



**Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Humana**

**EFFECTO CITOTÓXICO DE UNA FRACCIÓN CONCENTRADA EN LECTINA
DE FRIJOL TÉPARI SOBRE LA MUERTE DE CÉLULAS DE CÁNCER DE
MAMA ZR-75-1**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Nutrición Humana

Presenta:

Alma Arlet Velázquez Jaramillo

Dirigido por:

Dra. Teresa García Gasca

SINODALES

Dra. Teresa García Gasca

Presidente

Dr. Alejandro Blanco Labra

Secretario

Dra. Adriana Jheny Rodríguez Méndez

Vocal

M en C. Roberto Ferríz Martínez

Suplente

Dra. Aracely Anaya Loyola

Suplente

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Director de la Facultad de Ciencias
Naturales

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y
Postgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre 2011
México

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO, BAJO LA
DIRECCIÓN DE LA DRA. TERESA GARCÍA GASCA.

AGRADECIMIENTOS

A todos en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ, principalmente a Jos y a Majo que tuvieron la paciencia para instruirme y la gentileza de ayudarme y de manera muy especial a la Dra. Tere García Gasca por su confianza y apoyo sobre todo cuando más lo requerí (ese último empujón que me salvó). A mis sinodales que tuvieron la paciencia y la amabilidad de compartir su tiempo y conocimiento.

DEDICATORIA

De forma muy especial a mi esposo Omar, porque él sabe que sin su incondicional apoyo no hubiera concluido esta etapa de mi formación profesional.

A mis padres, que aunque no están cerca de mí junto con Dios me han regalado esta maravillosa oportunidad, que se llama VIDA.

INDICE

TEMA	PAGINA
Índice	i
Índice de cuadros	iii
Índice de figuras	iv
Resumen	v
Abstract	vi
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	2
2.1 Cáncer	2
2.1.1 Carcinogénesis	2
2.1.2 Evasión de apoptosis	6
2.1.3 Proliferación autónoma	10
2.2 Cáncer de mama	11
2.2.1 La glándula mamaria	11
2.2.2 Tipos de cáncer de mama	12
2.3 Tratamientos actuales para el cáncer	12
2.4 Lectinas y cáncer	14
2.4.1 Lectinas de leguminosas	16
2.4.2 Lectina de frijol Tépari	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPOTESIS	23
5. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo General	23
5.2 Objetivos Específicos	23
6.MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1 Obtención de la fracción concentrada de lectina y perfil electroforético	24

6.2 Curvas dosis-respuesta	24
6.3 Marcadores de necrosis y apoptosis	25
6.4 Análisis estadístico	26
7. RESULTADOS Y DISCUSION	27
7.1 Efecto sobre la proliferación celular	27
7.2 Efecto sobre la sobrevivencia celular	29
7.3 Cuantificación de necrosis celular	31
7.4 Efecto sobre la activación de caspasa 3	33
8. CONCLUSIONES	35
9. LITERATURA CITADA	36
10. ANEXO	45

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PAGINA
1. Estudios de efectos citotóxico de lectinas vegetales <i>in vitro</i> sobre líneas celulares neoplásicas	18

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1. Diferentes vías de activación de la apoptosis	7
2. Ruta de señalización PI3/Akt/mTOR	10
3. Anatomía de la glándula mamaria	12
4. Planta de frijol Tépari	20
5. Efecto de la FCL sobre la proliferación celular de células de cáncer de mama ZR-75-1	28
6. Efecto de la FCL sobre la sobrevivencia celular de células de cáncer de mama ZR-75-1	30
7. Ensayo de citotoxicidad de la FCL sobre células de cáncer de mama ZR-75-1	32
8. Efecto de la FCL sobre la actividad de caspasa 3	34

RESUMEN

Las lectinas vegetales han sido utilizadas como herramientas de diagnóstico y como marcadores de progresión tumoral gracias a su afinidad y selectividad para unirse a carbohidratos de la superficie celular. Algunas lectinas como la de muérdago pueden afectar la sobrevivencia de células cancerígenas de forma diferencial lo que las ha convertido en moléculas de interés terapéutico. El frijol Tépari contiene lectinas citotóxicas que actúan sobre células de cáncer humano y actualmente se estudia el efecto de una fracción concentrada en lectina (FCL) obtenida por cromatografía de exclusión de peso molecular sobre cáncer de colon *in vivo*. Dada la relevancia del cáncer de mama a nivel mundial, es importante conocer su efecto sobre este tipo de células por lo anterior, el presente trabajo estudió el efecto citotóxico de la FCL sobre la línea celular de cáncer de mama ZR-75-1. Las células se sembraron en placas de 24 pozos, recibieron tratamiento con diferentes concentraciones de la FCL (100, 50, 10, 5, 1 y 0.5 µg de proteína/mL) y se determinaron las concentraciones inhibitoria media (CI₅₀) y letal media (CL₅₀). La CL₅₀ se utilizó en tratamientos de 4 y 24 horas para determinar la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) como marcador de necrosis y en tratamiento de 8 h para determinar la actividad de caspasa 3 como marcador de apoptosis. Los resultados mostraron una respuesta citotóxica dependiente de la concentración de FCL, la CI₅₀ fue de 10.93 µg de proteína/mL (40.94 UA/mL) y la CL₅₀ fue de 8.7 µg de proteína/mL (32.59 UA/mL). El ensayo de LDH mostró 12% de citotoxicidad a 24 h de tratamiento mientras que a 4 h no se detectó actividad de la enzima. La actividad de caspasa 3 aumentó 3.8 veces respecto a las células control después de 8 h de tratamiento. Los resultados obtenidos sugieren que el principal efecto de la FCL sobre células de cáncer de mama es de tipo apoptótico y estudios en curso se enfocarán en caracterizar el mecanismo de acción.

Palabras clave: Apoptosis, citotoxicidad, lectinas, frijol Tépari, *Phaseolus acutifolius*.

ABSTRACT

Plant lectins have been used as diagnostic tools and as markers of tumor progression due to their affinity and selectivity to bind to cell surface carbohydrates. Some lectins such as mistletoe lectin can differentially affect cancer cells survival making them of therapeutic interest. Tepary beans contain lectins that possess a cytotoxic effect on human cancer cells and currently a concentrated fraction of lectin (FCL) obtained by molecular weight exclusion chromatography is tested on colon cancer *in vivo*. Given the relevance of breast cancer worldwide, it is important to know its effect on these cells, therefore, the cytotoxic effect of FCL on ZR-75-1 breast cancer cell line was studied. The cells were seeded in 24-well plates and treated with different concentrations of FCL (100, 50, 10, 5, 1 and 0.5 μg protein/mL) and inhibitory (IC_{50}) and lethal (LC_{50}) concentrations were determined. LC_{50} was used in 4 and 24 h treatments in order to determine lactate dehydrogenase (LDH) activity as a marker of necrosis whereas a treatment of 8 h was used to determine caspase 3 activity as apoptosis marker. The results showed a concentration dependent cytotoxic response of FCL, with an IC_{50} of 10.93 μg protein/mL (40.94 AU/mL) and a LC_{50} of 8.7 μg protein/mL (32.59 AU/mL). The LDH assay showed 12% cytotoxicity at 24 h of treatment while at 4 h no enzyme activity was detected. Caspase 3 activity increased 3.8 times compared to the control cells after 8 h treatment. These results suggest that the main effect of FCL on breast cancer cells is of apoptotic type and ongoing studies will focus on characterizing the mechanism of action.

Key words: Apoptosis, lectins, *Phaseolus acutifolius*, Tepary bean.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una pandemia que cobra millones de vidas alrededor del mundo. Afecta a personas de toda raza, posición social y económica, obligando al enfermo y a su familia a hacer cambios importantes en su vida personal, social, laboral y económica. El impacto del diagnóstico de cáncer conlleva consecuencias psicoemocionales fuertes como crisis depresivas, temor, ansiedad, confusión y desesperanza por parte del paciente y sus familiares (Pérez y Herrera 2005). Además de lo anterior, existe una fuerte afectación a la sociedad desde el diagnóstico, el tratamiento y la incapacidad del enfermo de llevar una vida productiva pues son aspectos que impactan a la salud pública. De estos factores, el tratamiento del cáncer es el que implica mayor coste, hasta los 480 mil pesos mexicanos por paciente por año (Mohar *et al.*, 2009).

Los tratamientos para el cáncer de mama, incluyen: atención médica, cirugías tales como mastectomías y lumpectomías con disección ganglionar y, en algunos casos, cirugías reconstructivas además de quimioterapia y radioterapia, hormonoterapia o la castración de ovarios para suprimir la fuente productora de hormonas. Sin embargo, en los casos anteriores, el tratamiento no es selectivo entre células tumorales y células normales, por lo que es importante plantear estrategias terapéuticas que tengan la capacidad de distinguir entre éstas y así contar con tratamientos más específicos, efectivos y menos agresivos (Chu y Lu, 2008).

El presente trabajo tiene por objeto la evaluación del efecto citotóxico sobre células de cáncer de mama de una fracción proteica del frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*). Esta leguminosa tiene características que le permiten resistir condiciones de sequía y plagas que no presenta el frijol común sin embargo, es poco consumido en el país debido a los largos tiempos de cocción que su dureza obliga a utilizar (González de Mejía *et al.*, 1988; Osman *et al.*, 2003; Reynoso-Camacho *et al.*, 2003).

En nuestro laboratorio se ha estudiado y caracterizado parcialmente una fracción concentrada en lectina (FCL) de este frijol y se encontró que es capaz de afectar el crecimiento de células cancerígenas de forma diferencial (Hernández-Rivera *et al.*, 2007). Al probar una fracción más pura sobre distintas líneas tumorales celulares se encontró actividad citotóxica diferencial (Castañeda-Cuevas *et al.*, 2007; López-Sánchez *et al.*, 2010), sin embargo, dicha fracción contenía sólo el 20% de la actividad aglutinante respecto a la FCL por lo que el estudio de los efectos biológicos de lectinas de frijol Tépari se han continuado con esta última. Por lo anterior, se hace necesario estudiar el efecto citotóxico de la FCL sobre células de cáncer de mama y caracterizar su efecto sobre la muerte celular.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Cáncer

A nivel mundial el cáncer es uno de los problemas de salud que ha ido en aumento. Según la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC), anualmente 12 millones de personas son diagnosticadas con cáncer y 7.2 millones mueren por su causa. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que del año 2007 al 2030 habrá un aumento del 45% en la mortalidad a causa de dicha enfermedad. La OMS también estima que el cáncer podría cobrar la vida de 10.3 millones de personas en el mundo para 2020, afectando a 6.7 millones de personas cada año. En nuestro país la tasa de defunción por tumores tiende a aumentar. De 1998 a 2008 la tasa de mortalidad por cáncer incrementó, del 57.7 a 66.6 por cada 100 mil habitantes. Entre las mujeres el crecimiento fue de 59.6 a 66.7 por cada 100 mil habitantes mientras que, entre los hombres, de 55.6 a 66.5 cada 100 mil habitantes (OMS, 2010). Asimismo, cifras de la UICC revelan que el cáncer de mama es la principal afección neoplásica en mujeres a nivel mundial, lo cual representa el 10% de todos los casos de cáncer y el 23% de los casos de cáncer para el género femenino (Jemal *et al.*, 2009).

En México los tumores malignos se ubican en la tercera causa de mortalidad en general para la población adulta. Por género, para los varones las neoplasias malignas de próstata son la principal causa de muerte y para las mujeres el cáncer de mama. Las estadísticas del INEGI indican que en el 2008 la incidencia de cáncer de mama fue de 14.63 por cada 100 mil mujeres mayores de 15 años de edad siendo este tipo de tumor maligno el primero como causa de su mortalidad. (INEGI, 2011).

