursoras: hiperplasias atípicas, neoplasia lobulillar in situ, atipia plana.	Enfermedades mamarias benignas proliferativas: adenosis esclerosante, lesiones esclerosantes radiales y complejas (cicatriz radiada), hiperplasia epitelial ductal florida, lesiones papilares y fibroadenomas complejos.
Antecedente personal de cáncer de mama. En mujeres mayores de 40 años con antecedente personal de cáncer de mama, el riesgo relativo de un nuevo cáncer fluctúa entre 1.7 y 4.5. Si la mujer es menor de 40 años el riesgo relativo se eleva a 8.0	Sobrepeso después de la menopausia: existe relación entre Índice Masa Corporal (IMC) elevado y riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas. El riesgo relativo es 1.26 con IMC sobre 21.

6.2 Tratamiento

Existen diferentes tratamientos disponibles para los pacientes de cáncer de mama. Algunos son estándar (el tratamiento que se usa actualmente) y otros se encuentran en evaluación en ensayos clínicos.

Un ensayo clínico de tratamientos es un estudio de investigación que procura mejorar los tratamientos actuales u obtener información sobre tratamientos nuevos para pacientes de cáncer. Los pacientes deberían considerar participar en ensayos clínicos debido a la posibilidad de que estos tengan mejores resultados que los tratamientos convencionales. Algunos ensayos clínicos están abiertos solo para pacientes que no han comenzado un tratamiento. Actualmente se usan 6 tipos de tratamiento estándar (INC, 2014):

- Cirugía: La mayoría de las pacientes de cáncer de mama se someten a cirugía a fin de extirpar el cáncer de la mama. Habitualmente se extirpan algunos de los ganglios linfáticos de abajo del brazo y se observan al microscopio para verificar si contienen células cancerosas (INC, 2014).
- Biopsia del ganglio linfático centinela seguida de cirugía: La biopsia del ganglio centinela es un nuevo componente del tratamiento quirúrgico del cáncer de mama, que pronostica con precisión el estatus axilar. El ganglio linfático centinela es el primer ganglio linfático donde es posible que el cáncer se disemine desde el tumor. Se inyecta una sustancia radiactiva o un tinte azul cerca del tumor. La sustancia o el tinte fluyen a través de los conductos linfáticos hasta los ganglios linfáticos. Se extrae el primer ganglio completo o parte de este que recibe la sustancia o el tinte. Un patólogo observa el tejido al microscopio para verificar si hay células cancerosas. Cuando no se detectan células cancerosas, puede no ser necesario extraer más ganglios linfáticos. Después de la biopsia del ganglio linfático centinela, el cirujano extirpa el tumor (cirugía para conservar la mama o mastectomía) (INC, 2014).

- Radioterapia: Después de la cirugía, la radioterapia puede disminuir la posibilidad de que el cáncer vuelva a la mama y aumentar la supervivencia. La radioterapia utiliza partículas u ondas de alta energía, tales como los rayos X, rayos gamma, rayos de electrones o de protones, para eliminar o dañar las células cancerosas. En la mayoría de los casos, la radioterapia es un tratamiento de aplicación local, la cual sólo afecta la parte del cuerpo tratada al ser dirigida sobre ésta solamente. El objetivo del tratamiento con radiación es atacar a las células cancerosas, ocasionando el menor daño posible a las células sanas adyacentes. Sin embargo, al no ser específica a tejidos cancerosos pueden generar una serie de efectos secundarios que incluyen cansancio, problemas de piel, falta de apetito, caída de pelo, entre otros (ACS, 2015).
- Quimioterapia: La quimioterapia es un tratamiento contra el cáncer en el que se usan medicamentos para interrumpir el crecimiento de las células cancerosas, ya sea mediante su destrucción o impidiendo su multiplicación. Cuando la quimioterapia se administra por boca o se inyecta en una vena o músculo, los medicamentos ingresan en el torrente sanguíneo y afectan a células cancerosas de todo el cuerpo (quimioterapia sistémica). Cuando la quimioterapia se coloca directamente en el líquido cefalorraquídeo, un órgano o una cavidad corporal como el abdomen, los medicamentos afectan principalmente las células cancerosas de esas áreas (quimioterapia regional). La forma en que se administre la quimioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que se está tratando (INC, 2014).
- Hormonoterapia: La hormonoterapia son un conjunto de medidas dirigidas a anular la función de las hormonas (SEOM, 2015).

- **Terapia dirigida:** La terapia dirigida es un tratamiento que apunta a los genes o las proteínas específicos de un tumor, o a las condiciones del tejido que contribuyen al crecimiento y la supervivencia del cáncer. Incluyen a los anticuerpos monoclonales, terapia génica con vectores virales. Inhibidores de la angiogénesis, moduladores de la expresión de genes, inductores de la apoptosis, entre otros. Este tipo de tratamiento inhibe la proliferación y diseminación de las células cancerosas, y, a la vez, limita el daño a las células normales, lo que habitualmente produce menos efectos secundarios en comparación con otros medicamentos para el cáncer. Estudios recientes demuestran que no todos los tumores tienen los mismos blancos. Para determinar cuál es el tratamiento más eficaz, su médico puede realizar estudios para identificar los genes, las proteínas y otros factores en el tumor. Como resultado, los médicos pueden encontrar el tratamiento más eficaz que mejor se adapte a cada paciente, siempre que sea posible. Además, se están realizando muchos estudios de investigación para obtener más información sobre blancos moleculares específicos y tratamientos nuevos dirigidos a ellos (INC, 2014):

7. *Ruta graveolens*



Reino	<i>Plantae</i>
Phylum	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Sapindales</i>
Familia	<i>Rutaceae</i>
Género	<i>Ruta</i>
Epíteto específico	<i>Graveolens</i>
Nombre Científico	<i>Ruta graveolens</i>

Figura. 7 - Morfología de *Ruta graveolens*. Universidad Nacional Autónoma de México (2009). Instituto de Biología. Colecciones Biológicas

7.1 Sinonimia popular

- Chiapas: lula (tzeltal / tzotzil), lula wamal, luta (tzeltal), lura (tzotzil)
- Estado de México: lotav, lotta (mazahua)
- Michoacán: akuitse uarhírakua.

7.2 Descripción botánica

Ruta graveolens (Figura. 7) pertenece a la familia de las rutáceas que comprende 161 géneros y unas 1650 especies cosmopolitas, especialmente de ambientes tropicales. El género *Ruta* incluye siete especies de arbustos muy aromáticos. La ruda es una planta medicinal originaria de la cuenca mediterránea y usada como tal desde tiempos antiguos. Escapa de los huertos donde se cultiva y se torna silvestre,

en bordes de caminos y potreros. Es un arbusto que mide desde 60 cm hasta un metro de altura, de base leñosa y ramas blandas, de color verde blanquecino. Sus hojas están muy divididas en segmentos ovalados, la cara superior es verde amarillenta y la inferior es verde azulada y contienen abundantes aceites esenciales de olor muy característico y sabor amargo. Las flores, de ocho a diez mm de diámetro están dispuestas en cimas terminales. La corola tiene cuatro o cinco pétalos amarillos, convexos, de borde finamente recortado, de alrededor de medio centímetro de largo. Las hojas de la flor son cóncavas, dentadas en los bordes o lisas, de color puro amarillo en el interior y amarillo verdoso exteriormente. Despide un intenso olor nauseabundo. Floración: agosto a noviembre. El fruto es una cápsula que contiene semillas lisas, negras. Se cultiva en huertas y jardines, en terrenos bien soleados y pedregosos. Se recolecta durante su floración (Torres, 2002).

7.3 Farmacología

Se ha mostrado la actividad antihelmíntica que posee el extracto etéreo de las hojas sobre *Strongyloide stercoralis*, *Artcylostoma caninum* y *A. duodenale*, y el aceite esencial sobre *Ascaris suilla*, *Hirudo medicinalis*, *Tubifex riuolorum* y *Anguillula aceti*. En un sistema de tejido aislado se ha comprobado el efecto estimulante sobre el útero de coneja normal, preñada y rata preñada por el extracto fluido, sobre el útero de hembra por el extracto acuoso y útero de rata por el aceite esencial. El extracto de diclorometano-metanol obtenido de las ramas, ejerció una acción relajante de músculo liso cuando se probó en íleon de perro. Esta misma acción se observó usando el aceite esencial sobre tejido uterino de perro y sobre tejido de intestino delgado en cuyo y conejo. El extracto etanólico de la planta completa ejerció un efecto de antiimplantación del óvulo fecundado en rata cuando se administró por vía intramuscular a la dosis de 40 y 8mg/kg, al igual que un extracto acuoso por vía oral a la dosis de 1 ml/kg (UNAM, 2009).

La actividad antiespasmódica del aceite esencial se comprobó en intestino delgado de perro en el que se indujeron contracciones con aceite de anís. Del mismo modo

se observó un efecto anticonvulsivo en ratón debido al extracto etanólico de las ramas administrado por vía intraperitoneal en dosis de 2-4ml/kg, cuando se indujeron convulsiones en los animales mediante choques eléctricos supramaximales y por la administración de corazol. Se describe en la literatura la acción antiinflamatoria en rata de un extracto etanólico de las partes floridas por intubación gástrica a la dosis de 100mg/kg probado al inducir edema de la pata con carragenina. Extractos acuosos de las hojas y el aceite esencial ejercieron una actividad antibiótica sobre *Staphylococcus aureus*, sobre *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* sólo el extracto, y sobre *Pseudomona aeruginosa* sólo el aceite. Extractos de la raíz fueron activos sobre *B. subtilis*, *Serratia marcescens* y *Mycobacterium phlei* (UNAM, 2009).

Justificación

El cáncer de mama es el segundo cáncer más común en el mundo y el tipo más frecuente entre las mujeres. La mayoría de las muertes se producen en los países de ingresos bajos y medios, donde la mayoría de las mujeres con cáncer de mama se diagnostican en estadios avanzados debido a la falta de sensibilización sobre la detección oportuna y la falta de acceso a los servicios de salud.

La mayoría de los fármacos citotóxicos que se usan en los tratamientos actuales contra el cáncer no distinguen las células y tejidos sanos respecto a otros afectados por tumores, lo que provocan en los primeros una serie de efectos secundarios que pueden ser leves, severos o potencialmente mortales. Las lectinas vegetales han mostrado tener alta selectividad citotóxica a las células cancerígenas debido a que ejercen un efecto modulador en la síntesis de proteínas e inductor de la apoptosis celular en células tumorales.

Debido a esto es importante estudiar el efecto de las lectinas de *Ruta graveolens* para contar con alternativas más eficaces y económicas como tratamiento de cáncer de mama.

Hipótesis

Las lectinas presentan una alta selectividad y actividad citotóxica hacia las células cancerígenas. Se ha relacionado el cáncer a concentraciones elevadas de radicales libres, por lo tanto, se observará una disminución significativa en los niveles de estrés oxidativo (marcadores de estrés) en el modelo murino de cáncer de mama que ha recibido el tratamiento vía oral de lectinas de tallo de *Ruta graveolens*. La eficiencia de este tratamiento dependerá del tipo de lectina (afinidad a un carbohidrato específico) que se utilice

Objetivo general:

- Evaluar la actividad antioxidante de fracciones de lectinas extraídas de tallo de *Ruta graveolens* con diferente afinidad a carbohidratos y selectividad hacia células tumorales en un modelo murino de cáncer.

Objetivos particulares:

- Extraer lectinas de tallo de *Ruta graveolens* por el método de *Salting Out*, utilizando dos concentraciones (0.05 M y 2.5 M de NaCl) y evaluar su rendimiento.
- Realizar la semipurificación de los extractos de *Ruta graveolens*.
- Cuantificar carbohidratos totales, carbohidratos reductores y proteínas a lo largo de los procesos de semipurificación de los extractos de lectinas de *Ruta graveolens*.
- Evaluar la actividad hemaglutinante de los extractos enriquecidos de lectinas de *Ruta graveolens* en eritrocitos humanos
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos enriquecidos en un sistema *in vivo* de cáncer de mama mediante la cuantificación de Catalasa, Malondialdehído y Nitritos.

Método

1. Obtención del material vegetal

Los organismos vegetales fueron comprados en el Mercado *Madreselva* que se encuentra en la Calle Madre Selva, entre la Carretera Xochimilco Tulyehualco y Camino a Nativitas (Figura. 8) y determinados en el herbario de FES Zaragoza. El tallo fue separado del resto del organismo, pesado y lavado en dos grupos de 200 gr cada uno.

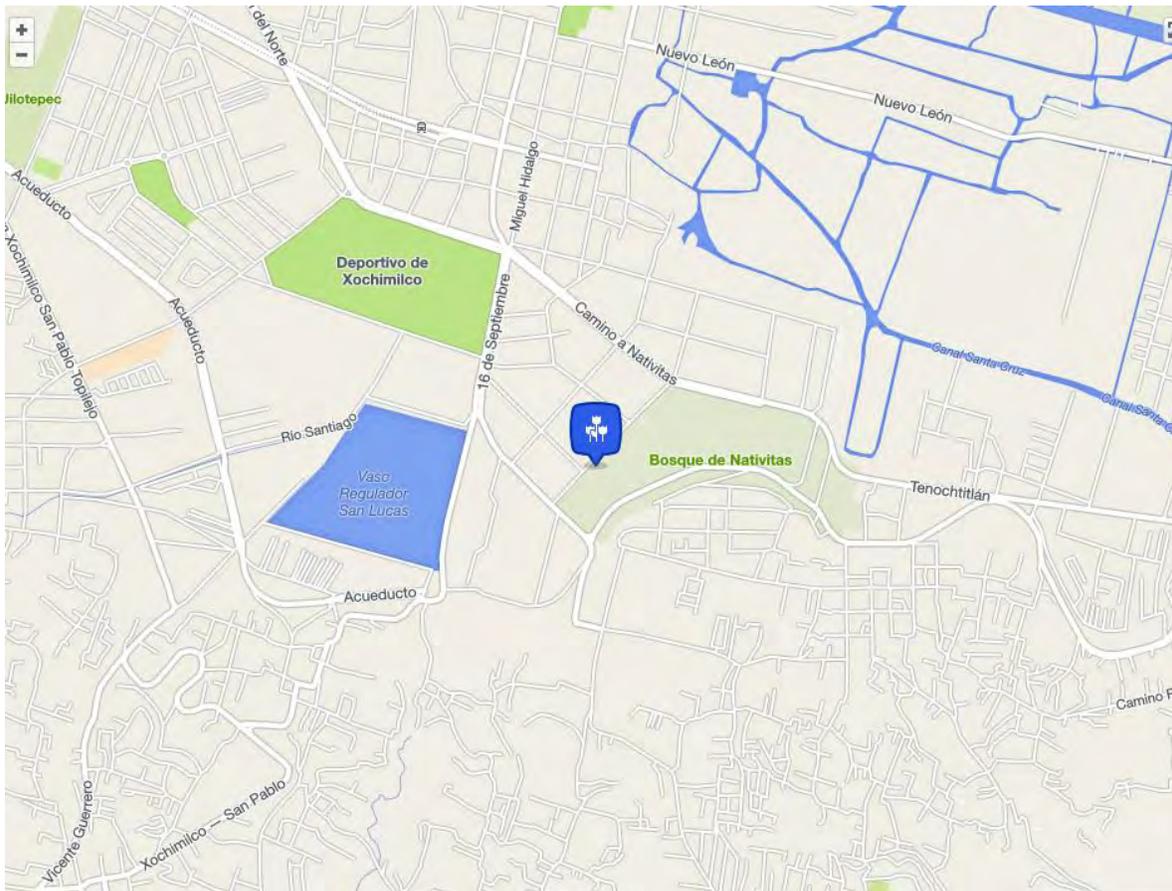


Figura. 8 – Ubicación del Mercado Madreselva: Madreselva Loc. 3, Sección Bosque, Xochimilco, Xaltocan, 16090 Ciudad de México, D.F.

