

Evaluación de la actividad antiproliferativa de los hidrolizados de glutelinas de nuez (*Carya illinoensis*) en la línea celular SiHa

Mejía Salazar, F.M.¹, López-Castro, J. A. ¹ y León-Galván, M. F.^{1, 2*}.

1 Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. **2** Departamento de Alimentos División de Ciencias de la vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. ingfaby@yahoo.com.mx *

RESUMEN:

En años recientes, el ser humano ha desarrollado padecimientos que se presentan en poblaciones cada vez más jóvenes. México enfrenta cambios aunados al estilo de vida y a factores genéticos, que promueven el desarrollo de cáncer. El cáncer cérvicouterino (CaCu) ocupa el segundo lugar entre las neoplasias malignas de la población femenina de regiones menos desarrolladas. El 99% de los casos de CaCu se asocian al virus del papiloma humano. Se ha demostrado que cualquier proteína, independientemente de sus funciones y calidad nutricional, puede ser empleada para generar péptidos con actividad biológica. En el presente trabajo se obtuvieron 167.73 µg/mL de la fracción proteica de glutelinas alcalinas extraídas con NaOH a 0.1 M, posteriormente, se realizó una hidrólisis enzimática obteniendo una concentración de hidrolizado de 67.37 µg/mL. Los hidrolizados se utilizaron para tratar la línea celular SiHa que está predispuesta a cáncer cervicouterino, el tratamiento fue de 50 µg/mL. Los resultados obtenidos, indicaron que la tasa de proliferación de las células disminuyó en un 10% a las 12 horas posteriores al tratamiento, 35% a las 24 horas de posteriores al tratamiento y un 28% a las 48 horas posteriores al tratamiento.

Palabras clave: *Carya illinoensis*, cáncer, SiHa, glutelinas, hidrolizados, antiproliferativa

ABSTRACT:

In recent years, humans have developed conditions that occur increases in younger populations. Mexico faces changes in lifestyle and genetic factors, which promote the development of cancer. Cervical cancer (CaCu) ranks second among malignant neoplasms of the female population in less developed regions. 99% of cases of CaCu are associated with human papilloma virus. It has been shown that any protein, regardless of its functions and nutritional quality, can be used to generate peptides with biological activity. In the present work 167.73 µg / mL of the protein fraction of alkaline glutelins extracted with 0.1 M NaOH was obtained, subsequently, an enzymatic hydrolysis was performed, obtaining a concentration of 67.367 µg / mL of hydrolysates. The hydrolysates are used to treat the cell line if it is predisposed to cervical cancer, the treatment was 50 µg / mL. The results showed that the proliferation rate of the cells decreased by 10% at 12 hours after treatment, 35% at 24 hours post treatment and 28% at 48 hours post treatment.

Keywords: *Carya illinoensis*, cáncer, SiHa, glutelins, hydrolysates, antiproliferative

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el ser humano ha desarrollado padecimientos que con mayor frecuencia aquejan a poblaciones cada vez más jóvenes, disminuyendo su productividad y tasa de mortalidad. México enfrenta grandes cambios aunados al estilo de vida que han propiciado importantes consecuencias a la salud. Estos cambios y factores genéticos han promovido el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. El cáncer inicia cuando células crecen descontroladamente, la mayoría de las veces la maquinaria celular puede reparar estas mutaciones, en caso contrario la célula programa su muerte (apoptosis), sin embargo, cuando estos mecanismos de control fallan, la célula puede desarrollar cáncer. El cáncer cérvicouterino (CaCu) ocupa el segundo lugar entre los tumores malignos en la población femenina de regiones menos desarrolladas (OMS, 2014). Casi todos los casos de CaCu se deben a tipos específicos de un virus de DNA tumoral que se denomina virus del papiloma humano (VPH), los genotipos 16 y 18 se han descrito como los más oncogénicos. Aunque se conoce el agente causal, el mecanismo celular aún no ha sido del todo elucidado. Las proteínas de origen alimentario, en la actualidad se usan como materia prima para la obtención de péptidos bioactivos. Estos péptidos bioactivos o funcionales, son secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora que pueden ser liberados posteriormente por hidrólisis química o enzimática (Mulero *et al.*, 2011). La nuez, es la semilla del nogal pecanero, que contiene entre 9.17-14.5% de proteína. El contenido de aminoácidos esenciales tiene niveles que superan los requerimientos para adultos y niños de acuerdo con la FAO (FAO, 1985), lo que permite proponer a esta semilla como fuente de proteínas en la dieta. Las proteínas de semilla se clasifican en proteínas constitutivas y proteínas de reserva. Las proteínas de reserva se clasifican de acuerdo a lo propuesto por Osborne (1924) basado en su solubilidad: albúminas, globulinas, Prolaminas y glutelinas. Las funciones de los péptidos bioactivos como antihipertensivos, antioxidantes, antimicrobianos, antitumorales y antiproliferativa, los hacen deseables para usarse como ingredientes en alimentos y obtener un efecto favorable para el individuo. Por lo que en el presente trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa de los hidrolizados de nuez en una concentración de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en la línea celular SiHa, que contiene VPH 16 y están predispuestas a cáncer. Los resultados obtenidos, se demostró que la línea celular al estar en contacto con los hidrolizados de glutelinas de nuez, iniciaron un proceso apoptótico a 24 horas del tratamiento disminuyendo hasta un 35% la tasa de crecimiento de las células, concluyendo así, que los hidrolizados tienen un efecto positivo sobre las células SiHa y que los hidrolizados pueden llegar a reprimir genes que están involucrados en cascadas de señalización para el desarrollo y crecimiento de las células cancerígenas.