2.1.1 Carcinogénesis

El proceso mediante el cual se origina un tumor maligno se llama carcinogénesis y es un proceso complejo que comienza en una célula que va sufriendo transformación y da origen a billones de células que evaden señales de apoptosis

e inicia con alteraciones del ADN, ya sea consecuencia de errores aleatorios, exposición a carcinógenos o defectos en los procesos de reparación. Son dos los mecanismos fisiopatológicos característicos del cáncer, el primero es la proliferación autónoma, lo que significa que la célula se multiplica sin obedecer a señales externas y la segunda característica es la capacidad de invadir tejidos a distancia lo que se conoce como metástasis (Fenton y Longo, 2002). La patología del cáncer incluye tres etapas con cambios bioquímicos y morfológicos. Éstas son la iniciación, la promoción y la progresión (Oliveira *et al.*, 2007):

- ❖ **La iniciación:** Implica un daño que de no ser reparado por los mecanismos propios de la célula se fijara de forma permanente y transmisible en el ADN de una célula que, de no ser reparado, se fijará como una mutación. La frecuencia con la que ocurre este evento es 1 en 10,000 (Torroela y Villa, 1998). Las células iniciadas aún no son malignas pero han dado el primer paso en el proceso de la carcinogénesis ya que estarán afectadas con mutaciones puntuales. Sin embargo, desde una perspectiva fenotípica, las células iniciadas son iguales a las células normales lo que las llevará a proliferación sin diferenciación. Al parecer, la mayoría de las células iniciadas permanecerán en esta etapa sin avanzar a las etapas siguientes y pueden permanecer latentes por semanas, meses o años incluso pueden permanecer quiescentes indefinidamente (Pitot, 1993).
- ❖ **La promoción:** Es la etapa donde ocurre la expansión clonal a partir de la célula iniciada. La promoción requiere de la presencia continua del agente promotor durante un tiempo prolongado. Durante esta etapa las células “promovidas” adquieren características que les darán ventajas sobre las células normales. Están a un solo paso de tornarse malignas y se caracterizan por presentar aumento de proteasas específicas, alteraciones en la diferenciación, en el crecimiento celular y en las membranas celulares, pérdida de la inhibición por contacto y disminución del requerimiento de factores de crecimiento. Esta es la etapa donde se forma la neoplasia es decir, el tumor. Sin embargo, las células que constituyen el clon tumoral no se han malignizado del todo y una sustancia promotora no tiene efecto cancerígeno sobre una

célula si antes no actúa sobre ella un iniciador o mutágeno químico, físico o viral (Torroela y Villa, 1998; Oliveira *et al.*, 2007).

- ❖ **La progresión:** Es la etapa donde se pasa de la lesión tumoral a la enfermedad cancerosa. Se explica mediante la aparición secuencial de subpoblaciones cada vez más aberrantes genéticamente y de una heterogeneidad celular incrementada dentro del clon neoplásico. Las células sufren cambios genéticos progresivos tales como aneuploidía, pérdida de alelos y amplificación génica. La progresión es la fase de malignización en donde el crecimiento tumoral adquiere autonomía que puede llevar a la invasión y la metástasis con cambios bioquímicos, metabólicos y morfológicos. En la progresión están implicados factores de vascularización tumoral, factores inmunológicos, genéticos, endocrinos y metabólicos (Hanahan y Weinberg, 2000).

Las células normales se encuentran bien diferenciadas, proliferan fielmente, obedecen señales para morir controladamente por apoptosis, ya sea cuando están dañadas o cuando su reloj biológico se los indica y se adhieren entre sí para formar tejidos que poseen una forma regular y ordenada. En el lado opuesto, las células cancerosas poseen una morfología pobremente diferenciada, se reproducen autónomamente y evaden las señales apoptóticas además de invadir órganos (Davies *et al.*, 2011).

Para lograr esto, las células cancerígenas van adquiriendo características únicas a lo largo de su paso por las diferentes etapas del proceso de carcinogénesis entre las que se encuentran: la inmortalización, la proliferación independiente de señales, la evasión de la apoptosis y la capacidad de invadir tejidos a distancia es decir, hacer metástasis. Dos de las características que más dificultan que el tratamiento contra el cáncer sea efectivo son: la capacidad de evadir señales de muerte y la proliferación indefinida de las células tumorales. Por lo anterior, estas características son blancos para la intervención terapéutica en todos los tipos de cáncer pero los mecanismos por los cuales ocurren son diversos y el éxito de un tratamiento depende en gran manera de incidir en ellos (Evan y Vousden, 2001).

2.1.2 Evasión de la apoptosis

La muerte celular es un proceso natural y necesario para el mantenimiento de la vida. Existen diversos tipos de muerte celular conocidas: la apoptosis (muerte celular silenciosa), que se manifiesta con condensación nuclear y reducción del volumen citoplasmático, con fragmentación celular tardía y fagocitosis; la autofagia que conlleva degeneración y vacuolización autofágica del citoplasma; la opsonización proceso mediado por el sistema inmunológico que al reconocer una célula como extraña la marca con un anticuerpo seguida de fagocitosis; y la necrosis que se caracteriza por una desintegración general con pérdida de los organelos y la liberación del contenido citoplasmático a su alrededor con daño a las células adyacentes (De Toro, 2006; Benach, 2011). Los tratamientos utilizados con más frecuencia para el tratamiento del cáncer son la quimioterapia y la radioterapia la base de estos reside en la toxicidad que provocan y buscan la inducción de muerte celular, cabe decir que la gran mayoría de dichos tratamientos no son parte de una terapia dirigida es decir son poco selectivos por lo que no solo afectan a las células malignas sino también a las células normales provocando necrosis. A pesar de que el resultado final es el mismo tanto para la apoptosis como la necrosis, los procesos difieren significativamente. Mientras que en la apoptosis las células participan al activar la cascada bioquímica que resultará en su muerte, en la necrosis la muerte celular ocurre en condiciones adversas que implican cambios en el medio ambiente celular y muerte celular descontrolada (Nanji y Hiller-Sturmhöfel, 1997).

El proceso apoptótico se lleva a cabo por medio de señales específicas e incluyen cambios distintivos a nivel celular, llevando a una muerte controlada sin daño a las células vecinas. La familia de proteínas llamadas caspasas juegan un papel primordial como ejecutoras del proceso apoptótico y son activadas en etapas tempranas de la apoptosis. Existen dos vías de activación de las caspasas (Figura 1) (Elinos-Baez *et al.*, 2003):

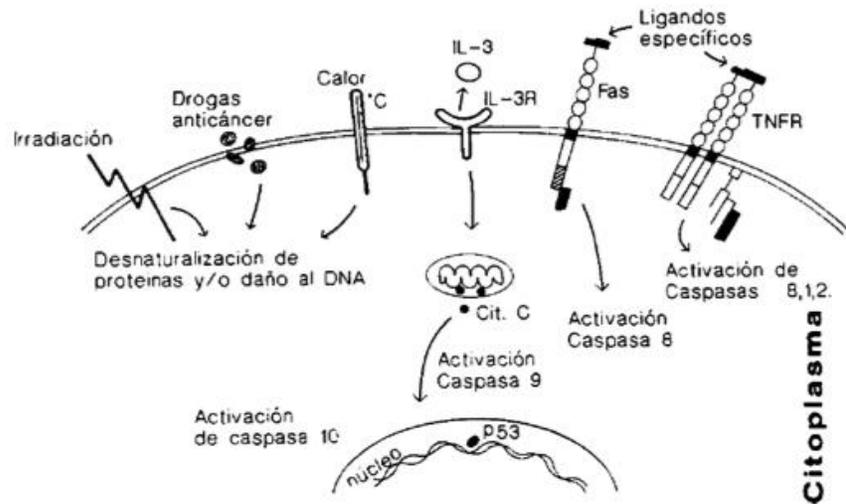


Figura 1. Diferentes Vías de activación de la apoptosis (Elinos Baez *et al.*, 2003)

1. La primera, llamada vía extrínseca, sucede en la membrana celular y depende los denominados factores de la muerte que actúan a través de receptores desencadenan la formación de un DISC (complejo de iniciación de señalización de la muerte, por sus siglas en inglés). Este DISC genera una señal que recluta caspasas iniciadoras en la membrana de la célula. Una variación de esta cascada es la privación de factores de crecimiento, que también genera señales a partir de la membrana hacia la mitocondria. Dos familias de receptores se asocian a esta vía, Fas y TNFR (Receptor del Factor de Necrosis Tumoral, por sus siglas en inglés) los cuales, una vez unidos a su ligando, inducen una transmisión de señal a través de su dominio transmembranal al dominio citoplasmático del receptor. Éste sufre un cambio conformacional que favorece su fosforilación por una de las cinasas asociadas a ese receptor, que a su vez fosforila a los adaptadores FADD (dominio de la muerte asociado a Fas) o TRADD (dominio de la muerte asociado a TNFR) para activar las procaspasas 8 y 10 y así iniciar la cascada de caspasas activas.
2. La segunda conocida como la vía intrínseca, involucra directamente a la mitocondria. Ésta es regulada por la familia Bcl-2 cuyos miembros apoptóticos más estudiados son, Bax, Bid, Bad, Bak, Bcl-Xs y sus

miembros antiapoptóticos son Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, Bcl-w, BRAG-1. El balance en la expresión de estas proteínas determina que inicie o no el proceso apoptótico. Cuando las proteínas proapoptóticas de esta familia están activas se inicia la transición del poro de la membrana mitocondrial con la consecuente liberación del citocromo C al citosol. A su vez, se forma un complejo proteico llamado apoptosoma y de manera directa activa a la caspasa 9 la cual activará a la Caspasa 3 efectora desencadenando la apoptosis.

Una vez iniciada la apoptosis, comienza el rompimiento de estructuras y componentes celulares requeridos para una función celular normal, tales como el citoesqueleto, proteínas nucleares y enzimas reparadoras de ADN. A su vez, las caspasas pueden activar otras enzimas conocidas como DNAsas las que comienzan con la degradación de ADN (Budiharjo *et al.*, 1999).

Las caspasas efectoras más abundantes son las 3, 6 y 7. De éstas, la caspasa 3 es la última, responsable de la mayoría de los efectos apoptóticos, ya que es la caspasa efectora más importante. Es activada por la vía intrínseca de la apoptosis que se ejecuta como respuesta a daño del ADN acompañado de la liberación de citocromo C en las mitocondrias. Adicionalmente la caspasa 3 se activa por la vía extrínseca de la apoptosis mediada por los receptores de la muerte convirtiéndose en pieza clave para la muerte apoptótica (Fan *et al.*, 2005). Por otro lado, la necrosis es un proceso de muerte celular totalmente descontrolado, obedece a circunstancias inesperadas que lesionan la membrana celular de tal manera que inducen a una muerte patológica, con la consecuente reacción inflamatoria que daña a las células vecinas. La necrosis se caracteriza por una pérdida de las funciones metabólicas y de la integridad de la membrana celular que resultan en una descarga de componentes celulares a los tejidos adyacentes (Nanji y Hiller-Sturmhöfel, 1997). Entre los componentes celulares liberados al medio se halla la enzima deshidrogenasa láctica o LDH (del inglés lactate dehydrogenase), una enzima citoplasmática presente tanto en animales como en plantas que cataliza la conversión de lactato a piruvato y la cual se acumula en el medio de cultivo

cuando las células pierden la integridad de la membrana celular por citotoxicidad (Montaner, 2007)

La evasión de la apoptosis es un mecanismo tumoral que se logra por medio de mutaciones donde se encuentran implicados la acción de oncogenes y genes supresores de tumores (Hanahan y Weinberg, 2000). Está documentado que gran parte de las células cancerígenas poseen mutaciones en p53, un gen supresor de tumores el cuál, en presencia de daño en el ADN, se activa como factor de transcripción e induce arresto en ciclo celular y reparación del daño y, en caso de ser un daño irreparable, promueve la muerte celular. Con respecto a p53 se observan mutaciones significativas en cáncer de mama, lo que han llevado a interesarse en él como posible blanco terapéutico (Harris y Levine, 2005; Lacroix *et al.*, 2006).

