

EFFECTO DE UNA LECTINA DE AYOCOTE (*Phaseolus coccineus* L.) SOBRE LA SOBREVIVENCIA Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TRANSFORMADAS.

Acosta-Santoyo G¹, López Martínez FJ¹, Mendiola Olaya E², Blanco Labra A² y García-Gasca T¹.

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. ²Laboratorio de Mecanismos de Defensa de Plantas. CINVESTAV-Irapuato

RESUMEN

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que se encuentran en casi todos los niveles de la vida, desde bacterias hasta mamíferos, se unen específicamente a carbohidratos y no tienen actividad enzimática sobre los azúcares que reconocen. La mayoría de las plantas contienen una o más de estas lectinas y son de importancia biológica y experimental. En este trabajo se determinó la actividad aglutinante de la lectina de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) y su efecto citotóxico sobre fibroblastos de ratón transformados con el oncogen v-mos. La fracción rica en lectina de ayocote mostró efecto inhibitorio de la proliferación celular y de la sobrevivencia en función de la concentración ($p \leq 0.05$). Se obtuvieron las CI_{50} y CL_{50} de 4.54 y 2.33 ng de proteína/mL, respectivamente. Los resultados sobre el mecanismo de acción sugieren que la lectina no provoca la muerte de las células por necrosis. Futuros estudios se enfocaran en la purificación de la lectina y caracterización del efecto biológico.

Palabras clave: cáncer, citotoxicidad, lectina, *Phaseolus coccineus*.

INTRODUCCION

El frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) es una leguminosa altamente cultivada en México, tiene una alta adaptación en zonas con altitudes desde 1800 hasta 2400 m por lo que puede ser una buena alternativa de alimentación para ciertas comunidades (Vargas e Irizar, 2005). Se ha encontrado que las semillas del ayocote tienen, como muchas leguminosas, lectinas. Estas moléculas pueden ser nocivas e incluso tóxicas para los animales, incluido el hombre por lo que muchas veces necesitan ser removidos o inactivados por medio de tratamiento con calor o lavados para poder ser utilizados en la dieta (Grant y col., 1991).

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que se unen específicamente a carbohidratos, no son de naturaleza inmunológica y no presentan actividad enzimática sobre los carbohidratos que reconocen (Rüdiger y Gabius, 2002). Las lectinas fueron descritas originalmente por su capacidad de aglutinar células, y se sabe que difieren en su capacidad para reconocer carbohidratos (Varki y col., 1999). Entre sus funciones biológicas destaca su participación en las interacciones célula-célula y matriz extracelular-célula, su papel en la fertilización y en el desarrollo así como defensa contra patógenos y predadores. Experimentalmente son utilizadas para la clasificación de tipos celulares, identificación y selección de células mutadas con glicosilación alterada, en la mitogénesis de células y en ensayos de glicosiltransferasas y glicosidasas (Rüdiger y Gabius, 2002). Se ha propuesto que la habilidad hematoaglutinante podría servir para monitorear lectinas potencialmente tóxicas *in vitro* (Vasconcelos y Oliveira, 2004).

En estudios *in vitro*, *in vivo* y pruebas clínicas se ha probado que algunas lectinas tienen actividad quimiopreventiva contra cáncer (González de Mejía y Prisecaru, 2005). En nuestro laboratorio se ha demostrado que la lectina de frijol tépari (*P. acutifolius*) afecta de forma diferencial la proliferación y sobrevivencia de diferentes tipos de células cancerígenas (Yllescas, 2006; Castañeda, 2007; López, 2007). Por lo anterior, en este trabajo se analizó la capacidad citotóxica de la lectina del frijol ayocote sobre fibroblastos de ratón transformados con el oncogen v-mos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el cultivo celular se empleó medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), alto en glucosa, de GIBCO BRL (Grand Island, NY, EUA); suero de ternera (ST) de HyClone (Logan UT, EUA). Otros reactivos para el cultivo celular fueron de Sigma (Sigma Chem; St. Louis MO, EUA), los reactivos y solventes fueron de J.T. Baker (J.T. Baker; Xalostoc, Estado de México, México) y las cajas de cultivo de Corning (Corning Costar; Corning, NY, EUA).