2. Precipitación de proteínas por *Salting Out*

La extracción salina se realizó con dos grupos de tallo de *Ruta graveolens* para ser macerados en frío con una solución de NaCl al 2.5 M y 0.15 M para cada grupo respectivamente, en una relación 1:3 m/v. Se deja reposar durante 24 horas en frío. Este procedimiento se basa en el principio de que grandes cantidades de una sal agregada a una solución de proteínas, disminuye la interacción proteína-H₂O porque quita la capa de solvatación, predominando la interacción proteína-proteína y generando la precipitación de las mismas (UNQ, 2010).

Se pasó entonces al proceso de filtración que se divide en dos etapas. La primera se realizó con ayuda de gasas y un embudo de vidrio para quitar la mayor cantidad de material vegetal y así hacer más sencillo el segundo proceso de filtración, el cual consiste en una filtración al vacío de cada uno de los extractos. Se realizó después dos procesos de centrifugación, cada uno a 3000 rpm con el fin de separar el extracto del precipitado del material vegetal sobrante que se precipitó. El sobrenadante de los extractos se almacenó en frío.

3. Purificación por diálisis

Para la purificación de lectinas se utilizaron membranas semipermeables de 3kDa (*Dialysis tubing*) en la técnica de diálisis, usando agua desionizada y la cual se basa en el proceso de difusión simple. En este caso separando los iones salinos del resto de los extractos proteicos. El proceso normal de diálisis dura en este caso de entre 3 a 5 días. Antes de almacenar el dializado se realizó una prueba para comprobar que los iones salinos han sido removidos del extracto mediante este proceso. Para esto se tomaron 100 µl del extracto dializado y se mezclaron con 100 µl de AgNO₃ 0.1N que en presencia de sales forma el cloruro de plata y se observaría una coloración lechosa. Si esta no se presentaba se almacenaba y se guardaba en refrigeración.

4. Obtención de proteínas tipo lectina mediante Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad se basa en la interacción, específica y reversible, que se presenta entre una partícula de interés (llamada genéricamente “afinante”) con alguna molécula particular que va a ser inmovilizada en un soporte sólido (a esta partícula se le conoce como “ligando”). La interacción de estas dos moléculas es similar a la que se presenta entre una enzima y su sustrato. (Carbajal, 2004).

Se preparó la columna con Sílica G-60 en una bureta de 25 ml hasta la marca de 5 ml. Se adicionaron los extractos dializados (2.5 M y 0.15M) con cuidado de no impactar con demasiada fuerza sobre la sílica y se dejó que todo éste pasara al final de la columna, colectándolo en un recipiente limpio y manteniendo a las proteínas retenidas dentro de la columna.

Con la finalidad de evaluar la afinidad diferencial azúcares de las proteínas contenidas en el extracto dializado, se realizó la elución con 50 ml de diferentes soluciones 0.1 M de los siguientes azúcares:

- Arabinosa
- Fructuosa
- Glucosa
- Lactosa
- Maltosa
- Galactosa
- Sorbitol
- Manitol
- Sacarosa.

5. Cuantificación de proteínas, Carbohidratos totales y carbohidratos reductores

Se usaron los extractos crudos y dializados en todas las cuantificaciones, así como las fracciones proteicas producto de la cromatografía de afinidad.

5.1. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas de los extractos se realizó mediante el método de Biuret, mediante la mezcla de 0.5 ml de extracto con 0.5 ml de agua desionizada para después adicionar 2 ml de reactivo de Biuret. Se dejó reposar durante 15 minutos para medir su absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro.

Se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico (Figura. 9). Cu^{2+} se acompleja con 4 NH. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren (Reyes y Galván, 2008).

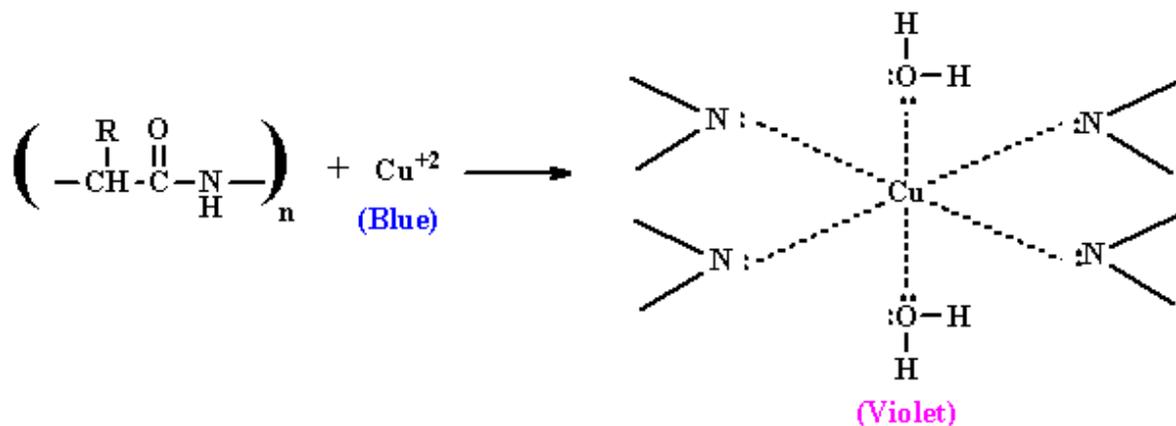


Figura. 9 – Formación del complejo coloreado en la Reacción de Biuret debido a la unión del Cu^{2+} y los grupos NH (Sundin, 2005).

Se utilizó una curva patrón de albumina de huevo (0 -10mg/ml)

5.2. Cuantificación de carbohidratos

La cuantificación de carbohidratos totales se realizó con el método del fenol/ácido sulfúrico. Se mezclaron 0.99 ml de agua y 0.01 ml de los extractos crudos y dializados. Posteriormente se agregó 0.6 ml de fenol y 3 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Se fundamenta en que los azúcares se deshidratan al reaccionar con ácidos fuertes, originando furfurales que se condensan cuando reaccionan con fenol (Figura. 10) dando un compuesto de color naranja amarillo muy estable, el cual varía su intensidad proporcional a la cantidad total de azúcares presentes al aumentar la concentración del compuesto coloreado (Suárez y Orozco, 2014).

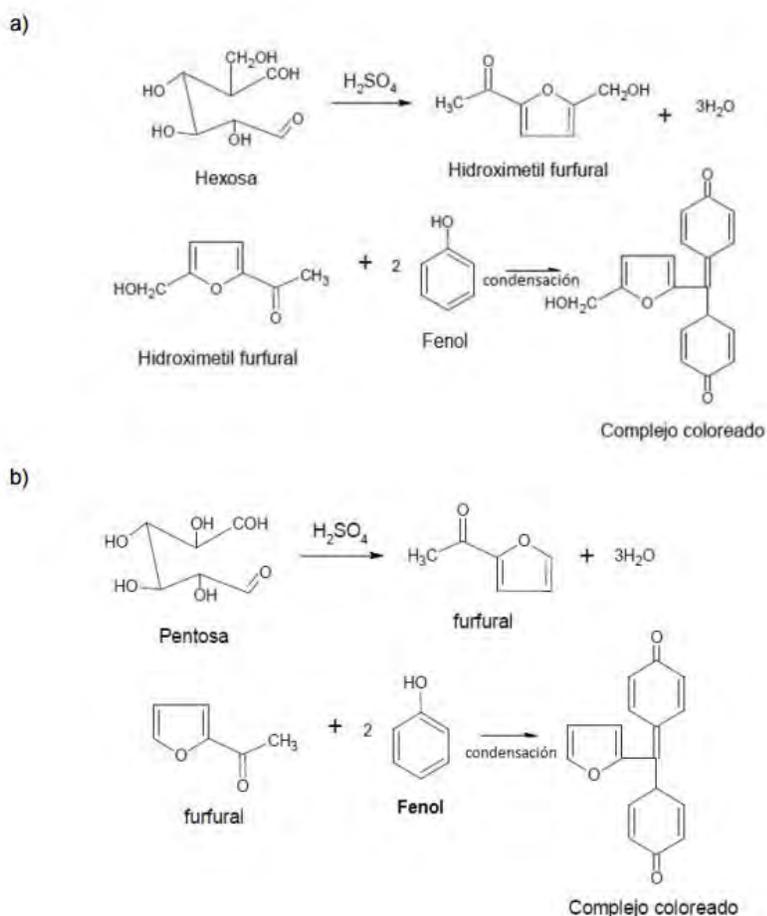


Figura. 10 –Formación del complejo coloreado debido a la reacción entre el fenol y el furfural que se forma por la presencia de carbohidratos, a) hexosa y b) pentosa, que se encuentran en medio ácido (Suárez y Orozco, 2014).

Se dejó reposar hasta que la solución problema tuviera una temperatura ambiente y se midió su absorbancia en el espectrofotómetro a 480 nm. El resultado de la absorbancia de cada extracto se extrapolo a una curva patrón de glucosa con base a una solución stock de 100 µg/ml.

5.3 Método del ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS)

Para la cuantificación de carbohidratos reductores se utilizó el método DNS de Miller. Se adiciono 0.99 ml de agua y 0.01 ml de los extractos con 0,5 ml del reactivo DNS (ácido 3,5 dinitro salicílico).

Se agito y se calentó en un baño María hasta el punto de ebullición por 5 minutos e inmediatamente se detuvo la reacción con baño de agua y hielo. Se reconstituyeron las muestras con 5 ml de agua destilada, se agitaron, se dejaron en reposo por 15 min, y se midió su absorbancia a 540 nm.

Se basa en que los azúcares reductores pueden reducir al DNS bajo determinadas condiciones (Figura. 11). Cuando el DNS es reducido en presencia de calor, por los azúcares reductores que entran en contacto con él se desarrolla un cambio de color parecido al café (con variaciones de amarillo hasta café). El cambio de coloración puede entonces determinarse por lecturas de densidad óptica (Jaramillo, 2014).

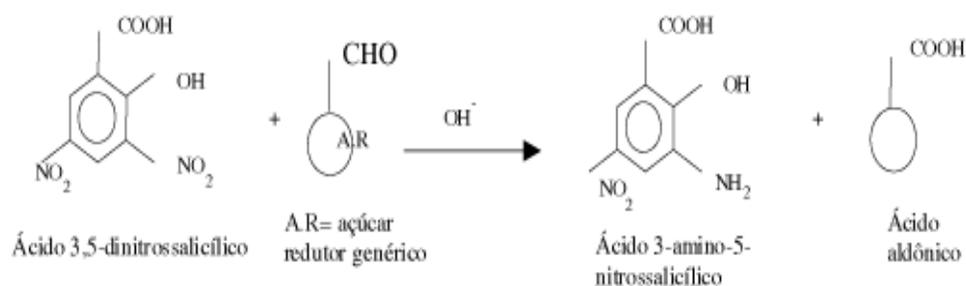


Figura. 11 – Formación del complejo coloreado (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) por la interacción entre el DNS y un azúcar reductor (Casablanca, 2009).

6. Cuantificación de la Hemaglutinación

La aglutinación consiste en la agregación sistemática de células mediada por macromoléculas específica (anticuerpos o lectinas) que reconocen estructuras moleculares determinadas (antígenos) sobre la superficie celular. Este proceso, depende del número de determinantes antigénicos y de su localización sobre la célula, como el tipo de macromolécula y del medio de reacción (Rodríguez et al, 2004).

Cuando las células que se aglutinan son glóbulos rojos (eritrocitos) humanos, el fenómeno se denomina hemaglutinación. La distribución de los ligandos en la superficie de la membrana es diferente para cada aglutinina utilizada, lo cual depende de la afinidad y del sitio de unión específico. A medida que aumenta el poder de unión de la aglutinina, el conjunto toma una forma esférica (Rodríguez et al, 2004).

La mayoría de las lectinas aglutinan eritrocitos de todos los grupos sanguíneos, actuando a la misma dilución y por lo tanto no son específicas de grupo. Las lectinas específicas aglutinan eritrocitos humanos preferentemente de un determinado grupo sanguíneo. Esta especificidad permite usar a las lectinas como reactivo de tipificación de grupo sanguíneo y en la identificación de individuos secretores (Rodríguez et al, 2004).

El sistema ABO fue el primer grupo sanguíneo descubierto. Landsteiner en 1900 descubrió que los glóbulos rojos pueden clasificarse en A, B y O, de acuerdo a la presencia o ausencia de antígenos reactivos en la superficie de los glóbulos rojos. Dichos antígenos son de mucha importancia en transfusión sanguínea, trasplante de tejidos y enfermedad hemolítica del recién nacido. (Arbeláez, 2009).

Estos antígenos están compuestos por azúcares que protruyen de la membrana de la superficie de los eritrocitos, unidos a un componente denominado ceramida, el cual se encuentra en la membrana de los eritrocitos. Una serie de cuatro azúcares se une a la ceramida. A esta estructura de cuatro azúcares o sustancia precursora, se le unen otros azúcares que le dan la especificidad a cada antígeno ABO (Arbeláez, 2009).

Se realizaron los ensayos de hemaglutinación con el fin de comprobar la presencia y actividad biológica de las lectinas en los extractos (crudos y dializados) y las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad.

La extracción sanguínea se realizó con los grupos sanguíneos A+,B+ y O+ obtenidos de donantes voluntarios, con ayuda de un equipo básico de venopunción (Soportes de aguja y de Tubos BD Vacutainer® con EDTA-K₂ de 4.0 ml) para toma de muestra sanguínea. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 4000 rpm por 20 min. Se desecha el sobrenadante (plasma) y el precipitado (concentrado de eritrocitos) se resuspendió en una solución de PBS 1X. Este procedimiento se repite 2 veces más. Se tomaran 1.5ml de eritrocitos de las muestras y se suspenden en 50 ml de PBS para almacenarlas a 6°C.

Para los extractos crudos y dializados, se realizaron las pruebas de hemaglutinación en microplacas de 1ml por pozo, siendo que para las muestras problema 50, 25 y 12.5 µl de los diferentes extractos para posteriormente completar a un 1 ml con cada uno de los grupos sanguíneos, tomando en cuenta cada una de las concentraciones de los extractos con los grupos sanguíneos.

En el caso de las fracciones proteicas obtenidas de la cromatografía de afinidad, el ensayo de hemaglutinación se realizó a dos diferentes concentraciones (0.16 y 0.8

µg/ µl) con el fin de observarlos diferentes grados de afinidad de las lectinas de *Ruta graveolens* a los diferentes tipos de sangre y así poder comparar su actividad aglutinante.

7. Diseño biológico experimental

Se utilizaron ratones hembra de 30 días de edad de la cepa CD-1 mantenidos en 9 grupos con 6 ratones cada uno.

Se registró su peso de forma semanal durante todo el periodo de incubación. Desde el destete al fin del tratamiento, los ratones se mantuvieron en condiciones de bioterio, con agua y comida *ad libitum*.

7.1 Inducción cancerígena

Se realizó la inducción cancerígena mediante la inyección de 10 mg óxido de níquel disueltos en 0.05 ml de aceite de oliva vía intradérmica en la mama izquierda superior, dejando pasar un periodo de incubación de 3 meses, iniciando el 23 de enero del 2016 y acabando el 27 de abril del mismo año (NTP, 2014).

Los compuestos de níquel son conocidos por ser agentes cancerígenos en los organismos animales. Los resultados combinados de los estudios epidemiológicos, sobre el mecanismo y cancerígenos en roedores apoyan además el concepto de que los compuestos de níquel generan iones que atacan células diana en los sitios críticos para la carcinogénesis (NTP, 2014).

Se buscó la presencia de pequeños tumores adheridos a la epidermis cercana a la mama para la confirmación del modelo murino.