Las células también elevan la expresión del gen denominado myc, el cual es un inductor potente de la apoptosis en condiciones adversas como el estrés celular, daño en el ADN, o cuando los niveles de factores de supervivencia son bajos; incluso myc, puede mejorar la sensibilidad de las células tumorales a la señalización de la apoptosis a través de la vía extrínseca. Pero los efectos proapoptóticos de myc son alterados por factores exógenos, por ejemplo, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) que, en conjunto con los estrógenos, tiene un potencial mitogénico para las células epiteliales de mama e induce progresión en el ciclo celular (Mawson *et al.*, 2005). Myc también es afectado por la sobreexpresión de factores anti-apoptóticos Bcl-2, así como por la interrupción de señales de la muerte vía FAS (Vogelstein y Kinzler, 1994). Asimismo, las células cancerosas pueden escapar de la programación de apoptosis por sobreexpresión en la expresión de un receptor señuelo para el ligando FAS que puede impedir la activación de su receptor (Hanahan y Weinberg, 2000).

2.1.3 Proliferación autónoma

Las células normales no proliferan autónomamente, entran al ciclo celular sólo cuando son instruidas para hacerlo por señales mitogénicas. Estas señales las despiertan de su estado quiescente a la proliferación activa; dicho proceso se realiza mediante rutas de señalización específicas que influyen en la expresión génica y en la fisiología celular. Las células tumorales no esperan a tener dicha señal para proliferar, más bien tienen un sistema autócrino que las hará proliferar de forma indefinida (De Berardinis *et al.*, 2007). Se ha encontrado que las células tumorales tienen altamente conservada la ruta PI3K/Akt/mTOR (Figura 2).

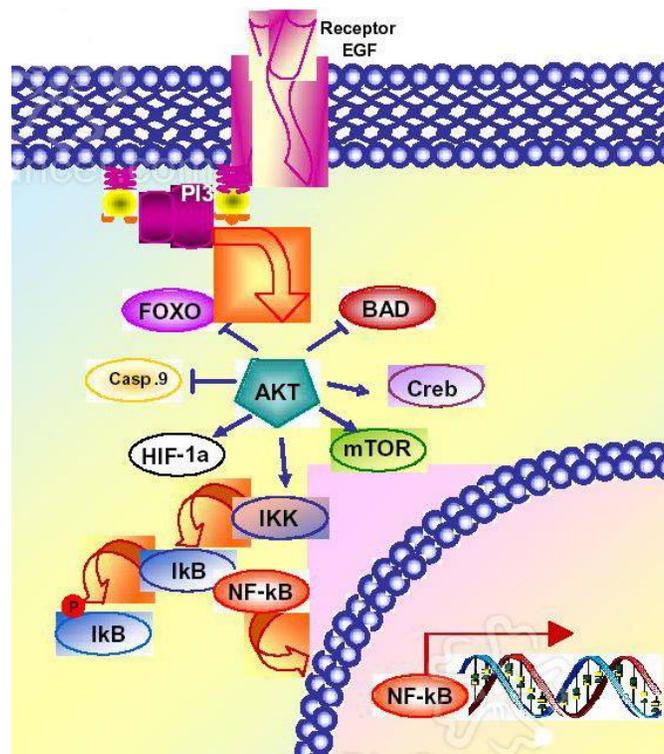


Figura 2. Ruta de señalización PI3K/Akt/mTOR (<http://www.biocancer.com>)

En muchos casos esta ruta actúa de forma incontrolada y dispara una cascada de respuestas que llevará a la célula a la proliferación constante, mejorando las actividades metabólicas celulares y dotando de elementos para el crecimiento celular (Vivanco y Sawyers, 2002; Osaki *et al.*, 2004). También las células

malignas poseen una señalización elevada y persistente de los oncogenes myc y ras, lo que conduce a la proliferación celular y abre la puerta para la tumorigénesis. Básicamente cada uno de los controles de la proliferación se encuentran alterados en las células tumorales (Liu *et al.*, 2009).

2.2 Cáncer de Mama

El cáncer de mama es la principal causa de muerte a nivel mundial debido a tumores para las mujeres (OMS, 2010). Para las mujeres hispanas la neoplasia maligna de mama es que se diagnostica principalmente y la de mayor mortalidad (ACS, 2009). En nuestro país el cáncer de mama ocasiona más muertes que el cáncer cérvicouterino desde el 2006. Es la segunda causa de muerte en mujeres de 30 a 54 años, los datos sobre su detección están sub-reportados y muestran 6,000 casos nuevos en 1990 contra los 16,500 que se prevén para el 2020 (Knaul *et al.*, 2008). Para el 2008, la incidencia de cáncer de mama fue de 14.63 por cada 100 mil mujeres de 15 años y más resultando importante la magnitud de este padecimiento en la población femenina. En cuanto a las defunciones, el tumor maligno mamario tiene el mayor porcentaje en la población femenina (INEGI, 2011).

2.2.1 La glándula mamaria

La glándula mamaria se ubica como una masa oval entre la segunda y sexta costilla, está constituida de dos elementos: los acinos glandulares, donde se produce leche y los ductos, que son estructuras tubulares y huecas, ramificadas en forma de árbol que confluyen de manera progresiva hasta terminar formando parte de los conductos galactóforos. Estos últimos son dilataciones ductales situados detrás del pezón cuyo número va de los 15 a 20 lóbulos teniendo cada uno de ellos independencia funcional (Figura 3) (Latarjet y Ruiz Liard 1999).

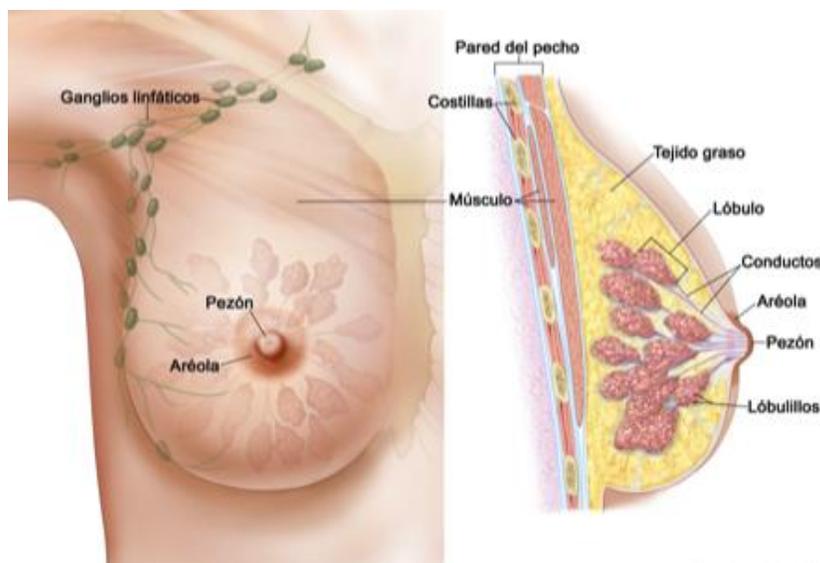


Figura 3. Anatomía de la glándula mamaria (<http://www.meb.uni-bonn.de>)

2.2.2 Tipos de cáncer de mama

La mayoría de las neoplasias mamarias son tumores epiteliales desarrollados a partir de células que recubren los conductos o lobulillos y menos frecuentes son los tumores del estroma. Los cánceres se dividen en carcinomas *in situ* donde la proliferación se circunscribe a conductos (ductal) y lobulillos (lobular) y carcinoma invasor, que principalmente es un adenocarcinoma de tipo ductal infiltrante. De forma menos común se pueden encontrar tumores medulares, mucinosos y tubulares. El cáncer de mama se extiende de forma inicial por los ganglios linfáticos cercanos, la circulación sanguínea o de ambas maneras y así pueden llegar a casi cualquier órgano del cuerpo (Mallon *et al.*, 2000).

2.3 Tratamientos actuales contra el cáncer

El final que se persigue en el tratamiento del cáncer es propiciar la muerte de las células malignas. Los tratamientos actuales para el cáncer de mama incluyen, además de la cirugía, quimioterapia y radioterapia; ambos basados en la toxicidad. La quimioterapia es una combinación de medicamentos que pueden destruir incluso células que se han diseminado a distancia del tumor inicial. Los

medicamentos de quimioterapia funcionan al atacar a las células que se están dividiendo rápidamente, razón por la cual funcionan contra las células cancerosas. Sin embargo, otras células en el cuerpo tales como aquellas en la médula ósea, el revestimiento de la boca y los intestinos, así como los folículos pilosos también pueden ser atacadas. Dentro de los efectos secundarios se encuentran en mayor o menor grado: la caída del cabello, llagas en la boca, pérdida o aumento de apetito, náuseas y vómitos, un aumento en el riesgo de contraer infecciones (debido a un recuento bajo de glóbulos blancos), fácil formación de hematomas o hemorragias (debido a un recuento bajo de plaquetas), cansancio (debido a bajos niveles de glóbulos rojos y otras razones) (ACS, 2011).

La radiación, por su parte, funciona utilizando ondas de alta energía radioactiva ya sea rayos X o gamma. La radiación se concentra en el área afectada por el cáncer y elimina células cancerosas dañándolas o destruyéndolas. Algunos de los principales efectos secundarios a corto plazo de la radioterapia externa son inflamación y pesadez del seno, cambios en la piel del área tratada (que son similares a las quemaduras solares) y cansancio (ACS, 2011).

Últimamente existen tratamientos dirigidos de forma más específica con inhibidores de tirosin cinasas y anticuerpos monoclonales encaminados a la inhibición de factores que sustentan la proliferación celular, los cuales han demostrado ser más eficaces y menos tóxicos que los tratamientos tradicionales. Un ejemplo de este tipo de terapia es la inhibición del receptor del factor de crecimiento epidérmico (HER-2). Estos medicamentos dirigidos funcionan de manera distinta a los que se usan comúnmente en la quimioterapia. Generalmente originan diferentes efectos secundarios y suelen ser menos severos y se usan a menudo en conjunto con la quimioterapia (Chu y Lu, 2008).

En los últimos años se ha incrementado el interés por estudiar moléculas vegetales que pueden participar en el tratamiento contra el cáncer. Las plantas contienen numerosos componentes activos y fitoquímicos que pueden incluso alterar las rutas bioquímicas asociadas con la iniciación, promoción o progresión

del cáncer. Entre estos compuestos vegetales en los que hay gran interés se encuentran las lectinas, las cuales representan un grupo biológicamente activo de glicoproteínas que han demostrado tener actividad anticarcinogénica en estudios *in vitro* e *in vivo* (Abdullaev y González de Mejía, 1997). Actualmente se les sigue estudiando como potenciales agentes en el tratamiento de las patologías tumorales (Ferriz-Martínez *et al.*, 2010)

2.4 Lectinas y cáncer

Existen estudios donde se han asociado específicamente el consumo de ciertos tipos de alimentos con el desarrollo de neoplasias en particular, pero también hay investigación sobre componentes de alimentos que han mostrado citotoxicidad sobre células malignas (Torres-Sánchez *et al.*, 2009). Entre los componentes de plantas conocidos como fitoquímicos más estudiados se encuentran las lectinas vegetales que han demostrado tener actividad antitumoral y anticarcinogénica (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).