La fracción rica en IP liofilizada fue donada por el Dr. Alejandro Blanco (CINVESTAV-Irapuato) obtenida mediante precipitación selectiva y cromatografía de exclusión molecular (Campos, 1997). Se determinó la cantidad de proteína de la fracción de IP por el método de Bradford (1976) y el perfil electroforético mediante electroforesis denaturalizante (SDS-PAGE), en geles de 12.5 mm de espesor al 12.5% de poliacrilamida cargando 10 µg de proteína en el carril (Laemmli, 1970).

Para los ensayos biológicos se emplearon fibroblastos 3T3 de ratón, transformados con el oncogen v-mos. Las células se incubaron a 37° C en DMEM al 5% ST en una incubadora FELISA con cámaras de gasificación manual, en atmósfera humidificada al 10% de CO₂.

Para determinar la actividad aglutinante se utilizó el método de diluciones dobles seriadas en placas de ELISA de 96 pozos (Jaffé, 1980) con eritrocitos de conejo previamente fijados con glutaraldehído (Turner y Liener, 1975). La placa se analizó en un microscopio invertido y la actividad aglutinante se determinó utilizando una escala arbitraria y apreciativa mediante la ecuación $AE=2^n/mg$ donde AE es la actividad específica aglutinante expresada en unidades por mg de proteína (U/mg), n es la última dilución con aglutinación apreciable al microscopio y mg es la cantidad de proteína inicial cuantificada por el método de Bradford.

Las células v-mos se sembraron (1×10^4 células por pozo) en placas de 24 pozos con DMEM y 5% de ST. Después de 48 h, el medio de cultivo se cambió por DMEM adicionado con 0.5% de albúmina sérica de bovino (ASB, Serologicals 810664) y diferentes concentraciones de la fracción semipura de lectina (100, 10, 1, 0.1, 0.01 ngP/mL) La tasa de proliferación se calculó mediante la comparación con las células tratadas con 0.5% de ASB. La tasa de sobrevivencia se calculó comparando el número de células al finaliza el experimento con el número de células al inicio (control inicial). Después de 48 h de tratamiento, el número celular se determinó cosechando las células con tripsina al 0.15% y se contaron con un hemocitómetro (García-Gasca y col., 2002).

A partir de las curvas dosis respuesta se determinaron la concentración inhibitoria media (CI₅₀) y la concentración letal media (CL₅₀) mediante regresiones lineales del porcentaje de proliferación o sobrevivencia contra el logaritmo de la concentración. Las ecuaciones se obtuvieron utilizando el programa JMP versión 5.0. Los experimentos se realizaron por duplicado en al menos tres repeticiones independientes.

El efecto necrótico de la lectina se determinó mediante la cuantificación de lactato deshidrogenasa (LDH) utilizando un kit comercial (LDH-Cytotoxicity Assay, BioVision, cat No. K311-400).

Para el análisis estadístico se realizaron ANOVA para la comparación de medias entre tratamientos (Tuckey (p<0.05%)) o para cada tratamiento respecto a su control (Dunnnett (p<0.05%)) utilizando los programas Statgraphics versión 5.1 y SPSS versión 12.0.

RESULTADOS

La actividad aglutinante específica para la fracción rica en lectina de ayocote fue de 44,138 unidades de aglutinación (UA) por mg de proteína. Dicha actividad resulta alta en comparación con las calculadas para lectinas de otras leguminosas. Una fracción similar de fíjol tépari (*Phaseolus acutifolius*) presentó una actividad específica de aproximadamente 5,000 UA/mg de proteína (López-Martínez, 2007). Sin embargo, es importante considerar que

dicha actividad se calculó con un lote diferente de eritrocitos y, dada la especificidad de las lectinas por las células sanguíneas, es probable que los eritrocitos de conejo empleados en este estudio hayan sido más afines, dato que tendrá que corroborarse para poder comparar la actividad de las lectinas estudiadas.

