

EFECTO DE UNA FRACCIÓN PROTEÍICA RICA EN INHIBIDOR DE PROTEASAS DE AYOCOTE (*PHASEOLUS COCCINEUS*) SOBRE CÉLULAS CANCERÍGENAS.

Ángeles Zaragoza MV¹, López Martínez FJ¹, Mendiola Olaya E², Blanco Labra A², & 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 células tumorales liberan grandes cantidades de proteasas al medio extracelular, favoreciendo la degradación de la matriz extracelular (MEC), y por consiguiente la metástasis. Existen moléculas cuya función es inhibir a las proteasas y regular así su actividad fisiológica, los inhibidores de proteasas (IP). En este proyecto se estudiaron los efectos de una fracción rica en un IP de *Phaseolus coccineus* sobre la degradación de la MEC en cultivos de fibroblastos transformados de ratón 3T3/v-mos. Mediante una curva dosis-respuesta se determinó que la fracción rica en IP presentó inocuidad a una concentración de 1 µgP/mL (18.94 UI). A dicha concentración, la fracción estudiada disminuyó en 12% la degradación de colágena así como la degradación de la MEC. Futuros estudios se enfocarán en la purificación del IP y la caracterización de su efecto sobre células cancerígenas.

Palabras clave: cáncer, inhibidores de proteasas, *Phaseolus coccineus*, proteólisis.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad producida por cambios en la conducta de las células que les permiten proliferar sin control, formando tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva. En tanto el crecimiento celular permanezca localizado, la enfermedad de ordinario se puede tratar y curar por extirpación quirúrgica del tumor y el tejido que lo rodea. Sin embargo, una de las características prominentes de los tumores malignos es su tendencia a formar metástasis, las células tumorales utilizan enzimas proteolíticas para romper las proteínas de adhesión, degradar la matriz extracelular (MEC) y desprenderse de la masa original, entrar a la circulación linfática o sanguínea y propagarse a sitios distantes en el cuerpo, de esta forma se establecen tumores secundarios que ya no son susceptibles de extirpación quirúrgica y la progresión tumoral se torna prácticamente irreversible (Lippman y Matrisian, 2000; Alberts y col, 2002; Pandey y col, 2007).

La importancia de los inhibidores de proteasas (IP) radica en impedir la proteólisis en sitios donde esta actividad no debe ocurrir y por otra, de su regulación, lo que garantiza la proteólisis parcial como evento fisiológico (Rodríguez-Fragoso y col, 2000). Esto ha convertido a los IP en moléculas muy atractivas como herramientas contra el cáncer metastático (Pandey y col, 2007). Algunos IP de origen natural, como el de soya y frijol tépari, han sido estudiados por su potencial contra cáncer con resultados alentadores (Kennedy, 1998; García-Gasca y col, 2002). Por lo anterior, en el presente estudio se determinó la capacidad del IP del ayocote (*Phaseolus coccineus*), presente en una fracción proteínica, sobre la inhibición de la actividad proteolítica de fibroblastos cancerígenos de ratón de la línea 3T3/v-mos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos. 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), y otros reactivos para el cultivo celular de Sigma (Sigma Chem; St. Louis MO,

EUA). Los reactivos y solventes fueron de la marca J.T. Baker (J.T. Baker; Xalostoc, Estado de México, México) y las cajas de cultivo de Corning (Corning Costar; Corning, NY, EUA).

Material biológico. 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), la actividad del IP se determinó mediante el método de Schwertz y Takenaka, (1955) y el perfil electroforético mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Línea celular. Se emplearon fibroblastos NIH 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.

Ensayos biológicos. Se llevó a cabo una curva dosis-respuesta mediante el protocolo establecido por García-Gasca y col. (2002). Brevemente, se sembraron (1.0×10^4 células por pozo) en placas de 24 pozos con DMEM al 5% ST. Después de 48 h, el medio de cultivo se cambió por DMEM adicionado con 0.5% de albúmina sérica de bovino (ASB) y con 100, 10, 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{g P / mL}$ de la fracción rica en IP por duplicado, respectivamente. Después de 48 h de tratamiento, el número celular se determinó cosechando las células con tripsina al 0.15% y contándolas con un hemocitómetro. La tasa de sobrevivencia se determinó considerando como 100% al número de células al cambio de condiciones (control inicial, Co) y se determinó la concentración inocua de la fracción rica en IP para llevar a cabo los experimentos sobre MEC.

Efecto de IP sobre la degradación de proteínas de la MEC. Las técnicas de tinción y de extracción de la MEC permiten conocer su estado de degradación y ofrecen una cuantificación indirecta con respecto a la actividad proteolítica de las células cancerígenas, así como de la probable inhibición de dicha actividad (García-Gasca y col, 2002). El efecto sobre la degradación de colágena se determinó mediante el método del RPS (López-De León y Rojkind, 1985), el efecto sobre la degradación de MEC mediante el método descrito por Ignatz y Massagué (1986) en fibroblastos 3T3/v-mos tratados por 96 horas con la concentración inocua de la fracción rica en IP de ayocote.