A finales del Siglo XIX, Stillmark inició el estudio de la primera lectina vegetal en extractos de semillas de *Ricinus communis* (RCA) al descubrir el fenómeno de hemoaglutinación de los eritrocitos. La primera lectina que se obtuvo de forma cristalina fue la concavalina A del frijol *Canavalia ensiformis* en 1919 por James B Summer. El término lectina lo introdujo Boyd en 1954 (Hernández *et al.*, 1999). En la mayoría de las plantas las lectinas están presentes en los cotiledones y endospermos de las semillas y representan de un 2 a un 10 % del total de proteína de estas (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005; Ferriz-Martínez *et al.*, 2010).

El término lectina, del latín *legere* que significa escoger, hace referencia a un grupo de glicoproteínas de origen no inmunológico que poseen la capacidad unirse a carbohidratos de membrana con alta selectividad pues poseen al menos un dominio de reconocimiento para azúcares (Gallego *et al.*, 2006). Las lectinas se encuentran en todo tipo de organismos, incluyendo animales, plantas, hongos, bacterias y virus. Las lectinas cumplen con toda una gama de funciones ya sea como mecanismos de defensa, reconocimiento celular, control de proliferación o

apoptosis, diferenciación celular, adhesión celular, señalización en interacciones célula-célula entre otras funciones (Ferriz-Martínez *et al.*, 2010).

Por esta capacidad selectiva, las lectinas se han utilizado como herramientas útiles en el campo de la bioquímica, biología celular e inmunología ya sea con propósito diagnóstico o terapéutico (Sharon y Lis, 2002). Se han empleado en la detección de anomalías cromosómicas, marcadores fluorescentes para estudiar cambios estructurales en los glicoconjugados presentes en las superficies celulares y la detección de células que se han malignizado, por mencionar algunas (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).

Las lectinas reconocen azúcares libres o residuos de polisacáridos, glicoproteínas o glicolípidos y se unen a receptores de membrana celular (González de Mejía y Prisecaru, 2005). Es importante decir que las lectinas de leguminosas reconocen a un número limitado de azúcares que incluyen los monosacáridos D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, L-Fucosa; a dos aminoazúcares, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina y a los cetozúcares D-fructosa y L-sorbosa estos dos últimos debido a su relación estructural con monosacáridos reactivos. No se ha reportado alguna que reconozca pentosas, aunque la Concanavalina A se une a D-arabinosa con baja afinidad (Goldstein, 2002).

De forma particular, las lectinas tienden a aglutinar a las células a las cuales se unen, incluyendo a células tumorales. Hay evidencia de que las lectinas pueden distinguir entre células normales y células malignas debido a que estas últimas tienen diferencias a nivel de su superficie. Lo anterior se debe a que las células tumorales despliegan patrones de glicosilación aberrantes ligados a ceramidas y a proteínas de superficie de membrana. Según el tipo de cáncer, las membranas celulares presentan diferentes alteraciones dependiendo del estadio tumoral. Dos de los principales cambios en la glicosilación de células cancerígenas descritas hasta ahora son: el bloqueo de la síntesis de carbohidratos o de la neosíntesis (Ferriz-Martínez *et al.*, 2010).

La glicosilación de la membrana celular está relacionada tanto a glicoproteínas como glicolípidos de la superficie celular y juega múltiples papeles en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. En la transformación maligna suceden glicosilaciones aberrantes involucradas en la progresión e invasión tumoral. Parte de los cambios estructurales que marcan la diferencia entre células cancerígenas y normales son los cambios en la composición membranal con sobreexpresión de glúcidos (Davies *et al.*, 2011). Por citar un ejemplo, la fucosa es un monosacárido asociado con glicosilaciones que se sobreexpresan en muchos tumores malignos (Yuan *et al.*, 2008). Lo anterior sugiere que los carbohidratos de membrana juegan un papel crítico incluso en la metástasis a distancia relacionada con interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Nakahara y Abraham, 2008). Es importante también señalar que los cambios en los patrones glicosídicos celulares difieren en cada tipo de cáncer y en diferentes etapas de la enfermedad (Cummings, 2008).

2.4.1 Lectinas de leguminosas

Las lectinas de leguminosas representan la familia más estudiada, esto se debe por una parte a que son relativamente fáciles de obtener y purificar, además de contar con una gran selectividad de unión a azúcares. Más aún, la estructura de las lectinas de leguminosas es similar a la de lectinas de otra fuentes, por lo que los resultados de los estudios de éstas pueden aplicarse a lectinas de diversas familias (Sharon y Lis, 2002). La mayoría de las lectinas se han aislado de semillas donde llegan a representar hasta el 10% del contenido total proteico, donde quizás cumplan una función de reserva, principalmente en los cotiledones y endospermos de las semillas (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).

Se han aislado cerca de 100 tipos de lectinas de esta familia. Generalmente están constituidas por dos a cuatro subunidades, contienen un sitio de unión para iones metálicos Ca^{2+} , Mn^{2+} o Mg^{2+} . Cada subunidad contiene aproximadamente 250 aminoácidos y se parece mucho a las otras subunidades. Están constituidas por doce hojas β antiparalelas conectadas entre si mediante bucles, lo que genera una

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

Estudios con algunas lectinas han mostrado una aglutinación mayor sobre células cancerígenas que sobre células sanas del mismo tipo. Esto se debe a su capacidad de reconocimiento sobre las variaciones de la membrana celular, lo que convierte a las lectinas en foco de atención con futuro promisorio tanto en el diagnóstico, como en el tratamiento del cáncer (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005). En el Cuadro 1 se muestra un resumen de estudios que han evaluado el efecto citotóxico de lectinas vegetales sobre células cancerígenas. Para explicar el efecto antitumoral de las lectinas a nivel bioquímico y molecular, se proponen diferentes mecanismos de acción, incluida la inducción de apoptosis, citotoxicidad e inhibición de la proliferación tumoral. Estas acciones tienen que ver con el enlace de la lectina a los carbohidratos de la membrana, a pesar de que este enlace es reversible y débil, los muchos sitios de unión dan como resultado un enlace fuerte (González de Mejía y Prisecaru, 2005).

Un primer mecanismo describe la unión de las lectinas a moléculas de adhesión de la superficie (epCAM) que participan en una gran variedad de señales de traducción que son importantes para la regulación celular. Este es el caso de la aglutinina *Vicia fabba* (VFA), la cual estimuló la diferenciación de células de cáncer de colon pero cuya acción fue truncada por un anticuerpo monoclonal contra epCAM (González de Mejía y Prisecaru, 2005).

Un segundo mecanismo sugiere que la lectina se internaliza en la célula y afecta el proceso celular fundamental para la división celular. Un tercer mecanismo explica que la lectina induce apoptosis por diversas vías: 1) Dependiente de la activación intracelular de la caspasa 8/FLICE requiriendo la internalización de la lectina e involucra su actividad inhibitoria ribosomal y de la síntesis de proteínas, 2) A través de la activación de la caspasa 3 y la ruptura de PARP y 3) Por la activación de Bax (acelerador de apoptosis) y la inhibición tanto de Bcl-2

(supresor de apoptosis) como de la telomerasa. Se ha propuesto que las lectinas inducen la muerte celular apoptótica a través de la desfosforilación de Akt en correlación con la inhibición de la actividad de la telomerasa y la activación de la caspasa 3 (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005). También se ha observado que son capaces de estimular el sistema inmunológico, tal fue el caso de la lectina del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) que mostró una acción mitogénica sobre las células inmunitarias además de tener la capacidad de aglutinar las células malignas (Ferriz-Martínez *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Estudios de efectos citotóxico de lectinas vegetales *in vitro* sobre líneas celulares neoplásicas.

Lectina	Mecanismo de acción	Línea Celular
PHA-L (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Inhibición de proliferación	LoVo, HCT-15, SW837
WGA (<i>Triticum vulgare</i>)	Inhibición del proliferación a alta concentración	LoVo, HCT-15, SW837
AAL (<i>Agrocybe aegerita</i>)	Inducción de apoptosis con la actividad de ADNasa	HeLa, SW480, SCG-7901, MGC80-3, BCG-823, HL-60, S-180
AHL (<i>Arisaema helleborifolium</i>)	Inhibición de proliferación	HOP-62, HCT-1,5 HEP-2, HT-29, PC-3, A-549
ACA (<i>Amaranthus caudatus</i>)	Citotoxicidad tumoral	HT-29
JAC (<i>Artocarpus integrifolia</i>)	Citotoxicidad e inhibición tumoral	HT-29
LCA (<i>Lens Culinaria</i>)	Citotoxicidad tumoral	H3B
ML-III (<i>Viscum album</i>)	Citotoxicidad tumoral	Molt-4
RBA (<i>Oriza sativa</i>)	Inhibición de la proliferación y apoptosis	U937
SBA (<i>Glycine max</i>)	Inhibición de proliferación	MCF7, HepG2
SVL (<i>Sauromatum venosum</i>)	Inhibición de la proliferación	WEHI-279, J774, P388D1, A-20, T-47D, SiHa, SW-620, HT-29, HEP-2, OVCAR-5, PC-3
Tepary bean (<i>Phaseolus acutifolius</i>)	Efecto citotóxico diferencial	MCF-7, ZR-75-1, HeLa, Caski, SiHa. C33A, CaCo2
VFA (<i>Vicia Faba</i>)	diferenciación morfológica, inhibición de la proliferación dosis-dependiente	LS174T, SW1222, HT29
WGA (<i>Tricum vulgare</i>)	Diferenciación celular	MCF7, T47D, HBL100, BT20

Adaptado de Castillo-Villanueva *et al.*, 2005; González de Mejía y Prisecaru, 2005; Ferriz-Martínez *et al.*, 2010.

La fitohemaglutinina del frijol común *Phaseolus vulgaris* (PHA) es capaz de reducir el crecimiento de tumores de linfoma no Hodgkin murinos. El índice de reducción del crecimiento ocurrió de forma dosis dependiente sugiriendo la posibilidad de una competencia a nivel intestinal por los nutrientes de un pool común de aminoácidos presentes. Esto sugiere otro posible mecanismo de acción de las lectinas como componentes antinutricios lo que restaría capacidad de crecimiento al tumor (González de Mejía y Prisecaru, 2005).

Hay autores que apuntan a que la unión de las lectinas a los ligandos de la superficie de membrana inicia la internalización de la lectina lo que, algunas veces, conduce a la muerte por la vía de inactivación ribosomal, incapacidad de producir proteínas e iniciar un proceso en cascada que finaliza en apoptosis (Petrossian *et al.*, 2007). Tal es el caso de la lectina ricina donde se observó que después de su unión a receptores membranales por parte de su cadena B, la cadena A sufrió una translocación al citosol al ser endocitada y trasportada al retículo endoplásmico, después de lo cual, inactivó a los ribosomas (Anadon y Martinez-Larrañaga, 2004).

En un estudio reciente sobre los mecanismos anticancerígenos *in vitro* e *in vivo* de una lectina de muérdago coreana, se cuantificó la expresión de diversas procaspasas, proteínas antiapoptóticas y receptores de la muerte. Se observó un aumento en las activación de caspasas 2, 3, 8 y 9, a la vez que disminuyó la expresión de moléculas antiapoptóticas tales como Akt (Lee *et al.*, 2007). Algunos estudios han sugerido que las lectinas disparan cambios moleculares al unirse al glicocalix y dan como resultado la inhibición del crecimiento celular y la inducción de apoptosis en células cancerígenas. Por otro lado, hay trabajos en donde se reporta que las lectinas aumentan la sensibilidad de las células tumorales a drogas, por lo que hay propuestas de utilizarlas en el diseño de inmunotoxinas para el tratamiento del cáncer (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).