7.2 Tratamiento

Posterior a la inducción cancerígena se inició un tratamiento de lectinas extraídas de *Ruta graveolens* que duro 15 días iniciando el 27 de abril (Torres, 2015) Las fracciones enriquecidas de lectinas fueron seleccionadas dependiendo de la eficiencia en la actividad hemaglutinante dentro de los ensayos sanguíneos. Se administraron a los grupos siguiendo la pauta establecida por la Tabla. 4.

Tabla. 1 – Diseño de los Grupos experimentales (inducción y tratamiento).

Grupo	Administración.
Control -	Desarrollo normal sin administrarles nada.
Vehículo	Inyección del vehículo (0.05 ml de aceite de oliva), durante la inducción del cáncer.
Control + Óxido de níquel (O.N.)	Óxido de níquel vía intradermal
O.N. + Primer tratamiento	Óxido de níquel vía intradermal Tratamiento con fracción proteica asociada con Fructuosa obtenida a partir de una extracción salina al 2.5 M .Se administró vía oral 1mg de proteína tipo lectina a lo largo de 15 días que duro el tratamiento
O.N + Segundo tratamiento	Óxido de níquel vía intradermal Tratamiento con fracción proteica asociada con Arabinosa obtenida a partir de una extracción salina al 0.15M.Se administró vía oral 1mg de proteína tipo lectina a lo largo de 15 días que duro el tratamiento

O.N. + Tercer tratamiento	<p>Óxido de níquel vía intradermal</p> <p>Tratamiento con fracción proteica asociada con Glucosa obtenida a partir de una extracción salina al 2.5 M .Se administró vía oral 1mg de proteína tipo lectina a lo largo de 15 días que duro el tratamiento</p>
O.N. + Cuarto tratamiento	<p>Óxido de níquel vía intradermal</p> <p>Tratamiento con fracción proteica asociada con Glucosa obtenida a partir de una extracción salina al 0.15M .Se administró vía oral 1mg de proteína tipo lectina a lo largo de 15 días que duro el tratamiento</p>
O.N. + Quinto tratamiento	<p>Óxido de níquel vía intradermal</p> <p>Tratamiento con fracción proteica asociada con Sorbitol obtenida a partir de una extracción salina al 2.5 M .Se administró vía oral 1mg de proteína tipo lectina a lo largo de 15 días que duro el tratamiento</p>
O.N. + Sexto tratamiento	<p>Óxido de níquel vía intradermal</p> <p>Tratamiento con fracción proteica asociada con Sorbitol obtenida a partir de una extracción salina al 0.15M.Se administró vía oral 1mg de proteína tipo lectina a lo largo de 15 días que duro el tratamiento</p>

7.3 Obtención del plasma sanguíneo

Para la obtención del plasma sanguíneo, los ratones fueron autopsiados por decapitación. Se colectó la sangre del tronco en Tubos BD Vacutainer® con EDTA-K₂ de 4.0 ml que se centrifugaron a 4000 rpm para después extraer el plasma. Se mantuvo en frío (6°C) las muestras hasta su posterior cuantificación de Catalasa, Nitritos y Peroxidación lipídica.

7.4 Preparación del hígado

Con mucho cuidado se extirpo el hígado de los ratones y se mantuvieron en frío sumergidos en solución fisiológica. Se perfundió con solución fisiológica cada hígado con solución fisiológica para eliminar todos los rastros de sangre dentro del hígado.

Se realizó entonces la maceración del material hepático en morteros de porcelana y mientras se agregaba amortiguador de homogenización en una proporción 5:1 con el material hepático. Este macerado se pasó a un proceso de filtración por gaza para eliminar rastro de material sólido.

Se centrifugo a 4000 rpm, separando el sobrenadante y manteniendo en frío las muestras hasta la cuantificación de Catalasa, Nitritos y Peroxidación lipídica.

7.5 Cuantificación de catalasa

La catalasa es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano, aunque su actividad varía en dependencia del tejido; ésta resulta más elevada en el hígado y los riñones, más baja en el tejido conectivo y los epitelios, y prácticamente nula en el tejido nervioso. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol (Céspedes et al., 1996)

Esta enzima es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular se encuentra en el rango de 210-280 kD. Consta de 4 subunidades idénticas que se mantienen

unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX y el contenido protohémico y el de hierro representan un 1,1 % y 0,09 % respectivamente del peso molecular total de la enzima (Céspedes et al., 1996)

La catalasa protege la hemoglobina del peróxido de hidrogeno que se genera en los eritrocitos. También tiene un papel de protección en la inflamación, en la prevención de mutaciones, evita el envejecimiento y cierto tipo de cáncer (Pérez, 2015).

En la reacción de la catalasa se presenta la transferencia de dos electrones entre dos moléculas de peróxido de hidrógeno en la cual una funciona como donador y otra como aceptor de electrones. El mecanismo de reacción se lleva a cabo en dos pasos. En el primero la catalasa se oxida por una molécula de peróxido, el cual forma un intermediario llamado compuesto I. El compuesto I se caracteriza por tener un grupo ferroxilo y un radical catiónico de porfirina. En esta reacción se produce una molécula de agua. En el segundo paso de la reacción, el compuesto I es reducido por otra molécula de peróxido, regresando la catalasa a su estado inicial y produciendo agua y dióxígeno (Pérez, 2015).



Para la cuantificación se utilizó peróxido de hidrógeno 30mM en PBS.

En una celda de cuarzo se colocaron 3000 ml de la solución de peróxido de hidrogeno y se agregaron 15 µl de muestra (plasma o preparado hepático), resuspendiendo y leyendo su absorbancia inmediatamente en el espectrofotometro UV. La desaparición del sustrato (H₂O₂) se mide espectrofotométricamente a 240 nm.

Se registró la absorbancia al principio y cada quince segundo hasta llegar a los 75 segundos. Se graficaron los resultados y se utilizó la pendiente de la recta para la cuantificación de catalasa junto a la siguiente fórmula:

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

En dónde; ϵ es el coeficiente de extinción molar del H₂O₂ a 240 nm (37.36 μmol^{-1} mL Abs);

FD es el factor de dilución (3015/15= 61).

7.6 Cuantificación de nitritos

El Óxido Nítrico (NO) es un gas soluble, sintetizado de la L-arginina a través de la acción catalizadora de la NO sintetasa y liberado por el endotelio vascular y otros tejidos. Por su naturaleza gaseosa, actúa como un soluto no cargado en la mayoría de los procesos biológicos; y como radical libre, que es, exhibe una vida media de segundos, siendo capaz de combinarse con rapidez a otros radicales libres. Las principales vías metabólicas del NO incluyen, la oxidación a nitrato por la oxihemoglobina en los glóbulos rojos, y la autooxidación a nitrito; nitratos y nitritos circulan en la sangre y son excretados por la orina (Silva et al, 2008).

Las concentraciones de NO en el cuerpo varían dependiendo de cada tejido o compartimiento que se considere y de la actividad de la NO sintetasa; su producción endógena juega un importante papel en la homeostasis vascular, neurotransmisión y mecanismos de defensa inmunológicos; sin embargo, su cuantificación directa en líquidos biológicos es difícil por la naturaleza muy reactiva de la molécula. La concentración de los metabolitos del NO en plasma, suero y orina pueden ser considerados como concentraciones de NO en humanos, puesto que, los nitritos circulantes reflejan la actividad de la NO sintetasa endotelial constitutiva; y los nitratos excretados indican la producción sistémica de NO; por lo que, las

concentraciones de nitritos en plasma son el resultado de la formación y el consumo del NO (Silva et al, 2008).

El valor de NO (μM) fue obtenido a través del análisis de estas muestras con la Reacción de Griess, la cual se basa en una reacción química que utiliza sulfanilamida y N-1-naftiletilendiamina (NED) bajo condiciones ácidas.

Para la cuantificación se tomó 100 μL muestra de plasma o de preparado hepático completado a 1ml con agua desionizada. Se añadió después 1ml de Sulfanilamida al 5%, manteniéndolo e la oscuridad durante 25 minutos. Se añadió el NED y se mantuvo en la oscuridad durante otros 15 min. Las muestras fueron leídas a 540 nm.

Se utilizó una curva patrón con concentración de 0 a 100 μM de nitrito de sodio mediante la extrapolación de la absorbancia obtenida de las muestras.

7.7 Cuantificación de peroxidación lipídica

El malondialdehído ha sido ampliamente utilizado como un biomarcador para la peroxidación lipídica de ácidos grasos omega-3 y omega-6 debido a su fácil reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA). La prueba TBA se basa en la reacción de TBA con malondialdehído (MDA) para producir un cromógeno intensamente coloreado (rojo fluorescente). Debido a que el MDA es uno de los marcadores más populares y fiables para determinar el estrés oxidativo en situaciones clínicas, y debido a la alta reactividad y toxicidad de la MDA, subyace el hecho de que esta molécula es muy relevante para comunidad de investigación biomédica (Ayala et al., 2014).

Para la cuantificación se tomó 0.1 ml de la muestra de plasma o preparado hepático, y se agregó 0.1 ml de Buffer TRIS-HCL, FeSO_4 y Ácido Ascórbico respectivamente, completándolo después a 1ml con agua desionizada. Se dejó incubar por 15 min a temperatura ambiente ($37\text{ }^\circ\text{C}$)

Se agregó 1ml de Ácido tricloroacético (TCA) y 2 ml de TBA, se cubrieron y calentaron en un baño de aceite hasta alcanzar 100 °C, dejándolos 15 minutos a esa temperatura. Se pasó a centrifugarlos a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se leyó a 532nm. Para obtener la concentración de MDA en las muestras se empleó el coeficiente de extinción molar de dicho compuesto.

8. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos de la cuantificación de catalasa, lipoperoxidación y nitritos fueron analizados por la prueba de análisis de varianza múltiple (ANOVA), seguida de la prueba de Tukey. Se consideraron únicamente aquellas diferencias en las cuales la probabilidad fue menor a 0.05.

Resultados

La extracción se realizó con dos grupos de 200 gr de material vegetal de tallo con el fin de obtener dos extractos bajo el mismo procedimiento (extracción salina), pero con diferentes concentraciones de cloruro de sodio ([] de 2.5 M y 0.15M).

Uno de los puntos principales de este estudio fue la comparación en el rendimiento y efectividad de extractos obtenidos por dos diferentes concentraciones para el *Salting Out* con NaCl: 2.5 M y 0.15M, que en lo sucesivo se mencionara como extracto 1 y 2 respectivamente.

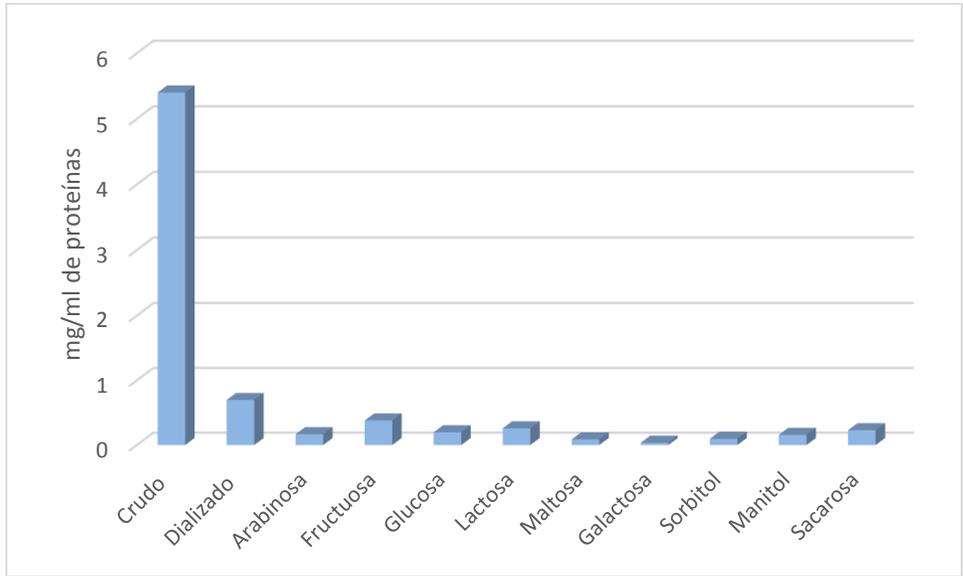
1. Rendimiento

En la Tabla. 5 se observa el rendimiento proteico que se obtuvo a partir del tallo de *Ruta graveolens* a través de los procesos de semipurificación, iniciando con un proceso de *Salting Out* al 2.5 M.

Tabla. 2 - Rendimiento proteico de tallo de *Rufa graveolens* a través de los procesos de semipurificación, iniciando con un proceso de *Salting Out* al 2.5 M.

Extracto	Volumen (ml)	mg/ml de proteínas	Proteínas totales (mg)	%
Crudo	600	5,4	3240	100
Dializado	425	0,696	296	9,13
Fracciones	Volumen (ml)	mg/ml de proteínas	Proteínas totales (mg)	%
Arabinosa	41	0,16700405	6,84716605	0,21133229
Fructuosa	47	0,37955466	17,839069	0,55058855
Glucosa	39	0,19736842	7,69736838	0,2375731
Lactosa	40	0,25809717	10,3238868	0,31863848
Maltosa	41	0,08603239	3,52732799	0,10886815
Galactosa	38	0,0354251	1,3461538	0,04154796
Sorbitol	38	0,09615385	3,6538463	0,11277303
Manitol	42	0,15688259	6,58906878	0,20336632
Sacarosa	40	0,22773279	9,1093116	0,28115159
Total			66,9331987	2,06583947

La concentración de proteínas se vio reducida al pasar por cada proceso de semipurificación. Las fracciones proteicas con concentración más alta en el extracto 1 fueron las de fructuosa, lactosa y sacarosa en ese orden, siendo la de menor concentración la afín a galactosa (Gráfica 3).



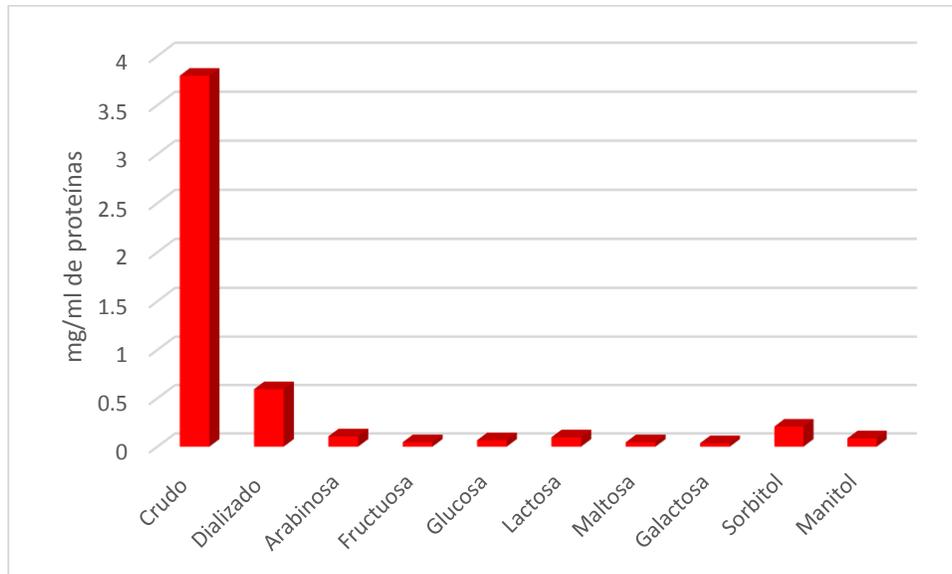
Gráfica. 3 - Concentración de proteínas del extracto crudo y dializado, además de las diferentes fracciones obtenidas a partir de un *Salting Out* al 2.5 M.

En la Tabla. 6 se observa el rendimiento proteico que se obtuvo a partir del tallo de *Ruta graveolens* a través de los procesos de semipurificación, iniciando con un proceso de *Salting Out* al 0.15 M.

Tabla. 3 - Rendimiento proteico de tallo de *Ruta graveolens* a través de los procesos de semipurificación, iniciando con un proceso de *Salting Out* al 0.15M.