El perfil electroforético de la fracción rica en lectina se muestra en la Figura 1., en la que observan cuatro bandas, de 45, 31, 22 y 20 kDa aproximadamente. Las lectinas de leguminosas se presentan principalmente como tetrámeros con subunidades de masa molecular relativa entre 28 kDa (Pusztai y col., 1987) y 34 kDa (González de Mejía y col., 1990), por lo que el resultado obtenido sugiere que la banda de 31 kDa podría ser la lectina del frijol ayocote. Será necesario caracterizar la banda de glicoproteína y continuar con la purificación de la lectina.

Las curvas dosis-respuesta del efecto de la fracción rica en lectina de frijol ayocote se muestran en la Figura 2. La fracción rica en lectina presentó un efecto citotóxico dependiente de la concentración administrada. Se determinaron las CI_{50} y la CL_{50} que fueron de 4.54 y 2.33 ngP/mL, respectivamente. Se observa que se requirió aproximadamente la mitad de la concentración para provocar la muerte de las células en lugar de sólo inhibir su proliferación.

La CL_{50} se utilizó para determinar el efecto de la fracción rica en lectina de ayocote sobre la muerte inespecífica de las células transformadas (necrosis), cuantificando la concentración de lactato deshidrogenasa en el medio después de los tratamientos. El resultado obtenido mostró valores por debajo del límite de detección del equipo utilizado para el caso de las células tratadas con la fracción de lectina. Este resultado sugiere que es muy baja la concentración de LDH en el medio de cultivo por lo que muy pocas células mueren por necrosis sin embargo, será necesario incrementar el número de experimentos. Debido a que la muerte por necrosis no parece ser importante como mecanismo de citotoxicidad por el tratamiento con la lectina, es muy probable que esta proteína induzca apoptosis (González de Mejía y Prisecaru, 2005), por lo que futuros estudios se enfocarán a determinar este aspecto.

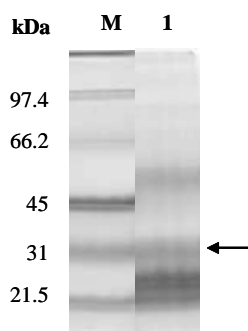


Figura 1. Perfil electroforético de la fracción rica en lectina de ayocote. Se realizó una electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida al 12.5%. Se muestra el carril de los marcadores de peso molecular (M) y el carril en el que se cargó la fracción estudiada (1). La flecha indica la banda de 31 kDa, probablemente la lectina.