2.4.2 Lectinas de frijol Tépari

Aunque el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es la especie de frijol más consumida en nuestro país, la especie *Phaseolus acutifolius*, también conocida como frijol Tépari (Figura 4). Es cultivada en regiones áridas del norte de México, pertenece a la familia Fabaceae, sus nombres comunes son tepary bean (inglés), xmayum (maya, Campeche, México); tépari (español, Sonora, México), escumite o escumite (Chiapas, México) frijol piñuelero (nombre de un híbrido, Costa Rica). Es una especie que ha crecido por un largo tiempo en Mesoamérica, principalmente en zonas desérticas o con un período largo de sequía. Se ha encontrado que creció en tiempos antiguos en el sureste de los Estados Unidos, de donde aparentemente penetró a México (1200 años d. C.) llegando hasta Puebla (5000 años después). La distribución geográfica se extendió hacia Arizona, Nuevo México, Costa Rica y en el suelo subtropical seco del Pacífico (Debouck, 1994). Es particularmente resistente a condiciones áridas y se ha adaptado a sobrevivir resistiendo el ataque de diversos patógenos y microorganismos que normalmente afectan a especies comunes de frijol. Sin embargo, este frijol es poco consumido debido a su dureza, lo que requiere tiempos de cocción largos (González de Mejía *et al.*, 1988; Osman *et al.*, 2003; Reynoso-Camacho *et al.*, 2003).



Figura 4. Planta de frijol Tépari (Hernández-Rivera, 2005)

En nuestro grupo se ha caracterizado parcialmente la lectina (Torres, 2010) estudiado la actividad de fracciones semipuras de lectinas de frijol Tépari. Una fracción obtenida mediante cromatografía de exclusión de peso molecular, denominada fracción concentrada en lectina (FCL) presentó efecto citotóxico diferencial sobre fibroblastos de ratón 3T3 normales y cancerígenos ya que requirió una dosis ocho veces más alta para provocar la muerte en células normales comparadas con las células transformadas (Hernández-Rivera *et al.*, 2007). Posteriormente se probó el efecto citotóxico sobre distintas líneas celulares con una fracción más pura de la lectina obtenida por cromatografía de intercambio iónico y, a pesar de presentar efecto citotóxico diferencial, la actividad de la lectina disminuyó hasta en un 80%. Lo anterior sugiere que el proceso de intercambio iónico disminuye la forma activa de la lectina (Castañeda-Cuevas *et al.*, 2007). Otro trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la FCL de frijol Tépari y sus dos sub-fracciones principales sobre células de cáncer de colon HT-29 y se determinó que el efecto sobre la muerte celular involucra procesos apoptóticos (Ángeles-Zaragoza, 2009).

El estudio de la FCL y la fracción obtenida por intercambio iónico muestran efectos diferenciales sobre la proliferación y sobrevivencia de diferentes tipos de células cancerígenas y normales. Actualmente se han iniciado estudios para determinar el efecto *in vivo* de la FCL sobre cáncer de colon, por lo que es importante determinar el efecto citotóxico de la FCL en otras líneas celulares como las de cáncer de mama ZR-75-1, dada la importancia de este tipo de cáncer en nuestro país.

3. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial y en nuestro país el cáncer de mama se ha convertido en una enfermedad que va en aumento, y su tratamiento es poco selectivo entre células de cáncer y células normales. La importancia del desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en moléculas selectivas reside en que podrían utilizarse para apoyar a los tratamientos convencionales y propiciar la muerte de células de cáncer de forma preferencial.

Los tratamientos actuales para el cáncer basan su efectividad en la toxicidad que provoca la muerte celular indiscriminada mediante necrosis, lo cual genera alta toxicidad incluso para las células no malignas. Las lectinas, por su parte, han demostrado ser capaces de activar vías de señalización de apoptosis celular y es este tipo de muerte celular controlada, lo que convierte a las lectinas en posibles agentes de tratamiento selectivo y menos tóxico en comparación con los tratamientos quimioterapéuticos.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que lectinas semipuras de frijol Tépari presentan acción citotóxica diferencial sobre células de cáncer. Actualmente se trabaja con la FCL en ensayos *in vivo* por lo que resulta necesario probar el efecto de dicha fracción sobre al menos 3 tipos de cáncer *in vitro* ya que los datos actuales se basan en la fracción obtenida por intercambio iónico. Adicionalmente, es necesario determinar la vía mediante la cual la FCL provoca la muerte celular. Lo anterior permitirá establecer los parámetros citotóxicos de la FCL sobre células de cáncer humano y esto posibilitará el desarrollo de estudios *in vivo* posteriores.

4. HIPOTESIS

La lectina contenida en una fracción concentrada (FCL) de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) presenta efecto citotóxico relacionado con la inducción de apoptosis sobre células de cáncer de mama (ZR-75-1)

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar el efecto citotóxico de una fracción concentrada de lectina (FCL) de frijol Tépari sobre células de cáncer de mama ZR-75-1

5.2 Objetivos específicos

1. Elaborar curvas dosis respuesta de la FCL sobre la línea celular ZR-75-1
2. Calcular CI_{50} para la línea ZR-75-1
3. Calcular CL_{50} para la línea ZR-75-1
4. Determinar si existe necrosis, midiendo la enzima lactato deshidrogenasa en medio de cultivo
5. Investigar si se presenta apoptosis, utilizando la cuantificación de la actividad de caspasa 3

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de la fracción concentrada de lectina y perfil electroforético

La fracción concentrada de lectina (FCL) de frijol Tépari se obtuvo mediante cromatografía de exclusión de peso molecular en columna empacada con Sephadex G-75 (Torres, 2010). La cantidad de proteína de cada fracción se determinó mediante la técnica de Bradford (1976) y la actividad aglutinante utilizando eritrocitos humanos tipo A⁺ mediante el método de Jaffé (1980).

6.2 Curvas dosis-respuesta

Se sembraron células de cáncer de mama de la línea ZR-75-1 (ATCC, Manassas VA, USA) (Anexo 1). Las células se sembraron en placas de 24 pozos (3x10⁴ células por pozo), con suero fetal bovino (SFB) al 10% en medio base (DMEM, Gibco suplementado con 62.1 mg/L de Penicilina G (Sigma, cat. N° P-3032), 100mg/L de estreptomina (Sigma, cat. 15290-018) y 2.5 µg/L de anfotericina. Las placas se mantuvieron en incubación a 37°C y en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Pasadas 48 h, el medio fue cambiado por SFB al 2% en el mismo medio base y a las 24 h se inició el experimento. Se procedió a contar las células de dos pozos para determinar el número de células al momento del cambio de condiciones experimentales (Co) y al resto de los pozos se les retiró el medio y se les agregó por duplicado los tratamientos disueltos en DMEM suplementado con albúmina sérica de bovino (ASB) al 0.5% de la manera siguiente (100, 50, 10, 5, 1 y 0.5 µg de proteína/mL). Después de 24 h de incubación se cosecharon las células con tripsina al 0.15% y se determinó el número de células de cada pozo por recuento al microscopio (García-Gasca *et al.*, 2002):

Número total de células = $[N (1 \times 10^4) (C)]/V$. Donde N es el número de células contadas, C es el número de campos contados en el hemocitómetro, 1×10^4 es el factor de dilución del hemocitómetro y V es el volumen en mL de la suspensión celular.

La proliferación celular se calculo de acuerdo a la ecuación:

$$\%P = [\text{Número de células en el tratamiento} \times 100] / \text{número de células del control en ASB } 0.5\%$$

La sobrevivencia celular se calculo mediante la ecuación:

$$\%S = [\text{Número de células en el tratamiento} \times 100] / \text{número de células del control inicial}$$

Posteriormente se llevaron a cabo regresiones lineales del logaritmo de la concentración contra el porcentaje de proliferación o sobrevivencia, según el caso, para obtener las concentraciones inhibitoria 50 (CI₅₀) y letal 50 (CL₅₀), respectivamente.

6. 3 Marcadores de necrosis y apoptosis celular

Ensayo de citotoxicidad. La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se emplea como marcador de necrosis celular. En una placa de 24 pozos se sembraron células ZR-75-1 a una concentración de 3×10^4 células/mL. Después de 48 horas se cambiaron las condiciones del cultivo con DMEM suplementado con SFB al 2% y a las 24 horas se trataron a las células con la CL₅₀ de la FCL en DMEM al 0.5% de ASB y se incubaron por 46 24 horas. Posteriormente, a 2 pozos de ASB se les agregó Tritón X-100 (JT Baker, cat N° X198-07) al 1% en DMEM 0.5% ASB y se incubaron a 37°C durante 30 min. Para cada tiempo se obtuvieron los medios condicionados y se utilizó el kit LDH-Cytotoxicity Assay (Biovision, cat. N° K311-400) para evaluar el efecto citotóxico de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron leídas al espectrofotómetro a 492 nm para determinar su densidad óptica. El porcentaje de citotoxicidad se calculó con base en la actividad enzimática de LDH, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{Citotoxicidad} = [\text{Tratamiento} - \text{Control en ASB}] \times 100 / \text{Control alto} - \text{Control en ASB}].$$

Donde el control alto fue el tratamiento con tritón X-100 al 1%.

Ensayo de caspasa 3. Con la finalidad de evaluar el efecto apoptótico de la FCL se empleó el kit de caspasa 3/ CPP32 Colorimetric Assay Kit (BioVision, cat. N° K106-100). Se sembraron 3×10^5 células en cajas de cultivo de 60 mm, en medio con SFB al 10% y se mantuvieron en incubación a 37°C y en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Cuando los cultivos alcanzaron el 70% de confluencia, la tercera parte se trató con la CL₅₀ del concentrado de lectina, otra tercera parte con Camptotecina 5 µM, y una última parte con ASB 0.5%, durante 8 horas. Las células se recuperaron mediante tripsinización y centrifugación a 6000 g durante 5 min. Una vez recuperadas, se obtuvo el extracto citosólico mediante la técnica indicada en el kit de Caspasa 3/ CPP32 (BioVision®). Los extractos obtenidos se leyeron en el espectrofotómetro a 400 nm para determinar la cantidad de caspasa 3 de la manera siguiente:

$$\text{Actividad de caspasa 3 por célula} = \frac{(\text{absorbancia} / \mu\text{g de proteína total})}{(\text{Número de células} / \mu\text{g de proteína total})}$$

Una vez obtenida la actividad de caspasa 3 por célula, se ajusto la actividad respecto al grupo control (ASB), con lo que se obtuvo un índice comparativo.