Análisis estadístico. Se realizaron comparaciones de medias mediante ANOVA entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) y entre cada tratamiento y su control (Dunnett, $p \leq 0.05$).

RESULTADOS

La fracción proteínica de IP de ayocote presentó una actividad inhibitoria específica de 18,950 unidades inhibición (UI) por mg de proteína. El perfil electroforético de la fracción estudiada se muestra en la Figura 1, en la que se observa la presencia de una banda principal con peso molecular aproximado de 21 kDa, lo cual indica que la fracción es realmente rica en IP. Las leguminosas contienen inhibidores de serín-proteasas pertenecientes a las familias de los inhibidores de Kunitz y Bowman-Birk de bajo peso molecular (Campos y col, 1997; Sánchez y col, 1998). Sin embargo, también es posible observar una banda debajo de los 31 kDa, posiblemente una lectina (González de Mejía y col, 1990)

Se determinó la curva dosis-respuesta del efecto de la fracción rica en IP sobre la sobrevivencia de fibroblastos transformados de ratón 3T3/v-mos (Figura 2). De acuerdo con Kennedy (1998), Engel y col (1999) y Arvelo y Cotte (2006), la mayoría de los IP no poseen efectos citotóxicos a menos que se combinen con determinadas drogas u otros compuestos con actividad tóxica. Sin embargo, se puede apreciar que la sobrevivencia celular se afectó de forma significativa en presencia de la fracción rica en IP de ayocote, en función de la concentración. Es probable que dicha fracción contenga trazas de alguna lectina debido a que el IP no se encuentra

purificado a homogeneidad (García-Gasca y col, 2002) y pudiera estar presente una lectina, cuyas moléculas son citotóxicas (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005). La concentración inocua de la fracción rica en IP fue de 1 µgP/mL (18.94 UI/mg de proteína).

El efecto de la fracción rica en IP sobre las proteínas de la MEC se muestra en la Figura 3. Se observa una disminución del 12.5% en células tratadas con el IP respecto a su control (Figura 3A). Esta diferencia no presentó significancia estadística debido al margen de error encontrado en los datos de las células control, por lo que será necesario realizar un mayor número de experimentos. La degradación de la MEC se muestra en la Figura 3B, el perfil electroforético de las células tratadas con la fracción rica en IP presenta bandas de cerca de 45 kDa, más intensas que las células no tratadas. Lo anterior sugiere que la presencia del IP pudo inactivar la actividad proteolítica celular sin embargo, no es posible observarlo con claridad. Para mejorar la resolución del gel será necesario concentrar la proteína de los extractos de MEC. Se han observado resultados similares sobre la degradación de la MEC con el IP de frijol tépari (García-Cruz y col, 2007).

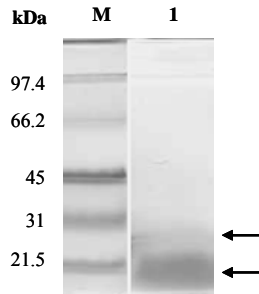


Figura 1. Perfil electroforético de la fracción rica en IP de ayocote. Se realizó una electroforesis desnaturalizante en gel de poliácridamida al 12.5%. Se muestran los marcadores de peso molecular (M) y la fracción rica en IP (1). Las flechas muestran las bandas observadas al teñir con azul de Coomassie.

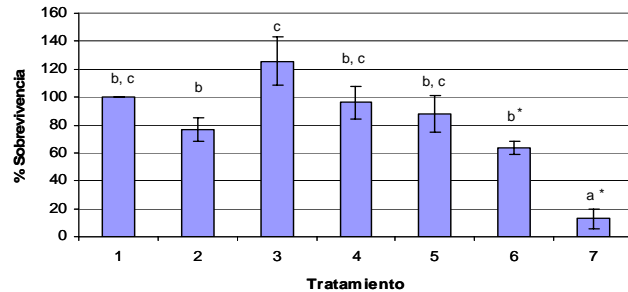


Figura 2. Curva dosis-respuesta del tratamiento de células 3T3/v-mos con la fracción rica en IP de frijol ayocote. Se determinó el número de células inicial (1) y se cambiaron condiciones con 0.5% de ASB (2) y 0.01 (3), 0.1 (4), 1 (5), 10 (6) y 100 (7) µgP/mL de la fracción rica en IP de ayocote. Las 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.