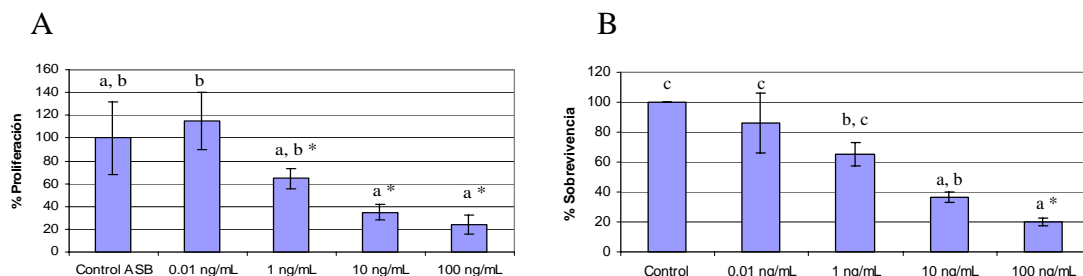


Figura 2. Efecto de la fracción rica en lectina de ayocote sobre la proliferación y sobrevivencia de fibroblastos transformados de ratón. Las células se sembraron en placas de 24 pozos y a las 48 h se cambiaron condiciones. Se determinó el efecto de la fracción estudiada sobre proliferación (A) y sobrevivencia (B). A partir de estas curvas se determinaron las CI_{50} y CL_{50} , respectivamente. Las letras minúsculas indican las diferencias entre los tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) y los asteriscos indican diferencia entre cada tratamiento respecto al número de células al inicio del experimento (Dunnett, $p \leq 0.05$). Se muestra el promedio de al menos dos experimentos independientes.

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que la lectina extraída del frijol ayocote tiene actividad citotóxica sobre las células transformadas. Esta actividad depende de la concentración de lectina que se administre a las células. La cuantificación de lactato deshidrogenasa sugiere que las células no mueren de manera necrótica, por lo que probablemente el tipo de muerte pueda ser por vía apoptótica. Será necesario purificar a homogeneidad la lectina y caracterizar su efecto citotóxico en células cancerígenas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bradford M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal. Biochem.* 72:248-254.
- Campos J., Martínez-Gallardo N., Mendiola-Olaya E. y Blanco-Labra A. **1997**. Purification and partial characterization of a proteinase inhibitor from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) seeds. *J Food Biochem.* 21:203-218.
- Castañeda Cuevas, A. **2007**. Efecto citotóxico de una lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células humanas de cáncer de mama. Trabajo de Investigación para obtener el grado de Licenciado en Nutrición. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. pp. 42-45
- García-Gasca T., Salazar-Olivo L.A., Mendiola-Olaya E. y 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.
- González de Mejía, E., Hankin, C., Paredes-López, O. and Sahnnon, L. **1990**. The lectins and lectin-like proteins of tepary beans (*Phaseolus acutifolius*) and tepary-common bean (*Phaseolus vulgaris*) hybrids. *J. Food Biochem.* 14:117-126.
- González de Mejía E. y Priscearu V.I. **2005**. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 45:425-445.
- Grant, G.; More L.J.; McKenzie, N.H.; Dorward, P.M.; Stewart, J.C.; Telek, L. y Pusztai, **1991**. A survey of the nutritional and haemagglutination properties of several tropical seeds. *Livestock Research for Rural Development*, 3:3.
- Jaffé, W. **1980**. Hemagglutinins (lectins). En: *Toxic constituents of plant foodstuffs*. Academic Press. New York, N. Y. pp. 73-102.
- Laemmli U.K. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- López Martínez J. **2007**. Efecto *in vitro* de una lectina de frijol tépari sobre células de cáncer de colon humano. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. 32-43.
- Puztai, A., Watt W, B. and Stewart, J. C. **1987**. Erithro- and lymphoagglutinins of *Phaseolus acutifolius*. *Phytochemistry.* 26(4): 1009-1013.
- Rüdiger H. y Gabius H.J. **2001**. Plant Lectins: Occurrence, Biochemistry, Functions and Applications. *Glycoconjugate Journal.* 18:598-613.
- Turner R.H. y Liener I.E. **1975**. The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. *Anal. Biochem.* 68:651-653.
- Vargas-Vázquez M.L.P. e Irizar-Garza M.B.G. **2005**. Efecto del Brasinoesteroide y Densidad de Población en la Acumulación de Biomasa y Rendimiento de Ayocote (*Phaseolus coccineus* L.). *Revista Chapingo. Serie Horticultura.* 11:269-272.
- Vasconcelos I.M. y Oliveira J.T.A. **2004**. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon.* 44:385-403.
- Varki A.; Cummings R.; Esko J.; Hart G.; Marth J. **1999**. *Essentials of Glicobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y. pp
- Yllescas-Gasca L. **2006**. Efecto de las lectinas del frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células del cáncer de cuello uterino. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Nutrición. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro: 35-40.