6.4 Análisis estadístico

Las curvas dosis-respuesta se analizaron mediante regresión lineal simple. Los datos experimentales de dosis-respuesta y LDH se analizaron mediante ANOVA de una vía y se compararon las medias por los métodos de Tukey ($p \leq 0.05$) y Dunnett ($p \leq 0.05$). Los datos experimentales de caspasa 3 se analizaron mediante t de student para muestras independientes ($p \leq 0.05$).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Efecto sobre la proliferación celular

La FCL utilizada presentó una actividad aglutinante específica de 3,746 UA/mg de proteína (Ángeles, 2010). El efecto de la FCL sobre la proliferación celular se muestra en la Figura 5 en donde se observó un efecto diferencial en función de la concentración. El porcentaje de proliferación se calculó en base a las células control tratadas únicamente con DMEM-ASB 0.5%, las concentraciones más bajas probadas no mostraron efecto mientras que a partir de 10 µg de proteína/mL el efecto fue negativo respecto al control. La CI_{50} se calculó por medio de regresión lineal, la cual presentó un valor de 23.23 µg de proteína/mL (87.02 UA/mL). Este efecto es similar al encontrado por Castañeda (2007) para la misma línea celular en donde se probó una fracción semipura de lectina de frijol Tépari obtenida a partir de la FCL mediante cromatografía de intercambio iónico (FL-CII) (López, 2007). En ese caso la CI_{50} fue de 57.39 UA/mL, 50% más baja que la obtenida en el presente trabajo, lo que sugiere que el grado de pureza de las lectinas es un factor importante para recuperar la actividad biológica.

Esta misma FCL se probó sobre células de cáncer de colon HT-29 en donde se encontró una CI_{50} de 143.15 µg de proteína/mL (536.24 UA/mL) (Ángeles, 2010) es decir, 6 veces mayor a los resultados obtenidos para la línea ZR-75-1. Lo anterior sugiere que las células de cáncer de mama ZR-75-1 son más sensibles al efecto de la fracción de lectina que las células HT-29 de cáncer de colon. Esto difiere de resultado encontrado con la FL-CII en donde las células CaCo2 de cáncer de colon fueron 32 veces más sensibles que las células ZR-75-1 (Castañeda-Cuevas *et al.*, 2007).

Efectos similares se han observado para otras líneas celulares. Valadez-Vega *et al.* (2011) obtuvieron una fracción de lectinas de frijol Tépari mediante cromatografía de afinidad y realizaron un estudio sobre distintas líneas celulares tumorales y obtuvieron una CI_{50} para células de cáncer de cervix C33-A de 400 µg de proteína/mL. Con la FL-CII se obtuvo para esta misma línea celular una CI_{50} de

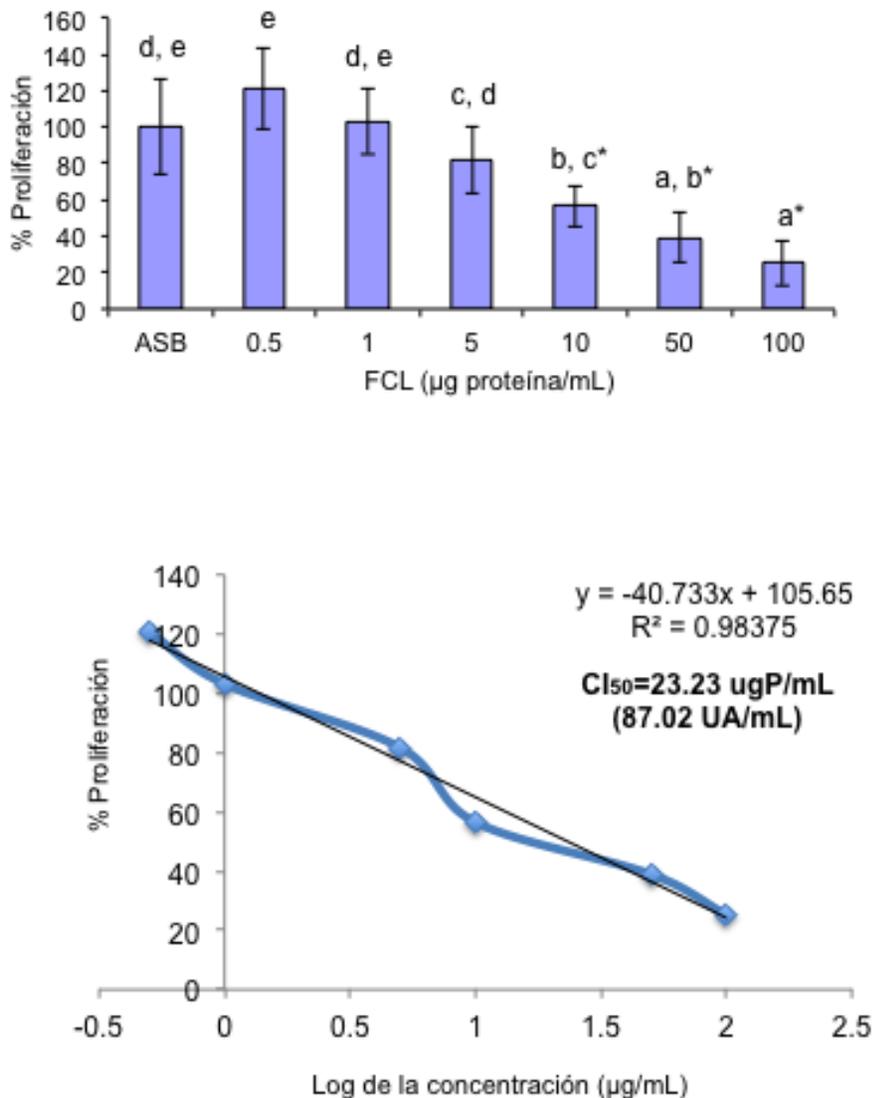


Figura 5. Efecto de la FCL sobre la proliferación de células de cáncer de mama ZR-75-1. Las células fueron sembradas (3×10^4 células/pozo) en placas de 24 pozos y a las 48 h se sensibilizaron con DMEM 2% SFB y 24 h después se cambiaron condiciones con DMEM al 0.5% ASB o diferentes concentraciones de la lectina en ese mismo medio (0.5, 1, 5, 10, 50, 100 µg proteína/mL). Después de 24 h las células se cosecharon y se contaron con un hemocitómetro. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas respecto al control (Dunnett, $p \leq 0.05$). La CI_{50} se calculó mediante regresión lineal del porcentaje de proliferación contra el logaritmo de la concentración.

6.91 µg de proteína/mL, 57 veces menor que la reportada por Valadez-Vega *et al.* (2011). Este resultado sugiere que las lectinas biológicamente activas se separan preferencialmente mediante los métodos cromatográficos desarrollados por López (2007) y Torres (2010).

7.2 Efecto sobre la sobrevivencia celular

Para calcular la sobrevivencia celular se tomó como base el número de células al inicio del experimento (control inicial) y se observó un efecto en función de la concentración (Figura 6). Las concentraciones más bajas probadas hasta 5 µg de proteína/mL resultaron citostáticas incluyendo al control con ASB y a partir de 10 µg de proteína/mL se detectó efecto fue citotóxico. La CL_{50} se calculó por medio de regresión lineal y fue de 10.23 µg de proteína/mL (38.32 UA/mL). Este dato es menor a la CI_{50} lo cual sugiere que el efecto predominante es sobre la sobrevivencia celular y no sobre la capacidad proliferativa. En este caso es necesario considerar que al retirar el SFB del medio y suplementar con ASB se empobrece la condición nutricia y esto puede mermar la velocidad de proliferación celular.

De forma similar, la FCL se utilizó para determinar el efecto sobre la sobrevivencia de células HT-29 bajo las mismas condiciones experimentales y se obtuvo una CL_{50} de 922 UA/mL (Ángeles, 2010). Este valor confirma que las células ZR-75-1 son 24 más sensibles que las HT-29 al efecto de la FCL de frijol Tépari, lo cual, a su vez, confirma la especificidad de cada lectina por cierto tipo de células tumorales y esto se apoya en los trabajos reportados sobre diferentes lectinas contra el cáncer (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).

Al comparar las CL_{50} obtenidas con la FCL y la FL-CII para esta misma línea celular se observa que, en el segundo caso, el valor fue de 72.74 UA/mL (López-Sánchez *et al.*, 2010), el doble que para el caso de la FCL. Este resultado sugiere que la FCL contiene mayor actividad citotóxica que la FL-CII, posiblemente por efecto sinérgico de las lectinas que conforman a la FCL.

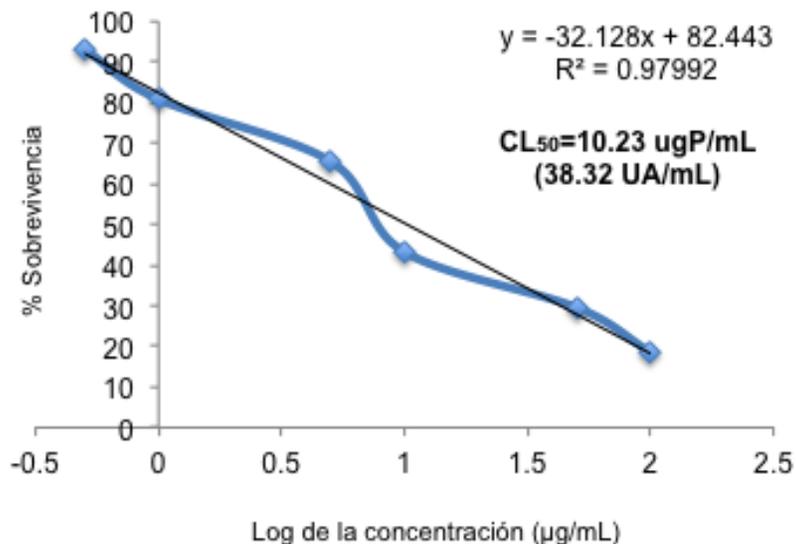
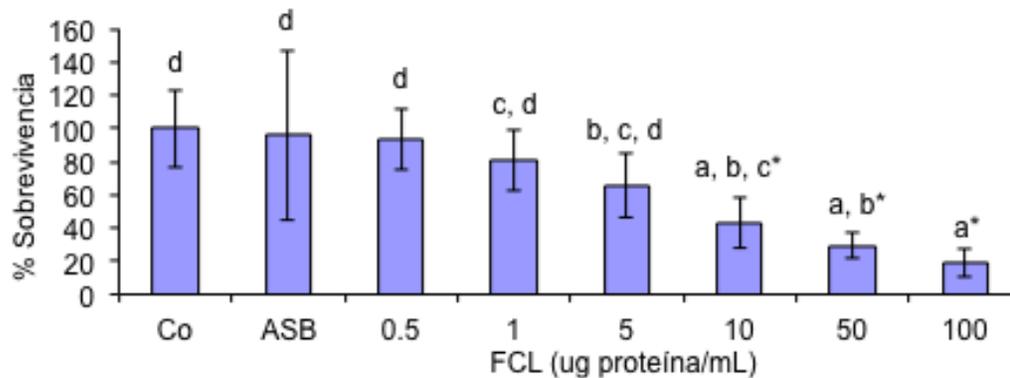


Figura 6. Efecto de la FCL sobre la sobrevivencia de células de cáncer de mama ZR-75-1. Las células fueron sembradas (3×10^4 células/ pozo) en placas de 24 pozos y a las 48 h se sensibilizaron con DMEM 2% SFB y se cambiaron condiciones a las 24 h con DMEM al 0.5% ASB o diferentes concentraciones de la lectina en ese mismo medio: 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{gP/mL}$. Después de 24 h se cosecharon y se contaron con un hemocitómetro. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas respecto al control (Dunett, $p \leq 0.05$). La CL_{50} se calculó mediante regresión lineal del porcentaje de sobrevivencia contra el logaritmo de la concentración. Se muestra el promedio de por lo menos ocho experimentos independientes.