MATERIALES Y MÉTODOS

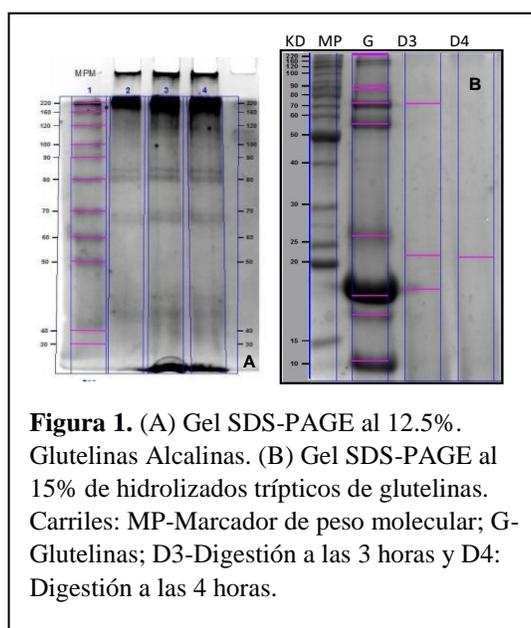
Se aisló la fracción proteica de las glutelinas alcalinas de harina de nuez desgrasada, con una solución de NaOH 0.1 M con agitación magnética por 1 hora a 4°C, se centrifugo a 13,000 rpm por 15 min a 4°C, se colectó el sobrenadante. La proteína se cuantificó utilizando el método de Bradford con el kit Protein assay de BioRad. Posteriormente la fracción proteica se sometió a hidrólisis enzimática con la proteasa tripsina, la digestión se llevó a cabo a 37°C durante 4 horas. Se cuantificó la concentración de los hidrolizados por el método de Bradford. Para analizar el perfil electroforético de la fracción proteica y de los hidrolizados de glutelinas de nuez, se realizaron electroforesis de proteínas Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel (SDS-PAGE). Se redujeron los puentes disulfuro con β -mercaptoetanol a 100°C por 5 min y la electroforesis se realizó con una corriente inicial de 80 volts por 20 min y posteriormente a un voltaje de 110 volts por 2 h. Posteriormente los geles se fijaron y tñieron con azul de Coomassie G250 y se destñieron con una solución de ácido acético y metanol. Para realizar el ensayo de interacción de los hidrolizados de glutelinas y la línea celular, se precipitaron 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con ácido tricloroacético y β -mercaptoetanol, se lavaron con acetona y se re suspendieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Para la línea celular, se calculó una concentración inicial de 5×10^5 células/mL y se colocaron las células en pocitos con la concentración de hidrolizados. Se tomaron los diferentes tiempos de 12, 24 y 48 horas con los hidrolizados y el control sin hidrolizados, de cada uno se realizaron tres repeticiones. Posteriormente al tratamiento, se colectaron las células, se realizó el conteo en cámara de Neubauer y se revisó la integridad de las células.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para la cuantificación de la fracción proteica y de los hidrolizados de glutelinas se muestran en la tabla I, teniendo un promedio de 169.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la fracción y obteniendo una concentración total de 5.091 mg/g de harina de nuez desgrasada, en comparación con la concentración reportada por Mares (2012) que fue de 18.08 ± 0.30 mg/mL, la concentración obtenida fue muy baja, sin embargo a partir de ésta concentración no interfiere en la obtención de hidrolizados para el tratamiento y para el ensayo de interacción. Con respecto a la concentración de los hidrolizados obtenidos a partir de la fracción de glutelinas, se obtuvieron en promedio de 67.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta concentración fue suficiente para el tratamiento de la línea celular SiHa ya que Mares (2012) reporta que la concentración adecuada para tratar las líneas celulares, HeLa y Ca Ski fueron de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La línea celular SiHa, se trató con esta misma concentración.