Extracto	Volumen (ml)	mg/ml de proteínas	Proteínas totales (mg)	%
Crudo	600	3,8	2280	100
Dializado	440	0,594	261	11,44
Fracciones	Volumen (ml)	mg/ml de proteínas	Proteínas totales (mg)	%
Arabinosa	39	0,1062753	4,1447367	0,1817867
Fructuosa	38	0,04554656	1,73076928	0,07591093
Glucosa	45	0,06578947	2,96052615	0,12984764
Lactosa	43	0,09615385	4,13461555	0,18134279
Maltosa	40	0,04554656	1,8218624	0,07990625
Galactosa	41	0,0354251	1,4524291	0,06370303
Sorbitol	40	0,20748988	8,2995952	0,36401733
Manitol	39	0,08603239	3,35526321	0,14716067
Sacarosa	41	0,07591093	3,11234813	0,1365065
Total			31,0121457	1,36018183

La concentración de proteínas se vio reducida al pasar por cada proceso de semipurificación. Las fracciones con concentración más alta en el extracto 2 fueron las de sorbitol, arabinosa y lactosa en ese orden, siendo la de menor concentración la afín a galactosa (Gráfica 4).



Gráfica. 4 Concentración de proteínas del extracto crudo y dializado, además de las diferentes fracciones obtenidas a partir de un *Salting Out* al 0.15 M.

El rendimiento proteico del extracto 1 fue de 2,066% (66,9331987 mg de proteínas tipo lectina de 3240 mg de proteínas totales del extracto crudo), mientras que el rendimiento del extracto 2 fue de 1,36% (31,0121457 mg de proteínas tipo lectina de 2280 mg de proteínas totales del extracto crudo).

Las diferencia entre las concentración de carbohidratos totales de los extractos es casi nula, siendo 61,9 l y 64.8 mg/L en los extractos crudos 1 y 2 respectivamente, así como en los dializados que son de 6.7 y 4.6 mg/L (Tabla 7 y 8).

Tabla. 4 Concentración de carbohidratos a lo largo de los procesos de semipurificación a partir del tallo de *Ruta graveolens*, iniciando con un proceso de *Salting Out* al 2.5 M.

Extracto	Volumen (L)	mg/L de carbohidratos	Carbohidratos totales (mg)	%
Crudo	0,6	61,9	37,14	100
Dializado	0,425	6,7	2,84	7,66
Fracciones	Volumen (ml)	mg/L de carbohidratos		
Arabinosa	41	No presencia		
Fructuosa	47	No presencia		
Glucosa	39	No presencia		
Lactosa	40	No presencia		
Maltosa	41	No presencia		
Galactosa	38	No presencia		
Sorbitol	38	No presencia		
Manitol	42	No presencia		
Sacarosa	40	No presencia		

Tabla. 5- Concentración de carbohidratos a lo largo de los procesos de semipurificación a partir del tallo de *Ruta graveolens*, iniciando con un proceso de *Salting Out* al 0.15 M.

Extracto	Volumen (L)	mg/L de carbohidratos	Carbohidratos totales (mg)	%
Crudo	0,6	64,8	38,88	100
Dializado	0,440	4,6	2,02	5,2
Fracciones	Volumen (ml)	mg/L de carbohidratos		
Arabinosa	39	No presencia		
Fructuosa	38	No presencia		
Glucosa	45	No presencia		
Lactosa	43	No presencia		
Maltosa	40	No presencia		
Galactosa	41	No presencia		
Sorbitol	40	No presencia		
Manitol	39	No presencia		
Sacarosa	41	No presencia		

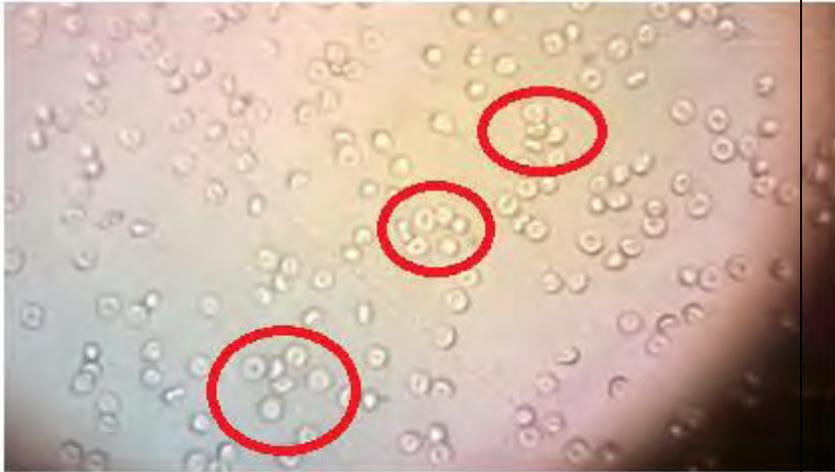
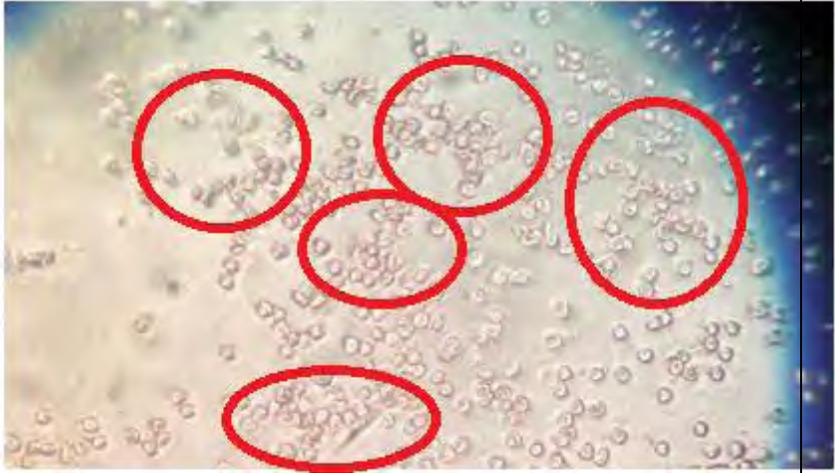
No se encontró presencia de carbohidratos reductores en ninguna de las muestras de los extractos crudos y dializados, incluso subiendo la concentración de la dilución problema usada en el método de DNS.

2. Hemaglutinación en sistema ABO

Para definir los niveles de hemaglutinación en los ensayos se creó la Tabla. 9 que muestra una escala del 1 al 3 que muestra el aumento en el número de conglomerado de eritrocitos así como en su densidad y tamaño

Tabla. 6 – Muestra de los diferentes grados de hemaglutinación y ausencia de esta.

<p>Sin Hemaglutinación:</p> <ul style="list-style-type: none">• Sin presencia de conglomerados <p>Aumento 10x</p>	
<p>Hemaglutinación Grado 1:</p> <ul style="list-style-type: none">• Uno o dos conglomerados por objetivo <p>Aumento 40x</p>	

<p>Hemaglutinación Grado 2</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tres o cuatro conglomerados por objetivo <p>Aumento 40x</p>	
<p>Hemaglutinación Grado 3</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cinco o más conglomerados • Conglomerados visiblemente de mayor tamaño. <p>Aumento 40x</p>	

El ensayo de hemaglutinación se realizó con ambos extractos en estado crudo y dializado y en diluciones 1:2, 1:4 y 1: 8 (50, 25 y 12.5 %) para tener un mililitro como volumen estándar de extracto para la prueba. Una vez preparadas las microplacas con cada uno de los grupos sanguíneos mencionados se dejó reposar durante 20 minutos. Posteriormente se analizó al microscopio la actividad hemaglutinante. En la Tabla 10 y 11 (fotografías) se muestran los resultados preliminares de este ensayo mostrando el grado de hemaglutinación que se presentó.

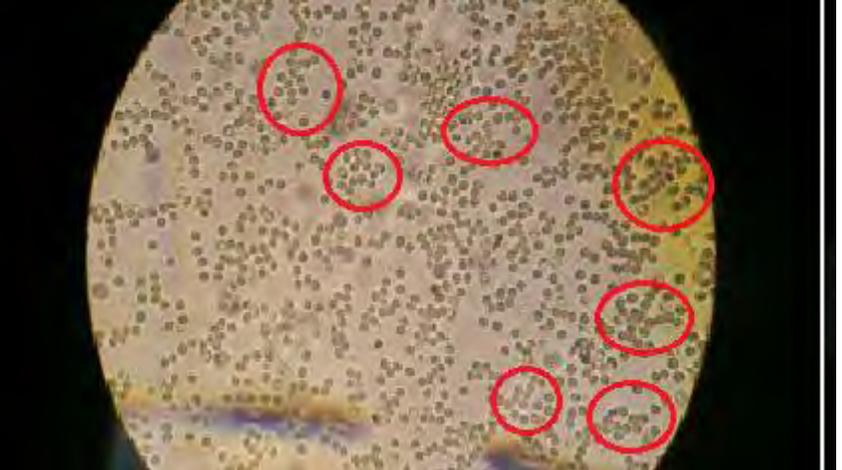
Tabla. 7 - Muestra las reacciones hemaglutinantes positivas por parte de los eritrocitos de los grupos sanguíneos indicados ante las diferentes concentraciones de los extractos indicados en la misma.

Extracto	Concentración del extracto (%)	A+	B+	O+
0.15M Crudo	50%	Grado 1		Grado 1
	25%			
	12.5%			
2.5 M Crudo	50%	Grado 2		
	25%			
	12.5%			
0.15M Dializado	50%	Grado 1		Grado 3
	25%			Grado 3
	12.5%			
2.5 M Dializado	50%		Grado 2	Grado 3
	25%			
	12.5%			

Tabla. 8 - Fotografías comparativas de los distintos grados de hemaglutinación que presentaron los diferentes extractos utilizados en los tipos de sangre A+, B+ y O+.

<ul style="list-style-type: none"> • Extracto Crudo • Extracción: 0.15M • [] usada en el ensayo: 50% • Tipo de sangre A+ • Grado 1 • Aumento 10x 	
---	--

<ul style="list-style-type: none"> • Extracto Crudo • Extracción: 2.5 M • [] usada en el ensayo: 50% • Tipo de sangre A+ • Grado 2 • Aumento 10x 	
<ul style="list-style-type: none"> • Extracto Dializado • Extracción: 0.15M • [] usada en el ensayo: 50% • Tipo de sangre A+ • Grado 1 • Aumento 10x 	
<ul style="list-style-type: none"> • Extracto Dializado • Extracción: 0.15M • [] usada en el ensayo: 50% • Tipo de sangre B+ • Grado 2 • Aumento 10x 	

<ul style="list-style-type: none"> • Extracto Crudo • Extracción: 0.15M • [] usada en el ensayo: 50% • Tipo de sangre O+ • Grado 1 • Aumento 10x 	
<ul style="list-style-type: none"> • Extracto Dializado • Extracción: 0.15M • [] usada en el ensayo: 50% • Tipo de sangre O+ • Grado 3 • Aumento 10x 	
<ul style="list-style-type: none"> • Extracto Dializado • Extracción: 2.5 M • [] usada en el ensayo: 50% • Tipo de sangre O+ • Grado 3 • Aumento 10x 	

En el segundo ensayo de hemaglutinación se utilizaron las fracciones proteicas resultantes de la cromatografía de afinidad de los extractos 1 y 2 a dos diferentes concentraciones (0.16 y 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) con el fin de observarlos diferentes grados de afinidad de las lectinas de *Ruta graveolens* a los diferentes tipos de sangre y así poder comparar su actividad aglutinante.

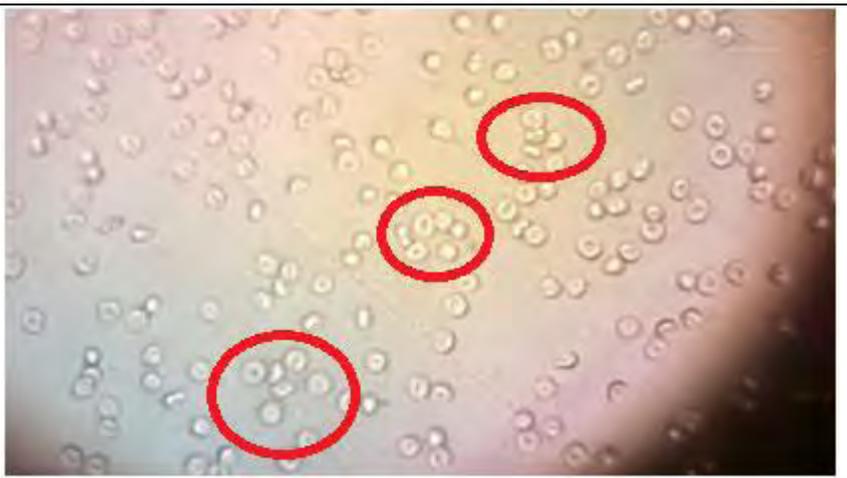
En la Tabla 12 se muestran los diferentes grados de hemaglutinación que se encontraron ensayo, presentándose únicamente en las fracciones de fructuosa, glucosa y Sorbitol. La evidencia fotográfica se muestra en la Tabla 13.

Tabla. 12 - Muestra las reacciones hemaglutinantes positivas por parte de los eritrocitos de los grupos sanguíneos indicados ante las diferentes fracciones proteicas extraídas del tallo *Ruta graveolens* utilizando *Salting Out* al 2.5 M.

	Arabinosa		Fructuosa		Glucosa		Lactosa		Maltosa		Galactosa		Sorbitol		Manitol		Sacarosa	
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.16	0.08	0.16	0.08	0.16	0.08	0.16	0.08	0.16	0.08	0.16	0.08	0.16	0.08	0.16	0.08	0.16	0.08
A+			1	1	2	2							2					
B+			3		1	1							1	1				
O+			1	1	3	3							1					

Tabla. 13 - Fotografías comparativas de los distintos grados de hemaglutinación que presentaron las diferentes fracciones proteicas utilizadas en los tipos de sangre A+, B+ y O+.

<ul style="list-style-type: none"> • Fracción: Fructuosa • Extracción: 2.5 M • [] usada en el ensayo: 0.16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ • Tipo de sangre: A+ • Grado 1 • Aumento 40x 	
---	--

<ul style="list-style-type: none"> • Fracción: Fructuosa • Extracción: 2.5 M • [] usada en el ensayo: 0.16 $\mu/\mu\text{l}$ • Tipo de sangre: B+ • Grado 3 • Aumento 40x 	
<ul style="list-style-type: none"> • Fracción: Fructuosa • Extracción: 2.5 M • [] usada en el ensayo: 0.16 $\mu/\mu\text{l}$ • Tipo de sangre: O+ • Grado 1 • Aumento 40x 	
<ul style="list-style-type: none"> • Fracción: Glucosa • Extracción: 2.5 M • [] usada en el ensayo: 0.16 $\mu/\mu\text{l}$ • Tipo de sangre: A+ • Grado 2 • Aumento 40x 	

<ul style="list-style-type: none"> • Fracción: Glucosa • Extracción: 2.5 M • [] usada en el ensayo: 0.16 $\mu/\mu\text{l}$ • Tipo de sangre: B+ • Grado 1 • Aumento 40x 	
<ul style="list-style-type: none"> • Fracción: Glucosa • Extracción: 2.5 M • [] usada en el ensayo: 0.08 $\mu/\mu\text{l}$ • Tipo de sangre: O+ • Grado 3 • Aumento 40x 	
<ul style="list-style-type: none"> • Fracción: Sorbitol • Extracción: 2.5 M • [] usada en el ensayo: 0.16 $\mu/\mu\text{l}$ • Tipo de sangre: A+ • Grado 2 • Aumento 40x 	



En la Tabla 14 se muestran los diferentes grados de hemaglutinación que se encontraron ensayo, presentándose únicamente en las fracciones de arabinosa, glucosa y sorbitol. La evidencia fotográfica se muestra en la Tabla 15.