Efectos similares se han observado previamente; por ejemplo, la lectina de cacahuete presentó efecto mitogénico sobre células HT-29, pero no así sobre las células CaCo-2 (Singh *et al.*, 2006). Esto se debe a que las células HT-29 presentan la isoforma CD44v6 del antígeno Thomsen-Friedenreich mientras que las células CaCo-2 carecen de dicha isoforma que está relacionada con cascadas de señalización proliferativas. Estos resultados resaltan la importancia en las diferencias a nivel de los patrones de glicosilación de cada línea tumoral, lo que es determinante para la especificidad de la unión de la lectina a determinados motivos membranales (Nishimura *et al.*, 2004).

7.3 Cuantificación de necrosis celular

Uno de los métodos para valorar la pérdida de integridad de la membrana celular es la medición de la enzima citosólica LDH en el medio de cultivo celular (Lobner, 2000). A fin de evaluar si el tratamiento con la FCL induce muerte tipo necrosis se realizó un ensayo para medir la actividad de LDH en el medio de cultivo (Figura 7) utilizando la CL_{50} y el efecto se midió de manera temprana (4 h) y tardía (24 h).

El valor de LDH a las 4 h estuvo por debajo del límite de detección, mientras que por recuento celular el porcentaje de células muertas fue del 60%. A las 24 h se observó el 12 % de citotoxicidad, mientras que por recuento celular se obtuvo el 70% de células muertas. Lo anterior sugiere que el efecto de la FCL sobre la muerte celular no es de tipo necrótico ya que dicho efecto es menor al observado por recuento directo. Asimismo, el valor del 12% de citotoxicidad puede deberse a ruptura de cuerpos apoptóticos que, al no ser fagocitados, liberan al medio su contenido (Palomares y Valdez-Cruz, 2007). Los datos obtenidos por recuento celular muestran que la FCL provoca su efecto desde etapas tempranas.

Castañeda-Cuevas *et al.* (2007) determinaron que la FL-CII provocó 2.09% de citotoxicidad mediante este mismo método en la misma línea celular y Ángeles-Zaragoza (2010) encontró una respuesta similar al probar la FCL sobre células HT-29. Lo anterior sugiere que el efecto de las lectinas presentes en frijol Tépari provocan la muerte celular por mecanismos distintos a la necrosis.

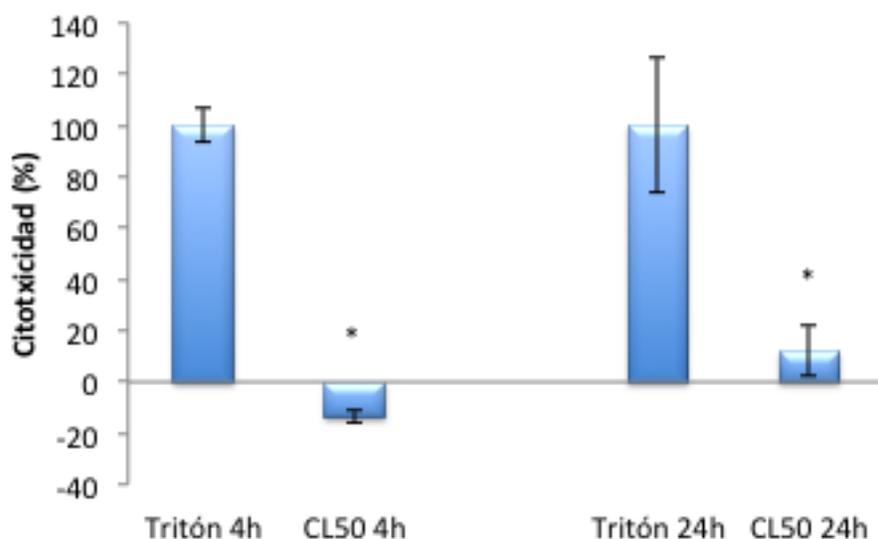


Figura 7. Ensayo de citotoxicidad de la FCL sobre células de cáncer de mama ZR-75-1. Las células ZR-75-1 fueron sembradas (3×10^4 células/ pozo) en placas de 24 pozos y a las 48 h se cambiaron a DMEM con 2% SFB. 24 h después se hizo la cosecha del control inicial y la aplicación del tratamiento con DMEM al 0.5% ASB preparado con la CL₅₀ de la FCL. A las 4 y 24 horas se retiró el medio de cultivo para cuantificar LDH. El asterisco muestra diferencia estadística significativa respecto al control positivo (t de student, $p < 0.05$).

Hernández-Rivera (2007) midió la actividad de LDH, después de suministrar la CL₅₀ de la FCL en un tratamiento de 72 horas sobre fibroblastos de ratón transformados (3T3/v-mos) hallando un porcentaje de 23% de muerte celular en términos de la actividad de la LDH encontrada en medio de cultivo, apuntando que el porcentaje restante fue estimulado por la lectina por una vía posiblemente apoptótica.

7.4 Efecto sobre la activación de caspasa 3

La actividad de caspasa 3 se determinó como marcador apoptótico a fin de determinar si la FCL es capaz de inducir muerte celular por esta vía. Se utilizó camptotecina como control positivo (Hsiang *et al.*, 1985). Al comparar la actividad de caspasa 3 en células de cáncer de mama ZR-75-1 tratadas con la CL₅₀ respecto a las células control, se observó un aumento de 3.8 veces (Figura 8).

Esta misma FCL presentó efecto sobre la actividad de caspasa 3 en células de cáncer de colon HT-29 con un aumento del 20% (Ángeles, 2010), lo que sugiere que las células ZR-75-1 son más sensibles a la FCL que las células HT-29. Los resultados son comparables a los que se han observado para otras lectinas vegetales sobre células de cáncer (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005). Por ejemplo, la abrina una lectina que posee una alta capacidad eritoaglutinadora y que es obtenida de las semillas de *Abrus precatorius* mostró estimular la expresión de caspasa 3, al mismo tiempo que bloqueó la actividad de Bcl2 (Ramnath *et al.*, 2007). El aumento en la muerte por apoptosis en células de cáncer depende de la especificidad de las lectinas y su unión a carbohidratos específicos (Choi *et al.*, 2004). La FCL es capaz de provocar la activación de caspasa 3 de forma significativa en células de cáncer de mama ZR-75-1, lo que sugiere un efecto inductor de apoptosis en células de cáncer humano. Resulta necesario confirmar dicho efecto aumentando el número de ensayos y determinando apoptosis mediante otros métodos

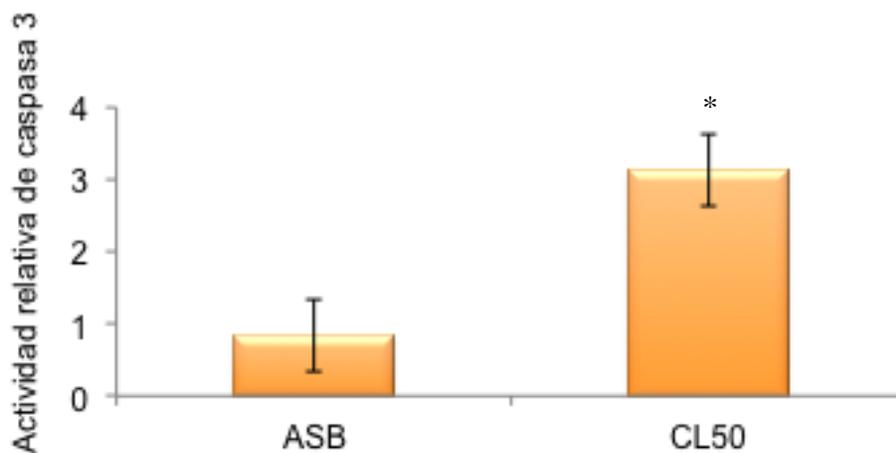


Figura 8. Efecto de la FCL sobre la actividad de caspasa 3. Las células fueron sembradas (3×10^4 células/ pozo) en placas de 24 pozos y se permitió que llegaran a preconfluencia. Se cambió el medio por DMEM al 0.5% ASB adicionado con la CL_{50} de la FCL. A las 8 h se retiró el medio de cultivo para cuantificar la actividad de caspasa 3. Se realizó un análisis de t de student para muestras independientes. El asterisco indica diferencia significativa con respecto al control (ASB) ($p \leq 0.05$).

8. CONCLUSIONES.

Se encontró que la lectina de frijol Tépari tiene un efecto inhibitorio tanto en la proliferación como en la sobrevivencia celular en función de la concentración sobre células de cáncer de mama (ZR-75-1). El efecto predominante presentado, fue citotóxico a partir de 10 µg de proteína/mL (38.32 UA/mL). Los resultados obtenidos sugieren que la lectina de frijol Tépari induce la muerte celular mediante apoptosis sin embargo, se requiere aún llevar a cabo más estudios que permitan determinar en forma definitiva su mecanismo de acción.

9. LITERATURA CITADA

Abdullaev F, Gonzalez de Mejia E. 1997. Antitumor effects of plant lectins. *Natural Tox.* 5(4): 157-163

Ángeles-Zaragoza MV. 2010. Caracterización del efecto citotóxico de un concentrado de lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células de cáncer de colon (HT-29). Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología. Universidad Autónoma de Querétaro.

American Cancer Society. 2009. Datos y Estadísticas sobre el Cáncer entre los Hispanos/Latinos 2009-2011. Disponible en: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-027826.pdf>

American Cancer Society, Inc. 2011. Disponible en: http://www.cancer.org/docroot/ESP/content/ESP_5_1x_Que_es_5.asp. Consultada el 1 de noviembre de 2011

Benach J. 2011. Mew Antibody Weapons against an Old Foe. *mBio.* 2(5):1-3 Disponible en: <http://mbio.asm.org/content/2/5/e00227-11.full.pdf+html>

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Biol.* 15: 269-90

Castañeda Cuevas AL. 2007. Efecto citotóxico de una lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células humanas de cáncer de mama. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Nutrición. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.

Castañeda-Cuevas A, Yllescas-Gasca L, López-Martínez J, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A, Garcia-Gasca T. 2007. Efecto Antiproliferativo In Vitro de una Lectina De Frijol Tépari sobre Diferentes Tipos de Cáncer Humano. RESPYN Edición especial No. 7. Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007/index.html>

Castillo-Villanueva A, Abdullaev F. 2005. Lectinas Vegetales y sus efectos en el cáncer. Rev Invest Clin. 57(1):55-64

Choi SH, Lyu SY, Park Wb. 2004. Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase e inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of AKT. Arch Pharm Res. 27: 68-76

Chu D, Lu J. 2008. Novel therapies in breast cancer: what is new from ASCO 2008. J of Hematol & Oncol. 1:1-13

Cummings RD. 2008. Plant Lectins. En: Essentials of glycobiology. Editores: Varki, A.; Cummings, R.D.; Esko, J.D.; Freeze, H.H.; Stanley, P.; Bertozzi, C.R.; Hart, G.W.; Etzler, M.E., eds. 2º edition. Plainview (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Davies P, Demetrius LI, Tuszynski J. 2011. Cancer as a dynamical phase transition. Tbiomed. 8:30 Disponible en: <http://www.tbiomed.com/content/8/1/30>

DeBerardinis R, Lum J, Hatzivassiliou G, Thompson C. 2007. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. Cell Met. 7 (11-20)

Debouck D. G. 1994. Phaseolus acutifolius. Plant production and protection series.26: 47-62. Disponible en: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/1492/beans.html> Última consunta 10 de Enero de 2011

De Toro G. 2006. Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Disponible en: <http://conganat.cs.urjc.es>

Elinos-Báez CM, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J. 2003. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. Gac Med Mex. 139(5): 493-498

Evan G, Vousden K. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. Nature. 211: 342-348

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. Acta Biochim Biophys. Sin. 37(11): 719-727

Fenton R, Longo D. 2002. Biología celular del cáncer. Cap. 82. En: principios de Medicina Interna Harrison. Editores: Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson L, Eds. Editorial Mc Graw Hill. México. pp 602-604

Ferriz-Martínez RA, Torres-Arteaga IC, Blanco-Labra A, García-Gasca T. 2010. The role of plant lectins in cancer treatment. En: The New Approaches in the Treatment of Cancer. Nova Science Publishers, Inc. pp 71-90. Disponible en: https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=18877.