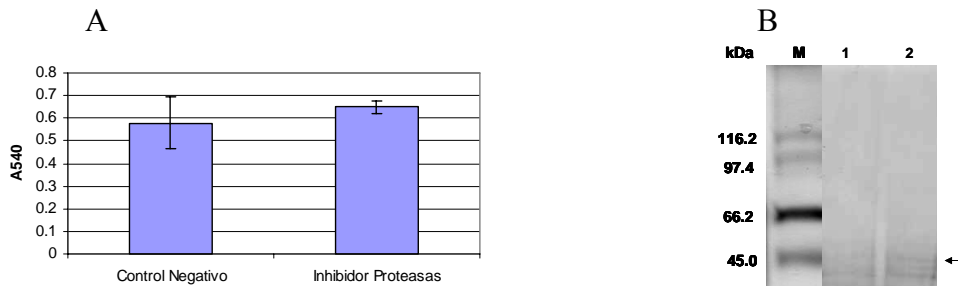


Figura 3. Efecto de tratamiento con la fracción rica en IP sobre la degradación de proteínas de MEC en células cancerígenas en cultivo. Células 3T3/v-mos fueron tratadas por 96 horas con la fracción rica en IP de ayocote. Se determinó el efecto sobre colágena (A) tiñendo con RPS y leyendo el colorante a 540 nm. Para determinar el efecto sobre la MEC (B) se corrió un gel de poliácridamida al 5%. Se muestran los marcadores de peso molecular (M), células no tratadas (1) y células tratadas (2) con la fracción rica en IP de ayocote. La flecha muestra las bandas de proteína observadas.

CONCLUSIONES

La fracción proteínica estudiada de frijol ayocote es rica en IP, dicha fracción presentó efecto citotóxico debido probablemente a trazas de lectina. Fue posible observar en experimentos preliminares que la presencia del IP de ayocote es capaz de disminuir la degradación de proteínas de MEC. Trabajos posteriores se enfocarán en la purificación a homogeneidad del IP y la caracterización de la inhibición de la actividad proteolítica de las células en cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. D. “Biología Molecular de la Célula”, 4ª ed., Ediciones Omega, Barcelona, **2002**.
- Arvelo F. y Cotte C. “Metalloproteinasas and tumor progression”, Invest. Clin., 47(2), 185-205, **2006**.
- Bradford, M. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, Anal. Biochem., 72, 248-254, **1976**.
- Castillo-Villanueva A. y Abdullaev F. “Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer”, Rev. Invest. Clin., 57(1), 55-64, **2005**.
- Campos J., Martínez-Gallardo N., Mendiola-Olaya E. y Blanco-Labra A. “Purification and partial characterization of a proteinase inhibitor from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) seeds”, J Food Biochem., 21, 203-218, **1997**.
- Engel J., Doyle P. y McKerrow J. “Efecto antiparasitario de inhibidores de cistein proteasas *in vitro* e *in vivo* en la enfermedad de chagas experimental”, Medicina, 59, 171-175, **1999**.
- García-Cruz R.M., García-Gasca T. y Blanco Labra A. “*In Vitro* effects of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) protease inhibitor on cell adhesion and invasion of transformed cells”, Clin. Exp. Met. (sometido), **2007**.
- García-Gasca T., Salazar-Olivo L., Mendiola-Olaya E. y Blanco-Labra A. “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, **2002**.
- González de Mejía E., Hankin C., Paredes-López O. y Sahnnon L. “The lectins and lectin-like proteins of tepary beans (*Phaseolus acutifolius*) and tepary-common bean (*Phaseolus vulgaris*) hybrids”, J. Food Biochem. 14, 117-126, **1990**.
- Ignotz R. A. y Massagué J. “Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix”, J. Biol. Chem., 261, 4337-4345, **1986**.
- Kennedy A. R. “The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent”, Am. J. Clin. Nutr., 68 (suppl), 1406s-1412s., **1998**.
- Laemmli U. K. “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4”, Nature, 227, 680-685, **1970**.
- Lippman S. y Matrisian L. “Protease inhibitors in oral carcinogenesis and chemoprevention”, Clinical Cancer Research, 6, 4599-4603, **2000**.
- López-De León A. y Rojkind M. “A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections”, J. Histochem. Cytochem., 737-743, **1985**.
- Pandey R., Patil N. y Rao M. “Proteases and protease inhibitors: implications in antitumorogenesis and drug development”, Int. Hum. Genet., 7(1), 67-82, **2007**.
- Rodríguez-Fragoso L., Jurado-León F. y Reyes-Esparza J. “La proteólisis en la invasión y metástasis de la célula tumoral”, Rev. Inst. Nal. Cancerol., 46(1), 33-46, **2000**.
- Sánchez A., Ramírez J., Morales O. y Montejano J. “Detección de inhibidores de proteasas en extractos de leguminosas y su efecto sobre proteasas endógenas del músculo de pescado”, Cienc. Tecnol. Aliment., 2, 12-19, **1998**.
- Schwartz G. y Takenaka Y. “Spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin activity” Biochim. Biophys. Acta, 16, 571-575, **1995**.