Tabla. 14 - Muestra las reacciones hemaglutinantes positivas por parte de los eritrocitos de los grupos sanguíneos indicados ante las diferentes fracciones proteicas extraídas del tallo *Ruta graveolens* utilizando *Salting Out* al 2.5 M.

	Arabinosa		Fructuosa		Glucosa		Lactosa		Maltosa		Galactosa		Sorbitol		Manitol		Sacarosa	
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.16	0.08	0.16	0.08	0.16	0.08	0.16	0.08	0.16	0.08	0.16	0.08	0.16	0.08	0.16	0.08	0.16	0.08
A+		2			3	3							2					
B+	1	1											2	2				
O+	2	2			2	2							3	3				

Tabla. 15 - Fotografías comparativas de los distintos grados de hemaglutinación que presentaron las diferentes fracciones proteicas utilizadas en los tipos de sangre A+, B+ y O+.

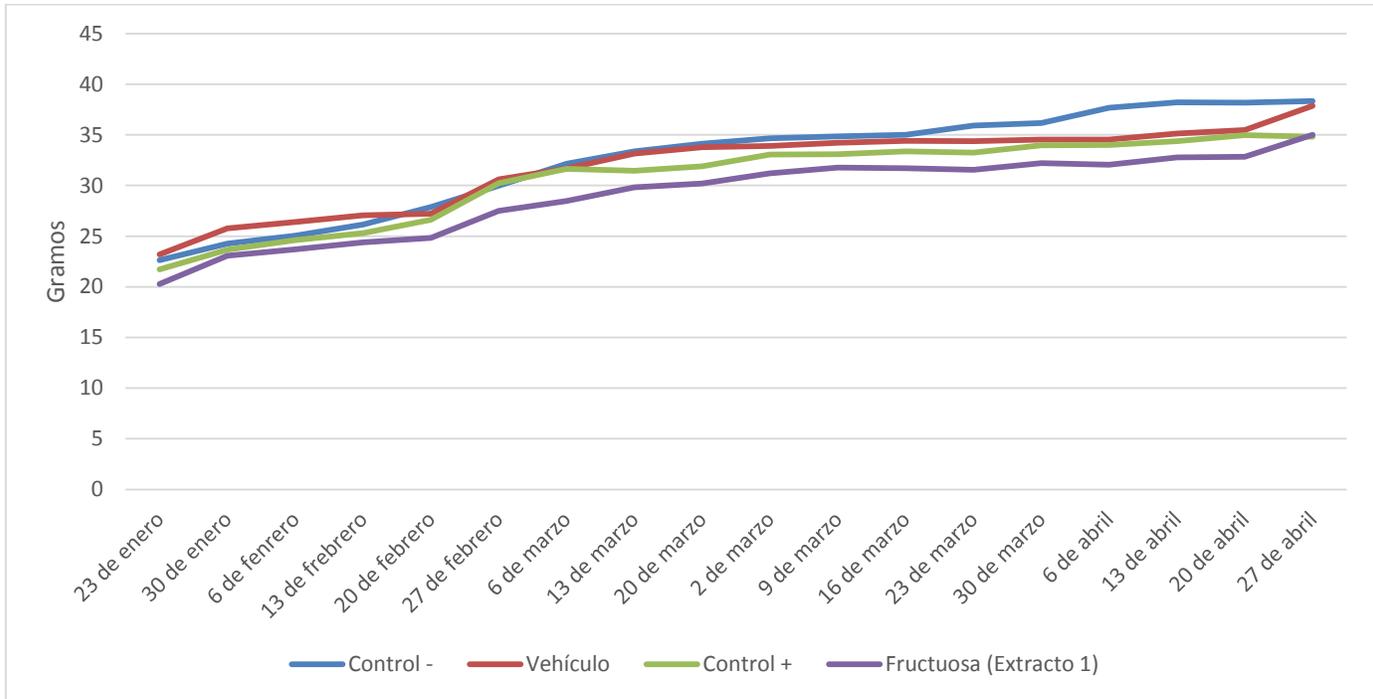
<ul style="list-style-type: none"> • Fracción: Arabinosa • Extracción: 0.15M • [] usada en el ensayo: 0.08 $\mu/\mu\text{l}$ • Tipo de sangre: A+ • Grado 2 • Aumento 40x 	
<ul style="list-style-type: none"> • Fracción: Arabinosa • Extracción: 0.15M • [] usada en el ensayo: 0.16 $\mu/\mu\text{l}$ • Tipo de sangre: B+ • Grado 1 • Aumento 40x 	
<ul style="list-style-type: none"> • Fracción: Arabinosa • Extracción: 0.15M • [] usada en el ensayo: 0.16 $\mu/\mu\text{l}$ • Tipo de sangre: O+ • Grado 2 • Aumento 40x 	

<ul style="list-style-type: none"> • Fracción: Glucosa • Extracción: 0.15M • [] usada en el ensayo: 0.16 $\mu/\mu\text{l}$ • Tipo de sangre: A+ • Grado 3 • Aumento 40x 	
<ul style="list-style-type: none"> • Fracción: Glucosa • Extracción: 0.15M • [] usada en el ensayo: 0.08 $\mu/\mu\text{l}$ • Tipo de sangre: O+ • Grado 2 • Aumento 40x 	
<ul style="list-style-type: none"> • Fracción: Sorbitol • Extracción: 0.15M • [] usada en el ensayo: 0.16 $\mu/\mu\text{l}$ • Tipo de sangre: A+ • Grado 2 • Aumento 40x 	

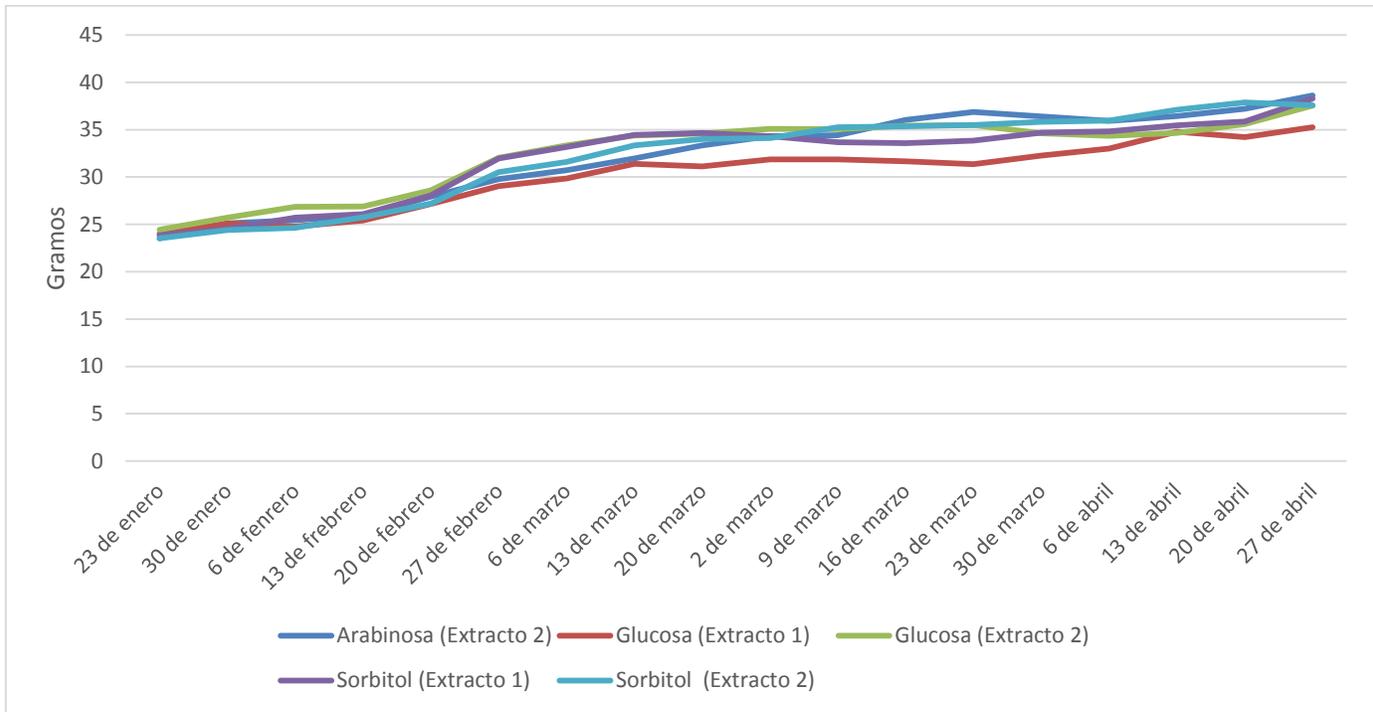
<ul style="list-style-type: none"> • Fracción: Sorbitol • Extracción: 0.15M • [] usada en el ensayo: 0.16 $\mu/\mu\text{l}$ • Tipo de sangre: B+ • Grado 2 • Aumento 40x 	
<ul style="list-style-type: none"> • Fracción: Sorbitol • Extracción: 0.15M • [] usada en el ensayo: 0.16 $\mu/\mu\text{l}$ • Tipo de sangre: O+ • Grado 3 • Aumento 40x 	

3. Peso corporal de los grupos

Se muestra en las Gráfica 5 y 6 que los grupos de ratones presentaron aumento constante de peso,



Gráfica. 5 – Seguimiento del peso corporal de los ratones pertenecientes a los grupos Control -, Vehículo, y tratados con fracción afin a Fructuosa, durante el proceso de inducción carcinogénica.



Gráfica 6- Seguimiento del peso corporal de los ratones pertenecientes a los tratados con fracciones afines a Arabinosa, Glucosa (Extracto 1 y 2) y Sorbitol (Extracto 1 y 2) durante el proceso de inducción carcinogénica.

4. Evaluación de la actividad antioxidante.

4.1 Presencia de masas tumorales

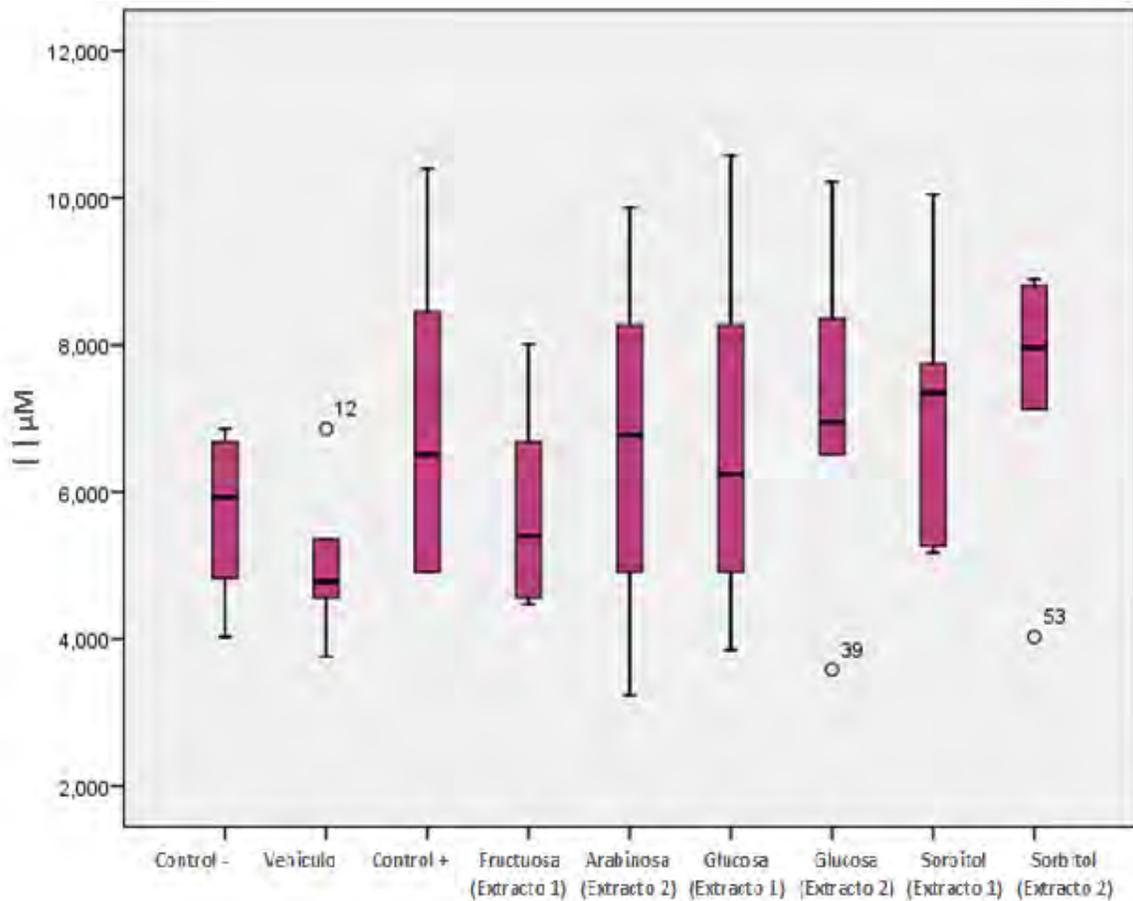
Realizando la necropsia de los diversos grupos se encontró la presencia de pequeñas masas tumorales (Figura. 12) en los ratones que formaban el Control positivo (1-3 mm de diámetro) y en los grupos tratados con lectinas (1-2 mm), exceptuando los tratados con la fracción obtenida con glucosa del extracto 1.



Figura. 12 – Presencia de una masa anómala y depósitos de óxido de níquel en un ratón perteneciente al grupo Control positivo.

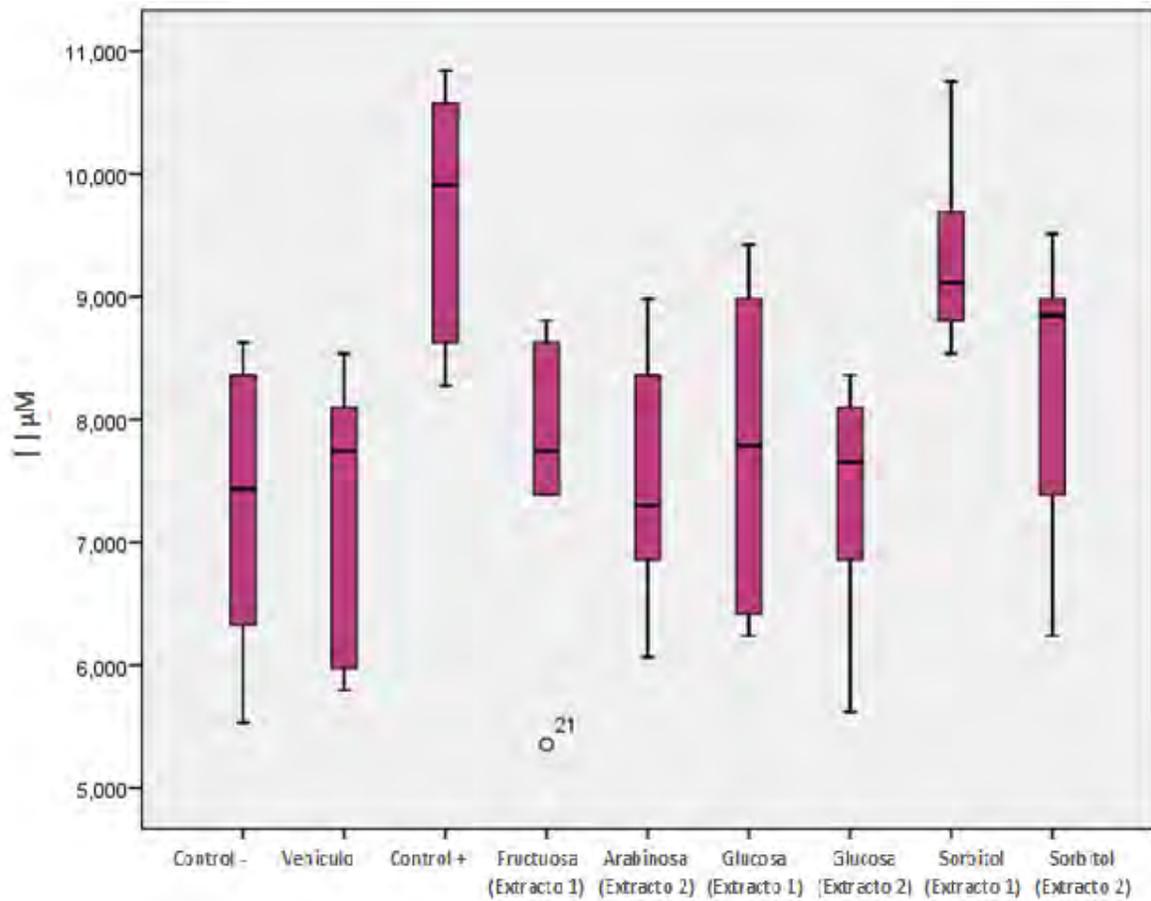
4.2 Concentración de nitritos en plasma e hígado

No se observó una diferencia significativa en la concentración plasmática de nitritos en plasma entre los grupos que recibieron un tratamiento y el Control +.