Gallego F, Nagano C, Cavada B, Sampaio A, Sanz L, Calvete J. 2006. Lectinas. Investigación y Ciencia. Oct:58-67

García-Gasca T, Salazar Olivo LA, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A. 2002. The effects of a protease inhibitor fraction from Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on in vitro cell proliferation and cell adhesion of transformed cells. Toxicol In Vitro 16:229-233.

Goldstein I. 2002. Lectin Structure Activity: The Store Is Never Over. J Agric Food Chem 50:6583-6585

González de Mejía E, Grajeda Cota P, Celade E, Valencia ME. 1988. Characterization of the nutritional potential of Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) cultivated in Mexico. *Arch Latin Am Nutr.* 38: 907-924

González de Mejía E, Prisecaru V. 2005. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. *Clin Rev Food Scie Nutr.* 45:425-445

Hanahan, D, Weinberg R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70

Harris S, Levine A. 2005. p53 pathway: Positive and negative feedback loops. *Oncogene.* 24: 2899-2908

Hernández P, Martín O, Rodríguez Y, Ganem F. 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-carbohidrato. *REB.* 24(1):21-27

Hernández Rivera E. 2005. Estudio del efecto antiproliferativo de lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células transformadas. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Química de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

Hernandez-Rivera E, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A, Garcia-Gasca T. 2007. Efecto Citotóxico Diferencial de una Fracción Rica en Lectinas de Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre Células Cancerígenas. *RESPYN Edición especial No. 7* Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007/index.html>

Hsiang Y, Hertzberg R, Hetch S, Liu Lf. 1985. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *Journal of Biol Chem* 260: 14873-14878 Disponible en: <http://www.jbc.org/content/260/27/14873.short>

INEGI. 2011. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos nacionales Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2781&ep=51> Consultado el 18 de octubre de 2011

Jaffé, WG. 1980. Hemagglutinins (Lectins).En: "Toxic constituents of plant foodstuffs". Editor: Liener I.E. Academic Press, New York, N.Y. pp. 73-102

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M. Cáncer Statistics. 2009. CA Cáncer J Clin. 59: 225-249.

Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. 2008. Breast cancer in Mexico: a pressing priority. *Reprod Health Matt.*16(32)113-23

Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. 2006. p53 and breast Cancer, an update. *Endocrine-related. Cancer* 13: 293-325

Latarjet L, Ruiz Liard A. 1999. Glándula Mamaria. Cap 132. Editores: Latarjet y Ruiz Liard.En: *Anatomía Humana*. Ed. Médica Panamericana. Segunda Edición. Madrid, España. pp 1779-1786

Lee K, Wi K, Suyun L, Won P, Ji Y, Hee J. 2007. Mechanisms involved in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis of cancer cells. *World J Gastroenterol* 13(20): 2811-2818

Liu M, Casimiro M, Wang Ch, Shirley L, Jiao X, Katiyar S, Ju X, Li Z, Yu Z, Zhou J, Johnson M, Fortina P, Hyslop T, Wyndle J, Pestell R. 2009. p21 attenuates Ras- and c-Myc-dependent breast tumor epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like gene expression in vivo. *PNAS*. 106(45): 19035-19040

Lobner D. 2000. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *J Neurosc Meth.* 96(2): 147-152

López-Martínez FJ. 2007. Efecto *in vitro* de una lectina de frijol Tépari sobre células de cáncer de colon humano. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Querétaro. pp 1-55

López-Sánchez C, López-Martínez FJ, Castañeda-Cuevas AL, Yllescas-Gasca L, Ferríz-Martínez RA, Torres-Arteaga IC, Gallegos-Corona MA, Rodríguez-Méndez AJ, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A, García-Gasca T. 2010. Evaluación de la Toxicidad *In Vitro* e *In Vivo* de Lectinas de Frijol Tépari. Revista Ciencia@UAQ. 3:3-13. Disponible en: http://www.uaq.mx/investigacion/revista_ciencia@uaq/documentos_r2/vol_3_No_1.pdf

Mallon E, Osin P, Nasiri N, Blain I, Howard B, Gusterson B. 2000. The basic pathology of human breast cancer. J Mammary Gland Biol. Neoplasia 5 (2): 139-163.

Mawson A, Lai A, Carroll JS, Sergio CM, Mitchell CJ, Sarceic B. 2005. Estrogen and insulin/IGF-1 cooperatively stimulate cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of c-Myc and cyclin D1. Mol Cell Endocrinol. 229(1-2): 161-173

Mohar A, Bargalló E, Ramírez MT, Lara F, Beltrán-Ortega A. 2009. Recursos disponibles para el tratamiento del cáncer de mama en México. Salud Pública Mex. 51(suppl2):S263-S269.

Montaner J. 2007. Modelos *in vivo* e *in vitro* de isquemia cerebral. Cap 2. Editor. Joan Montaner En: Fisiopatología de la isquemia cerebral. Ed. Marge Medica Books. Primera Edición. Barcelona, España. pp 50

Nakahara S, Avraham R. 2008. Biological Modulation by Lectins and Their Ligands in Tumor Progression and Metastasis. Anti Canc Agents Med Chem. 8(1) 22-36

Nishimura H, Nishimura M, Oda R, Yamanaka K, Matsubara T, Ozaki Y, Sekiya K, Hamada T, Kato Y. 2004. Lectins induce resistance to proteases and/or

mechanical stimulus in all examined cells—including bone marrow mesenchymal stem cells—on various scaffolds. *Exp Cell Res.* 295:119-127.

Nanji A A, Hiller-Sturmhöfel S. 1997. Apoptosis and Necrosis. *Alcohol Health Res World.* 21(4): 325-330 325-330

Oliveira P, Colaco A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz L, Lopes C. 2007. Chemical Carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc.* 79(4):593-616

OMS. Cáncer. Datos y Cifras. 2010 Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>. Fecha de consulta 6 de Diciembre de 2010

Osaki M, Oshimura M, Ito H. 2004. P13K-Akt Pathways: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9:667-676

Osman M, Phyllis M, Weber Ch. 2003. The Effect of Feeding Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) Proteinase Inhibitors on the growth and Pancreas of Young Mice. *Pakistan J Nutr* 2(3):111-115

Palomares L, Valdez-Cruz TO. 2007. Superando los retos del cultivo de células animales a través de la bioingeniería. *Biotec* 14: 385- 399

Pérez C, Herrera F. 2005. Repercusión familiar de un diagnóstico oncológico. *Psicol. Am. Lat.* 3 Disponible en: <http://pepsic.bvsalud.org/pdf/psilat/n3/n3a03.pdf>

Petrossian K, Banner L, Oppenheimer S. 2007. Lectin binding and effects in culture on human cancer and non-cancer cell lines : Examination of tissues of interest in drug design strategies. *Act Histochem.* 109:491-500

Pitot H. 1993. The molecular biology of carcinogenesis. *Can Supp* 72: 962-970

Ramnath V, Reckha PS, Kuttan G, Kuttan R. 2007. Regulation of Caspase-3 and Bcl-2 Expression in Dalton's Lymphoma Ascites Cells by Abrin.eCAM. 6(2): 233-238

Reynoso-Camacho R, González de Mejía E, Loarca-Piña G. 2003. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from Tepary bean(*Phaseolus acutifolius*). Food Chem Toxicol. 41(1):21-27

Sharon N, Lis H. 2002. How proteins bind carbohydrates: Lesson from Legume Lectins. J Agric Food Chem 50:6586-6591

Singh R, Subramanian S, Rhodes J, Campbell B. 2006. Peanut lectin stimulates proliferation of colon cancer cells by interaction with glycosylated CD44v6 isoforms and consequential activation of c-Met and MAPK: functional implications for disease-associated glycosylation changes. Glycobiology 16 (7): 594-601.

Torres Arteaga IC. 2010. Purificación y caracterización parcial de una lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) con actividad citotóxica sobre células cancerígenas. Tesis para obtener el grado de Maestría en Nutrición Humana, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.

Torres-Sánchez L, Galván-Portillo M, Lewis S, Gómez-Dantés, López-Carrillo L. 2009. Dieta y Cáncer de mama en Latinoamérica. Salud Publ Mex. 51 Supl 2:S181-S190

Torroella Kouri M, Villa Treviño S. 1998. Bases genéticas del cáncer. Editores: Barron F, Pimentel M, Sánchez J, Goyenechea A, Bourguet S, Retif A. Instituto Nacional de Cancerología y Fondo de Cultura Económica. 1ª Ed. México D.F. pp11-13, 27-30

Turner R, Liener I. 1975. The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. Anal Biochem. 68:651-653.

Valadez-Vega C, Alvarez-Manilla G, Riverón-Negrete L, García-Carrancá A, Morales-González JA, Zuñiga-Perez C, Madrigal-Santillan E, Esquivel-Soto C, Esquivel-Chirino C, Villagómez-Ibarra R, Bautista M, Morales-González A. 2011. Detection of Cytotoxic Activity of Lectin on Human Colon Adenocarcinoma (Sw480) and Epithelial Cervical Carcinoma (C33-A). *Molecules*. 16:2107-2118

Vivanco I, Sawyers CL. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2(7): 489-501

Vogelstein B, Kinzler K. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 10: 789-799

Yuan K, Kucik D, Singh R, Listinsky C, Listinsky J, Siegal P. 2008. Alterations in human breast cancer adhesion-motility in response to changes in cell surface glycoproteins displaying α -L-fucose moieties. *Int J Oncol* 32:797-807

ANEXO 1

CARACTERÍSTICAS DE LA LÍNEA CELULAR ZR-75-1 (www.atcc.org)

CARACTERÍSTICA	LINEA CELULAR ZR-75-1	
Fuente	Órgano	Glándula mamaria
	Tejido	Ductal
	Enfermedad	Carcinoma ductal
	Sitio metastático de derivación	Ascites
	Tipo de célula	Epitelio
Organismo	Homo Sapiens / Humano	
Edad	63	
Genero	Femenino	
Etnia	Caucásica	
Morfología	Epitelial	
Propiedades de crecimiento	Adherente	
Productos celulares	Mucina (MUC-1, MUC-2)	
Resistencia a virus		
Tumorigenesis	SI	
Expresión de Receptores	Receptores a Estrógenos expresados	
Perfil de DNA	Amelogenin: X CSF1PO: 10,11 D13S317: 9 D16S539: 11 D5S818: 13 D7S820: 10,11 THO1: 7,9,3 TPOX: 8 vWA: 16,18	
Análisis citogénético	Esta línea celular humana tiene un número hipertriploide de cromosoma. El número cromosómico modal fue de 72 que ocurre en el 26% de las células y la tasa fue de 1,2% Dieciocho marcadores fueron comunes. Estos fueron: t(1q,?), M2,M3, del(3)(p21), der(5)t(5;?) (q35;?), del(6)(q21), t(11q14q), t(11;11)(p15;q11), der(14)t(2;14)(q21;q32), t(17q,?), M13, M14, M15, M16, M17, der(8)t(8;?), t(9p,?) y 19pt. De estos 13 fueron pares. 14 fueron normales no encontrados. N6 hubo una sola copia N18 y 10 había tenido 3 copias y 4 en cada célula	
Isoenzimas	G6PD, B	