Gráfica. 7 – Concentración de nitritos en plasma de los ratones de la cepa CD-1 pertenecientes a los grupos utilizados en las pruebas de marcadores de estrés oxidativo. P con valor de 0.102, siendo $p > 0.05$.

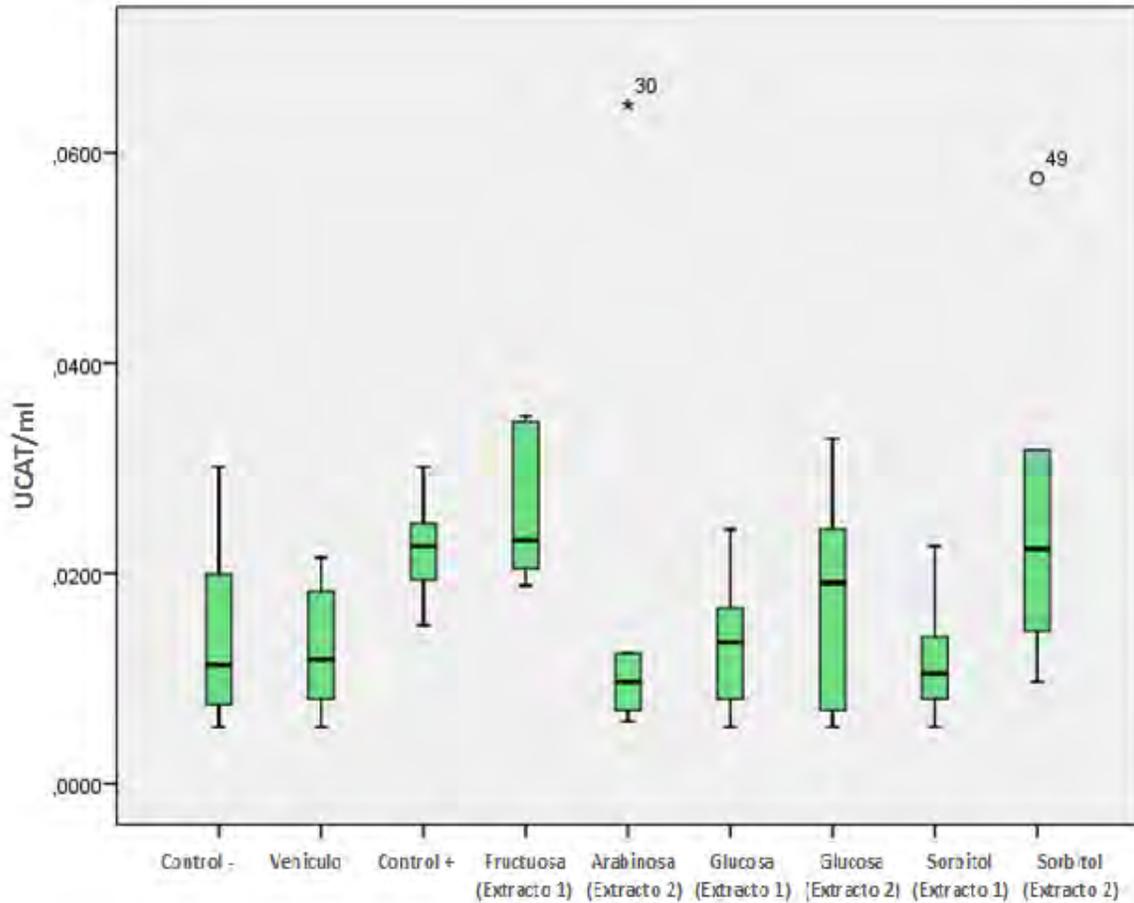
En hígado, los tratamientos con fracciones proteicas obtenidas con arabinosa y glucosa del extracto 2 mostraron una diferencia significativa con el control +.



Gráfica. 8- Concentración de nitritos en hígado de los ratones de la cepa CD-1 pertenecientes a los grupos utilizados en las pruebas de marcadores de estrés oxidativo. P con valor de 0.102, siendo $p > 0.05$.

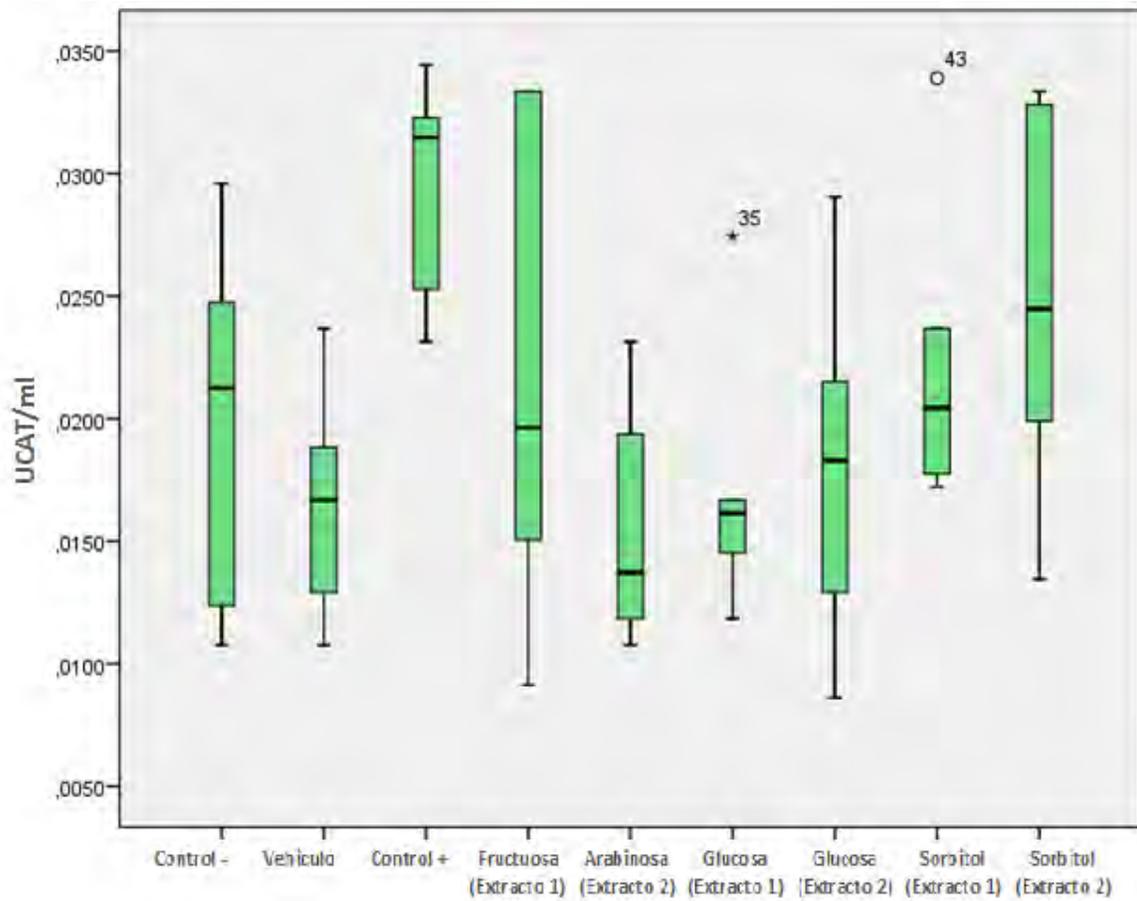
4.3 Actividad enzimática de la catalasa

La actividad de catalasa en plasma no fue estadísticamente significativa con ninguno de los tratamientos utilizados.



Gráfica. 9 – Actividad de la enzima catalasa en plasma de los ratones de la cepa CD-1 pertenecientes a los grupos utilizados en las pruebas de marcadores de estrés oxidativo. P con valor de 0.102, siendo $p > 0.05$.

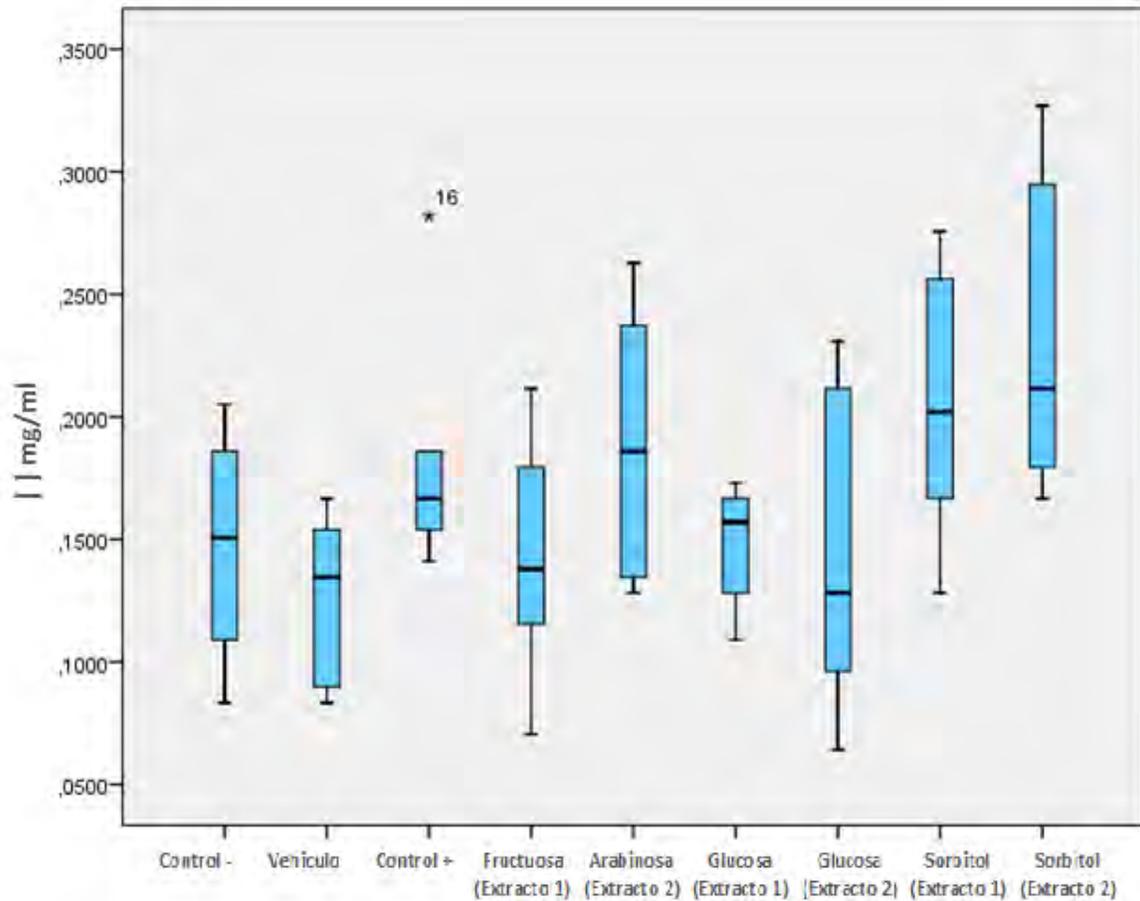
En hígado los tratamientos con fracciones proteicas obtenidas con arabinosa del extracto 2 y glucosa del extracto 1 mostraron ser diferentes estadísticamente del control +.



Gráfica. 10 - Actividad de la enzima catalasa en hígado de los ratones de la cepa CD-1 pertenecientes a los grupos utilizados en las pruebas de marcadores de estrés oxidativo. P con valor de 0.102, siendo $p > 0.05$.

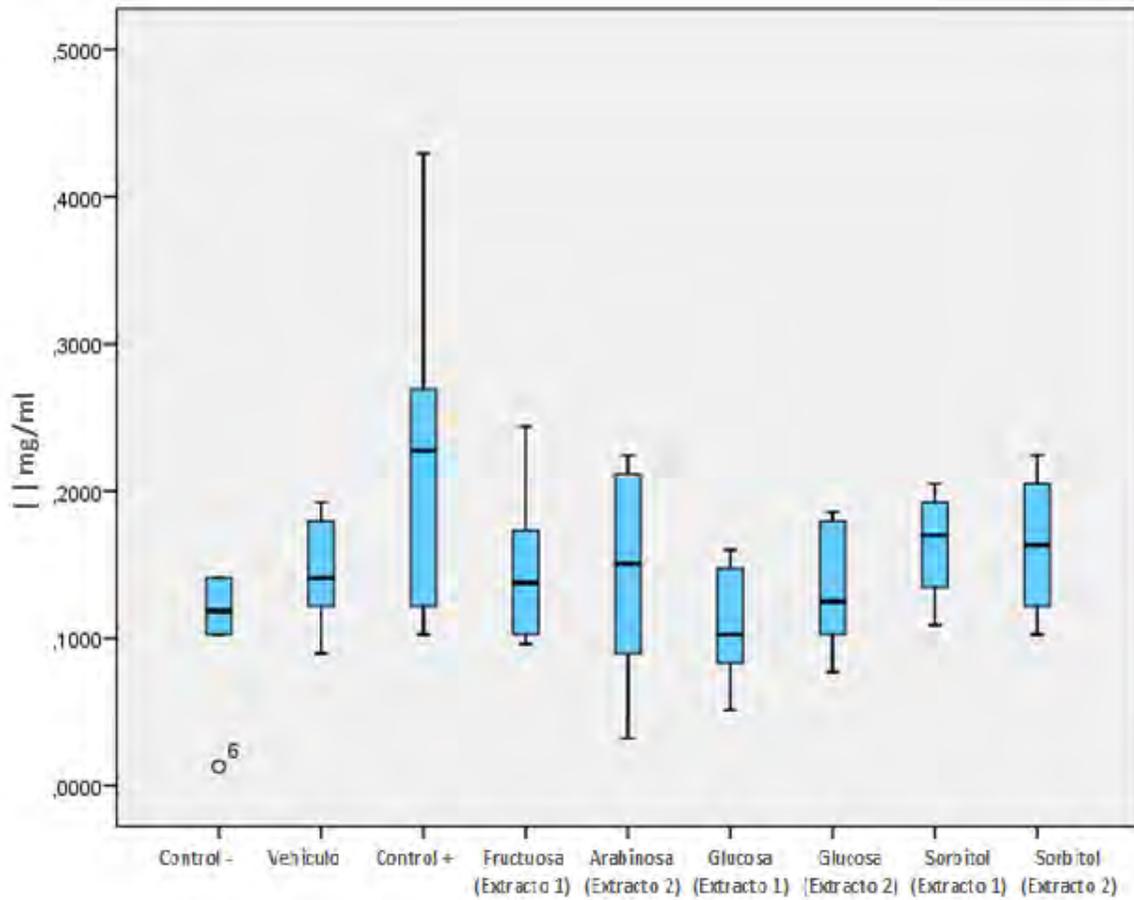
4.4 Peroxidación lipídica en hígado y plasma

La concentración de MDA en plasma mostro ser estadísticamente significativa con el tratamiento con fracciones proteicas obtenidas con sorbitol del extracto 2, siendo mayor que el control +.



Gráfica. 11 - Concentración de MDA en plasma de los ratones de la cepa CD-1 pertenecientes a los grupos utilizados en las pruebas de marcadores de estrés oxidativo. P con valor de 0.102, siendo $p > 0.05$.

En hígado el tratamiento con fracción proteica obtenida con glucosa del extracto 1 mostro una diferencia significativa con el control +, regresando a una concentración normal.



Gráfica. 12- Concentración de MDA en hígado de los ratones de la cepa CD-1 pertenecientes a los grupos utilizados en las pruebas de marcadores de estrés oxidativo. P con valor de 0.102, siendo $p > 0.05$.

Discusión.

Zuo et al (2012) reportó un rendimiento de lectinas de *Pinellia ternata* de entre el 90.4 y 2.85 %. Muthukumar et al (2009) han reportado un rendimiento de lectinas de *Pleurotus sajor-caju* de entre 13.28 y 9.58 %. Comparados con ellos, los porcentajes que se obtuvieron de los extractos 1 y 2 son bajos, sin embargo Valadez² et al (2011) mostraron que el rendimiento de lectinas de *Phaseolus acutifolius* separadas con glicina fue de 0.586 %, el cual se aleja muy poco de los rendimientos de lectinas obtenidas en cada fracción proteica individual de este trabajo, sobre todo las obtenidas del extracto 1.

La presencia de una concentración muy similar de carbohidratos totales en los dos extractos realizados son similares a lo reportado ya que el método de *Salting Out* solo es específico para proteínas y las variaciones entre esta técnica no deben tener ningún efecto en la cantidad de carbohidratos presente en los extractos.

No se encontraron carbohidratos reductores con el método de DNS por lo que su capacidad de interferencia es despreciable.

De acuerdo con Home (2004), en la naturaleza, la glucosa tiene un propósito estructural en plantas y es la base del almacenamiento de energía y combustible tanto en el reino animal como en el vegetal, por lo que era de esperarse encontrar una cantidad considerable de carbohidratos reductores, a los que la glucosa pertenece. Sin embargo, la ausencia de estos no presenta contradicción en los resultados, ya que a pesar de que las plantas deben contar con una gran cantidad de carbohidratos reductores, el proceso de *Salting Out* es específico para proteínas como se dijo anteriormente y en este caso no se logró extraer una cantidad de carbohidratos reductores suficiente para ser cuantificable.

Después de la cromatografía de afinidad y su posterior diálisis se eliminó la presencia de carbohidratos totales para que la actividad de las lectinas no se viera bloqueada por la unión a los carbohidratos presentes en la planta o a los utilizados en la cromatografía de afinidad.

En el primer ensayo de hemaglutinación con los extractos 1 y 2 en sus formas crudas y dializadas se observa una marcada actividad hemaglutinante en los eritrocitos de la sangre tipo A+ y O+, mientras que la sangre B+ apenas mostro actividad. Además se muestra que ninguna de las disoluciones al 12.5% mostro algún tipo de actividad hemaglutinante

Aunque en su generalidad las lectinas no reconocen a un grupo sanguíneo específico como lo reportado por Rodríguez et al (2004), este ensayo muestra una marcada especificidad de la actividad total de las lectinas hacia los grupos sanguíneos A+ y O+.

El extracto 1 muestra que la fracción proteica con mayor actividad hemaglutinante es la obtenida con glucosa. Se observa que presento hemaglutinación en los 3 tipos sanguíneos del sistema ABO+, además de una marcada preferencia hacia aglutinación de eritrocitos de tipo O+ seguido del tipo A+. El B+ presento hemaglutinación pero a un grado muy bajo.

La fructuosa genero un mayor grado de hemaglutinación en el tipo B+ pero al disminuir la concentración esta actividad se ve reducida. Hacia los tipos A+ y O+ presento capacidad aglutinante pero muy limitada (Grado 1).

Por otro lado, la fracción obtenida con sorbitol presento una buena actividad aglutinante en el eritrocitos tipo A+ y de forma muy reducida en los tipos A+ y O+

Se observó que las fracciones proteicas de sorbitol y glucosa obtenidas a partir del extracto 2 presentan un grado de aglutinación mayor con el tipo O y A respectivamente, en la fracción de glucosa no se observa ninguna actividad hemaglutinante en la sangre tipo B.

En la fracción de arabinosa se observa que a una menor concentración la actividad es mayor en el tipo sanguíneo A+.

Hay que recordar que las estructuras que forman a los antígenos del sistema ABO tienen en común el oligosacárido fundamental que forma al grupo O+. Los antígenos A y B difieren del O por la adición de un monosacárido extra, N-acetilgalactosamina (para A) o galactosa (para B) unido por medio de un enlace α -1,3-glicosídico a una galactosa integrante del antígeno O (Berg et al, 2007).

A pesar la presencia de galactosa en los tres grupos del sistema ABO+, el ensayo no mostro ningún tipo de actividad en las fracciones obtenidas con galactosa. Por otro lado y aunque el primer ensayo de hemaglutinación con tipo B+ no mostro una marcada actividad aglutinante, en los ensayos con las fracciones proteicas no se presentó una diferencia significativa entre los grupos sanguíneos, lo que confirma lo reportado por Rodríguez et al (2004) ya que estas proteínas tipo lectina no se pueden considerar afines a los antígenos del sistema ABO+.

La actividad hemaglutinante y el grado de hemaglutinación de las fracciones de glucosa y sorbitol en los dos extractos fue similar

La actividad de las fracciones obtenidas con arabinosa del extracto 1 y fructuosa del extracto 2 es muy pequeña en los 3 grupos sanguíneos y su grado de aglutinación es bajo.

En la comparación la actividad hemaglutinante de los extractos crudos y dializados se observa que los dializados presentan una mejor actividad hemaglutinante. Además, en las fracciones proteicas obtenidas de la cromatografía de afinidad se observan grupos de eritrocitos compactos y menos aislados, que los observados con los extractos crudos y dializados. Esto se debe a que los procesos de semipurificación eliminan cualquier tipo de molécula como las glicoproteínas, glucolípidos y carbohidratos que pueda interferir en los procesos de hemaglutinación y en los ensayos *in vivo* posteriores, de esta manera podemos afirmar que tenemos proteínas de tipo lectina al final de estos procesos.

La concentración de nitritos no mostro ser estadísticamente significativa en plasma entre ninguno de los grupos. En hígado, los tratamientos con fracciones proteicas obtenidas con arabinosa y glucosa del extracto 2 mostraron una diferencia

significativa con el control +, regresando a estado similar al del control -, que no recibió ningún tipo de tratamiento.

Como ya se mencionó, las concentraciones de nitritos en plasma son el resultado de la formación y el consumo del NO, una de las principales RNS (Silva et al, 2008).

La disminución de la concentración de nitritos como marcador biológico nos indica que los dos tratamiento con proteínas de tipo lectina obtenidas de tallo de *Ruta graveolens* afines a arabinosa y glucosa del extracto 2 cuentan con una fuerte actividad antioxidante y de acuerdo con Al-Mamun et al. (2016) existe una fuerte relación entre el aumento en el estrés oxidativo y un gran número de enfermedades crónicas, incluyendo el cáncer, por lo que se infiere que estos tratamiento pueden tener propiedades anticancerígena y/o antiproliferativas.

La actividad de catalasa en plasma no fue estadísticamente significativa con ninguno de los tratamientos utilizados. En hígado los tratamientos con fracciones proteicas obtenidas con arabinosa del extracto 2 y glucosa del extracto 1 mostraron ser diferentes estadísticamente del Control +, manteniendo niveles normales con estos tratamientos. Estos resultados confirman lo mostrado con los niveles de nitritos, siendo que las lectinas afines a glucosa y arabinosa presentan una alta actividad antioxidante.

La concentración de MDA en plasma mostro ser estadísticamente significativa con el tratamiento con fracciones proteicas obtenidas con sorbitol del extracto 2. Sin embargo esta mostro ser incluso mayor que la del control +, y estadísticamente diferente al control -. Esto indica que las lectinas de *Ruta graveolens* afines a Sorbitol pueden tener una actividad pro-oxidante a diferencia de las afines a glucosa y arabinosa, lo cual es respaldado por Carrasco-Castilla (2012), que indica que ciertas las lectinas pueden tener efectos pro-oxidantes, dependiendo del tipo de lectina y de su concentración utilizada.

En hígado el tratamiento con fracción proteica obtenida con glucosa del extracto 1 mostro una diferencia significativa con el control +, regresando a una concentración normal.

La presencia de pequeñas masas anómalas en la dermis cercana a la mama se relaciona con el aumento en la concentración de los marcadores de estrés oxidativo en los diferentes grupos de ratones. La ausencia de estas masas en los grupos tratados con las fracciones obtenidas con glucosa muestra la actividad antitumoral de este tratamiento.

Se puede observar que los tratamientos con resultados antioxidantes más efectivos son los de lectinas afines a glucosa y esto no es de sorprenderse. Hay que tener presente que la glucosa es uno de los monosacáridos que se encuentran en mayor concentración en todos los seres vivos, con funciones estructurales en las plantas (Home, 2004), teniendo además un rol central en los procesos de homeostasis y metabolismo celular (Gould y Holman, 2015) e incluso participando en el proceso apoptótico de algunos tipos celulares (Federici et al., 2001; Maedler et al., 2001), entre otras funciones. La unión de lectinas con glucosa, y según los resultados mostrados, en menor medida con arabinosa, pueden activar una serie de procesos como es la reducción en la proliferación de células tumorales, aumento en el número de macrófagos, el aumento de la susceptibilidad de las células tumorales al ataque de los macrófagos, y la mejora de la inmuno-competencia de los organismos portadores de células tumorales. Hivrale e Ingale (2013) y Sunil et al. (2014)

La actividad de las fracciones proteicas afines a los mismos carbohidratos (glucosa y sorbitol) pero obtenidas a partir de los extractos 1 y 2 mantienen una actividad antioxidante muy similar. Aunque no presentan estadísticamente la misma significancia en los 3 marcadores biológicos, las gráficas (7-12) muestran la misma tendencia a disminuir la concentración de los marcadores en el caso de las fracciones afines a glucosa, y aumentar la concentración de los marcadores en el caso de las fracciones afines a sorbitol.

Conclusiones.

- Se obtuvo un rendimiento del 2,066% en el extracto 1 con un *Salting Out* al 2.5 M, casi el doble que del extracto 2 con un *Salting Out* al 0.15M, que fue del 1,36% y por lo tanto menos eficaz en la extracción de proteínas tipo lectina.
- Los procesos de semipurificación lograron generar extractos enriquecidos de lectinas afines a diversos carbohidratos.
- La actividad hemaglutinante mejoro en relación a los procesos de semipurificación, tendiendo una mejor actividad en las fracciones proteicas enriquecidas, en los extractos dializados y finalmente en los extractos crudos, en ese orden.
- Las fracciones proteicas enriquecidas a partir del extracto 1 con mejor actividad hemaglutinante fueron las afines a glucosa, fructuosa y sorbitol en ese orden, aunque las diferencias son muy ligeras.
- La actividad hemaglutinante de las fracciones proteicas afines a glucosa y sorbitol del extracto 2 son muy parecidas, mientras que la afín a arabinosa presento una menor actividad.
- Los marcadores de estrés oxidativo (actividad de la enzima catalasa, la concentración de MDA y Nitritos) muestran que las fracción afines a glucosa son las que presentan una mejor actividad antioxidante.
- La fracción proteica afín a arabinosa mostro respuesta antioxidante menor comparada con la glucosa.

- La fracción afín a sorbitol se considera pro-oxidante según la prueba de MDA.
- La fracción afín a fructuosa no mostro ningún tupo de actividad antioxidante ni pro-oxidante.
- La actividad biológica de las lectinas e independiente de la concentración de *Salting Out* utilizada en los extractos.

Bibliografía.

- ACS (2014) Recuperado el 15 de enero de 2016, de <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003027-pdf.pdf>
- ACS (2015) Recuperado el 17 de julio de 2016, de <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003027-pdf.pdf>
- ACS (2016) Recuperado el 17 de julio de 2016, de <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-early-signs-symptoms>
- AECC (2014) Fases de la enfermedad. Recuperado el 15 de enero de 2016, de <https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/ELCANCER/Paginas/Fasesdelaenfermedad.aspx>
- Al-Mamun M.A, Husna J., Khatun M., Hasan R., Kamruzzaman M., Hoque K. M. F, Reza M.A., Ferdousi Z. (2016) Assessment of antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of two vegetable species of *Amaranthus* in Bangladesh. BMC Complement Altern Med, 16 (157), 1-11.
- Arbeláez C.A. (2009) Sistema de grupo sanguíneo ABO. Medicina & Laboratorio, 15(7-8), 329-347
- ASTRO (2012) Radioterapia para cáncer de mama. Recuperado el 20 de Julio de 2016 , de http://www.rtnswers.org/uploadedFiles/Treatment_Information/Brochures/breastsp.pdf
- ATSDR (2007) ¿Qué es el cáncer? Recuperado el 15 de enero de 2016, de http://www.atsdr.cdc.gov/es/general/cancer/es_cancer_fs.pdf
- Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S. (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid Med Cell Longev, 2014(360438), 1-31.
- Baizabal R.H. (2010) Evaluación de la capacidad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial y del polvo de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) en queso fresco de vaca. Tesis de Licenciatura. Universidad de las Américas Puebla.
- Beker M., Díaz S. (2013) Protooncogenes, oncogenes y genes supresores de tumor. Recuperado el 7 de enero de 2016, de <https://amglez.webs.ull.es/Protooncogenes,%20Oncogenes%20y%20Genes%20supresores%20de%20Tumor.pdf>
- Beltrán A., (2010) Cáncer de mama. México. Recuperado el 20 de Julio de 2016 , de http://www.medicinaysalud.unam.mx/temas/2010/10_oct_2k10.pdf
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2002) Biochemistry. (5° edición) New York: W H Freeman.

- Brotchi J., Danguy A., Kiss R. (1997) Lectin histochemistry of astrocytic tumors and in vitro characterization of lectin-induced modifications on the proliferation of SW1088, U373 and U87 human astrocytic cell lines. *J Neuro Oncol*, 34(2), 111-122.
- Carbajal A. (2004) Cromatografía de afinidad. Recuperado el 27 de Agosto de 2016, de http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Crom_Afinidad.pdf
- Carrasco-Castilla J., Hernández-Álvarez A. J., Jiménez-Martínez C., Jacinto-Hernández C., Alaiz M., Girón-Calle J., Vioque, J., Dávila-Ortiz G. (2011). Antioxidant and metal chelating activities of *Phaseolus vulgaris* L. var. *Jamapa* protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. *Food Chemistry*, 131 (4), 1157-64.
- Casablanca E., Ríos N., Álvarez M. T., Terrazas L. E. (2009) Optimización de las condiciones de cultivo anaeróbico termófilo para aumentar la producción enzimática de xilanasas con cepas bacterianas encapsuladas y libres. *Biofarbo*, 17 (2), 51-59.
- Castillo A., Abdullaev F. (2005) Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de Investigación Clínica*, 57(1), 55-64.
- Céspedes E.M., Hernández I., Llópiz N. (1996) Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Rev Cubana Invest Biomed*, 15(2).
- Chen Y.F., Boland C.R., Kraus E.R., Goldstein I.J. (1994) The lectin *Griffonia simplicifolia* I-A4 (GSI-A4) specifically recognizes terminal alpha-linked N-acetylgalactosaminyl groups and is cytotoxic to the human colon cancer cell lines LSII74 and SW1116. *Int J Cancer*, 57, 561–567.
- Clark D., Mao L. (2012) Cancer biomarker discovery: Lectin-based strategies targeting glycoproteins. *Disease Markers*, 33, 1-10.
- Crespo D. (2006) Biogerontología. Cantabria: Ed. Universidad de Cantabria.
- Cummings R.D., Etzler M.E.,(2009) *Essentials of Glycobiology*. (2d edición) New York: Cold Spring Harbor.
- Dickers K.J, Bradberry S.M., Rice P., Griffiths G.D., Vale J.A. (2003) Abrin poisoning. *Toxicol Rev*; 22(3), 137–42.
- Doan L.G (2004) Ricin: mechanism of toxicity, clinical manifestations, and vaccine development. A review. *J Toxicol Clin Toxicol*, 42(2), 1-8.
- Dorado C., Vargas C.R., Rivas S. (2003) Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM*, 46 (6), 229-235.
- Easton R. (2011) Glycosilation of proteins- Structure, Function and Analysis. *Life science*, 1(48), 1-5.

- Faheina G.V., Lacerda A., Cavalcanti B.C., Ramos M.V., Moraes M.O., Pessoa C., . Araújo D. (2012) Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. *Toxicology in Vitro*, 26(7), 1161–1169.
- Federici M., Hribal M., Perego L., Ranalli M., Caradonna Z., Perego C., Usellini L., Nano R., Bonini P., Bertuzzi F., Marlier L.N., Davalli A.M., Carandente O., Pontiroli A.E., Melino G., Marchetti P., Lauro R., Sesti G., Folli F. (2001) High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes*, ;50(6),1290-301.
- Ferriz R., Torres I.C., Blanco A., Garcia T., (2010) *New Approaches in the Treatment of Cancer*. New York: Nova Science Publishers.
- Flores L.C. (2012) Evaluación de la citotoxicidad de lectinas de *Ruta graveolens* en células de Cáncer de mama. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Freed D.L. (1999) Do dietary lectins cause disease? *BMJ*, 318(7190), 1023–1024.
- Gallego del Sol F., Nagano C.S., Cavada B.S., Sampaio A.H., Sanz L., Calvete J.J. (2006) Lectinas. *Investigación y Ciencia*, 361(1), 58-67.
- Ganem F.A., González O.M. (2000) Lectina concanavalina A: obtención y purificación. *Universo Diagnóstico*, 1(1), 1-41.
- Ganguly C., Das S. (1994) Plant lectins as inhibitors of tumor growth and modulators of host immune response. *Chemotherapy*, 40 (4), 272-8.
- Garbor F., Stangl M., Wirth M. (1998) Lectin-mediated bioadhesion: binding characteristics of plant lectins on the enterocyte-like cell lines Caco-2, HT-29 and HCT-8. *J Control Release*, 55(2-3), 131-42.
- Gould G.W, Holman G.D. (1993) The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J*, 295 (2), 329-341.
- Hamid R., Masood A., Wani I.H., Rafiq S. (2013) Lectins: Proteins with Diverse Applications. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (4), S93-S103.
- Hernández P., Martín O., Rodríguez Y., Ganem F.A. (1999) Aplicaciones de las lectinas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 15(2), 91-5.
- Hernández P., Pérez E., Martínez L., Ortiz B., Martínez G., (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína- carbohidratos. *REB*, 24 (1), 21-27.
- Hochstenbach S.L., Ciriello J. (1997) Medullary pathways mediating depressor responses from Na⁺ sensitive sites in nucleus of the solitary tract. *Am J Physio*, 272(1-2), 126-33.
- Home P. (2004) La glucosa: esa dulce toxina. *Diabete's Voice*, 49, 5-7.
- IARC (2012) Breast Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 Recuperado el 20 de Julio de 2016 , de <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>

- INC (2014) Tratamiento del cáncer de seno (mama) (PDQ®)–Versión para pacientes. Recuperado el 20 de Julio de 2016 , de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/paciente/tratamiento-seno-pdq>
- Ingale A.G., Hivrale A.U. (2013) Plant as a plenteous reserve of lectin. *Plant Signal Behav*, 8(12), e26595-1 - e26595-7.
- Janssen O., Scheffler A., Kabelitz D. (1993) In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). *Arzneimittelforschung*,. 43(11), 1221-1227.
- Jaramillo V.H. (2014) Determinación cuantitativa de saponinas totales y su actividad cicatrizante presentes en doce especies vegetales medicinales. Trabajo de titulación previa la obtención del Título. Universidad Técnica de Machala.
- Javed M. (2002) Glycoproteins. Recuperado el 20 de Julio de 2016, de <http://javed-abbas.tripod.com/notesonline/biochemistry/protein-modificati3ns.html>
- Katzin A.M., Del Pino E.J., Cunio R.M., Raisman J.S., Olmos J., Lajmanovich S., Gonzales S.M. (1979) Receptores para lectinas en la superficie de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)*, 29(1), 76-84.
- Kelter G., Schierholzz J.M., Fischer I.U., Fiebig H.H. (2007) Cytotoxic Activity and Absence of Tumor Growth Stimulation of Standardized Mistletoe Extracts in Human Tumor Models In Vitro. *Anticancer Research*, 27, 223-234.
- Keyaerts E., Vijgen L., Pannecouque C., Damme E., Peumans W., Egberink H., Balzarini J., Ranst M. (2007) Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replicati3n cycle. *Antivir Res*, 75(3) 179–187.
- Kiss R., Camby I., Duckworth D., De-Decker R., Salmon I., Pasteels J.L., Danguy A., Yeaton P. (1997) In vitro influence of *Phaseolus vulgaris*, *Griffonia simplicifolia*, Concanavalin A, wheat germ and peanut agglutinins on HCT-15, LoVo and SW 837 human colorrectal cancer cell growth. *Gut*, 40(2), 53-61.
- Kiss R., Camby I., Duckworth D.O, De-Deker R., Salmon I. (1997) In vitro influence of *Phasseolus vulgaris*, *Griffonia simplicifolia*, Concanavalin A, wheat germ and peanut agglutinins on HCT-15, LoVo and SW 837 human colorectal cancer cell growth. *Gut*, 40(2), 253-261.
- Knibbs R.N., Mac–Callum D.K., Lillie J.H., Goldstein I.J. (1994) Wild–type and cultured Ehrlich ascites tumor cells differ in tumorigenicity, lectin binding pattern and binding to basement membranes. *Glycobiology*, 4, 419–428.

- Kuwahara, I., Ikebuchi K., Hamada H., Niitsu Y., Miyazawa K., Ohyashiki K., Fujisawa, H., Furukawa, K.(2003) Changes in N-glycosylation of human stromal cells by telomerase expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 301(2), 293–297.
- Kwan S., Bun T. (2011) Lectins: production and practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89(1), 45–55.
- Liener I.E., Sharon N., Goldstein I.J.(1986.), *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. USA: Academic Press.
- Lin J.K., Tserng K.Y., Chen C.C., Lin L.T., Tung T.C. (1970) Abrin and ricin: new anti-tumor substances. *Nature* 227, 292–293.
- Maedler K., Spinas G.A., Lehmann R., Sergeev P., Weber M., Fontana A., Kaiser N., Donath M.Y. (2001) Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes*, 50(8), 1683-90.
- Martínez M.C., Andriantsitohaina R. (2009) Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. *Antioxidants & Redox signaling*, 11(3), 669- 702.
- Mendoza W., Gandolfo L., Ponce L., Novello J., Marangoni S. (2007) Estudios, estructura y función de una lectina aislada de semillas de *Caesalpinia spinosa kuntze* (Tara). *Idesia*, 25(2), 49-58.
- Mendoza W., Gandolfo L., Ponce L., Novello J., Marangoni S. (2007) Estudios estructura y función de una lectina aislada de semillas de *caesalpinia spinosa kuntze* (tara). *IDEASIA*, 25(2), 49-58.
- Mody R., Joshi S.H., Chaney W. (1995) Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cáncer. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 33(1), 1-10.
- Muthukumar M., Rabeeth M., Pati P., Sujatha K., Srivastava N., Kamle M. (2009) Isolation, purification and biochemical characterization of lectin from oyster mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *Plant archives*, 9(1), 41-46.
- NTP (2014) Nickel Compounds and Metallic Nickel. Recuperado el 27 de Agosto de 2016, de <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/nickel.pdf>
- Pañihuara E. (2015) Actitud del personal de salud frente a la etapa terminal del paciente oncológico del servicio de oncología. Para optar el Título de Especialista en Enfermería Oncológica. UNMS.
- Peralta O., Bravo M.E., Amar M., Arnello F., Barriga C, Carvallo P., Domínguez F, Gamboa J., Gutiérrez L., Jara L., Moyano L., Neira P., Pardo M., Razmilic D., Sáez C., Viguera G. (2010) Revisión de la literatura sobre alto riesgo de cáncer de mama y estrategias de prevención. *Medwave*, 10(01), 1-16

- Pérez H. (2015) Catalasa para el manejo del peróxido de hidrógeno en la industria textil. Proyecto de Grado. Universidad ICESI.
- Power L. (1991) Dietary lectins: Blood types & Food allergies. Recuperado el 7 de enero de 2016, de <http://www.biotype.net/diets/Lectin.pdf>
- Reyes E.F., Galván A. (2008) Métodos para la cuantificación de proteínas. Recuperado el 18 de Agosto de 2016, de <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20M%C3%89TODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8ADNS.pdf>
- Rishendran N., Morgan N.W., Peter G. (2013) Surgery in 2013 and beyond. JTD, 5(5), S593-S5606.
- Rodríguez J.E. (2012) Producción de glicopeptidos conteniendo el Antígeno Tn para su aplicación en Inmunoterapia Antitumoral. Tesis de Licenciatura. Universidad de la República.
- Rodríguez M.V., Riquelme B., Valverde J., Gattuso S. (2004) Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las fabáceas sobre los eritrocitos humanos mediante el análisis de imágenes. ANALES AFA, 16(1), 247-248.
- Rossi W.M., Garrido G., Núñez A.J. (2016) Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante. J of Pharmacy & Pharmacognosy Res, 4(2), 62-83.
- Santos A., Napoleão T.H., Palva P.M., Breitenbach L.C. (2012) Lectins: Important Tools for Biocontrol of Fusarium Species. New York: Nova Science Publishers
- Secretaria de Salud (2007) Cáncer de mama. Recuperado el 20 de Julio de 2016, de <http://www.inppares.org/sites/default/files/Cancer%20de%20mama.PDF>
- SEOM (2015) Hormonoterapia o tratamiento hormonal. Recuperado el 18 de Agosto de 2016, de <http://www.seom.org/es/informacion-sobre-el-cancer/guia-actualizada/que-es-y-como-funciona-la-hormonoterapia?showall=1>
- Sharon L., Lis N. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glicobiology, 14(11), 53R-62R
- Sharon N., Lis H. (2003) Lectins. (2d edición) Holanda: Springer Science & Business Media.
- Shinti, C. (2007). Estudios Estructurales de Lectinas de Algas Marinas y de Vegetales Superiores. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Shoham J., Inbar M., Sachs L. (1970) Differential toxicity on normal and transformed cells in vitro and inhibition of tumour development in vivo by concanavalin A. Nature, 227, 1244–1246.

- Silva E.R. (2008) Valores de referencia de nitritos como medida de óxido nítrico plasmático en adolescentes normotensos. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*, 3(7), 230-236.
- Souza M.A., Carvalho F.C., Ruas L.P., Ricci-Azevedo R., Roque-Barreira M.C. (2013) The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj J.*, 30(7), 641-657.
- Stillmark, H. (1888). Uber ricin, eines gifiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und anderen euphorbiacen. Tesis Doctoral. Universidad de Estonia.
- Suárez D.L., Orozco D.M. (2014) Obtención y caracterización de pectina a partir de la cascarilla de cacao del Theobroma cacao L., subproducto de una industria chocolatera nacional. Trabajo de Grado. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Summer J., Howell S., (1936) Identificación of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J Bacteriol*, 32(2), 227–237.
- Sundin C.E. (2005) Proteins and Aminoacids: Isolation of Casein: Protein and Amino Acid Tests. Recuperado el 18 de Agosto de 2016 , de <http://people.uwplatt.edu/~sundin/351/351h-pro.htm>
- Sunil S., Kunjeshwori S., Bun T. (2014) Banana Lectin: A Brief Review. *Molecules*, 19, 18817-18827.
- Tashfeen M., Hasan R. (2003) Mitogenic lectins. *Med Sci Monit*, 9(11), RA265-269.
- Torres A. (2002) Cultivo in vitro de ruda (*Ruta graveolens* L.), toronjil (*Melissa officinalis* L.) y cedrón (*Aloysia tryphilla* (L`Hér.) Britton). Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile.
- Torres A. (2015) Efecto de las lectinas de tallo de *Ruta graveolens* L. en un modelo murino de cancer. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autonoma de México.
- UIO(2010) Lectins. Recuperado el 15 de enero de 2016 <http://folk.uio.no/utek/projects/lectins.shtml>
- UNAM (2009) Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Recuperado el 18 de Agosto de 2016, de http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Ruta_graveolens&id=7464
- UNQ (2010) TP2: Extracción y cuantificación de proteínas. Recuperado el 18 de Agosto de 2016 , de <https://ibcmunq.files.wordpress.com/2010/03/tp2.pdf>
- Valadez C., Alvarez G., Riverón L., García A., Morales J., Zuñiga C., Madrigal E., Esquivel J., Esquivel C., Villagómez R., Bautista Mirandeli, Morales A. (2011} Detection of Cytotoxic

- Activity of Lectin on Human Colon Adenocarcinoma (Sw480) and Epithelial Cervical Carcinoma (C33-A). *Molecules*, 16, 2107-2118.
- Valadez C., Morales J.A., Sumaya M.T., Delgado L., Cruz A., Bautista M., Sánchez M., Zuñiga C. (2014) Cytotoxic and Antiproliferative Effect of Tepary Bean Lectins on C33-A, MCF-7, SKNSH, and SW480 Cell Lines. *Molecules*, 19, 9610-9627.
 - Valadez² C., Guzmán A.N. , Soto F.J., Álvarez G., Morales J.A., Madrigal E., Villagómez J.R., Zúñiga C., Gutiérrez J., Becerril M.A. (2011) Purificación, Biochemical Characterization, and Bioactive Properties of a Lectin Purified from the Seeds of White Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius* Variety *Latifolius*). *Molecules*, 16(3), 2561-2582.
 - Velkov V.V., Medvinsky A.B., Sokolov M.S., Marchenko A.I. (2005) Will transgenic plants adversely affect the environment. *J Biosci*, 30(4), 515–548.
 - Venereo J.R. (2002) Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*, 31(2), 126-33
 - Vinagre L.M.(2015) Cap. 1 Anatomía quirúrgica de la mama. En la Guía Clínica de Cirugía de la Mama. España: AEC
 - Viñas G., Puig T., Porta R. (2012) Estrés oxidativo en pacientes con cáncer: dos caras de una misma moneda. *Medicina Clínica*, 139 (4), 171-175.
 - Yau T., Dan X., Wing C.C., Bun T. (2015) Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. *Molecules*, 20, 3791-3810.
 - Yin H., Xu L., Porter N.A. (2011) Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972.
 - Zhou S., Cheng L., Guo S., Wang Y., Czajkowsky D.M., Gao H., Hu X., Tao S. (2015) Lectin RCA-I specifically binds to metastasis-associated cell surface glycans in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 17(1), 1-14.
 - Zicre D. (2012). NEOPLASIA. Recuperado el 15 de enero de 2016, de <http://www.patologiafcm.com.ar/wp-content/uploads/downloads/2012/04/Neoplasia.pdf>
 - Zuo Z., Fan H., Wang, X., Zhou W., Lingling L. (2012) Purificación and characterization of a novel plant lectin from *Pinellia ternata* with antineoplastic activity. *Springerplus*, 1(13), 1-9.