Tabla I. Cuantificación de fracción proteica de glutelinas e hidrolizados de glutelinas.		
Muestra	Cuantificación $\mu\text{g}/\text{mL}$	mg/g harina
Fracción proteica	169.733	0.170 ± 0.006
Hidrolizados de glutelinas	67.367 ± 5.713	

Para analizar el perfil electroforético de la fracción de glutelinas y de la hidrólisis enzimática, se realizaron geles SDS-PAGE al 12.5% y 15% respectivamente. En la figura 1 se observa el perfil electroforético de la fracción de glutelinas, que presenta las bandas principales a 20, 22, 25, 50 y 80 kDa (A), que concuerda con lo reportado por López (2015) y Mares (2012). Por otro lado, en el segundo gel observamos el cambio en el patrón de proteínas debido a la hidrólisis enzimática con tripsina a 1 hora y a las 4 horas. En el carril 4 podemos observar como la enzima hidroliza la fracción proteica donde solo se observa una banda a los 25 kDa, este resultado concuerda con lo reportado por López (2015) en donde estandariza las condiciones para hidrolizar la fracción proteica de glutelinas alcalinas en donde se presentan bandas entre los 40 y 25 kDa durante la primera hora de digestión y hasta la cuarta hora solo se observó una sola banda de proteínas a los 25 kDa.



En la figura 2 tenemos las células sin hidrolizados (control) y con tratados con hidrolizados de glutelinas de nuez a las 24 horas. Las células control a las 24 horas, mostraron una población de 291,666 cel/ μ L, mientras que, en las células con hidrolizados, hubo un descenso en la población de 35%, con 191,111 cel/ μ L (Tabla II). Esta disminución de la población, se debe a que los hidrolizados de glutelinas promueven que las células entren en apoptosis, esto se puede comprobar con los cuerpos apoptóticos visibles en la membrana celular. En la tabla 3,

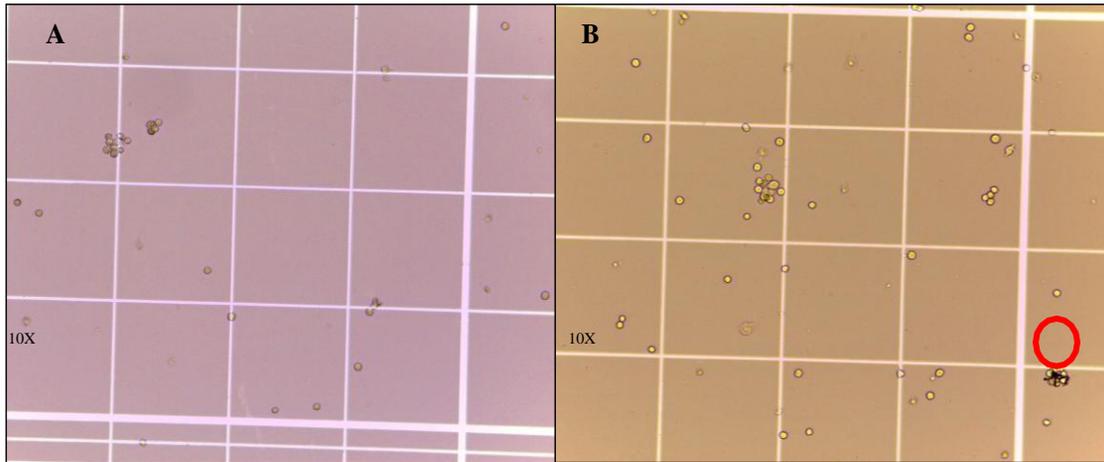


Figura 2 Línea celular en interacción con los hidrolizados de glutelinas. En el panel A se observan las células control, sin hidrolizados y en el panel B, se observan las células con hidrolizados a las 24 horas.

podemos observar como los hidrolizados comienzan a tener efecto a las 12 horas posteriores al tratamiento y su mayor efecto lo tienen a las 24 horas, sin embargo, el efecto disminuye a las 48 horas, comparando el control con las células con tratamiento, esto puede ser debido a que las células que no entran en apoptosis. López (2015) reporta proteínas que se expresaron de manera diferencial al interaccionar hidrolizados de glutelinas de nuez con la línea celular SiHa, entre las proteínas que reporta se encuentra la vigilina, que está asociada a la protección de la célula, acumulando colesterol, sin embargo también se ha reportado que puede suprimir el proto-oncogen c-fms, ya que compite con HuR que estabiliza el mRNA de c-fms y por lo tanto promueve su degradación; c-fms que codifica para un receptor de tirosina cinasa que se encuentra correlacionado con la proliferación celular (Woo *et al.*, 2011), la vigilina también afecta regiones promotoras de c-myc, que es un factor de transcripción asociado a genes involucrados en proliferación celular. Es posible, que los hidrolizados de glutelinas afecten directamente genes relacionados con el mecanismo de división celular.

Tabla II. Comportamiento de las células sin tratamiento y con tratamiento a las 12, 24 y 48 horas.

Células Control (Cel/ μ L)	Células + hidrolizados 12h (Cel/ μ L)	Células + hidrolizados 24h (Cel/ μ L)	Células + hidrolizados 48h (Cel/ μ L)
165,000	149,166		
291,666		191,111	
345,000			249,999
% De Reducción	10%	35%	28%

CONCLUSIONES

Los hidrolizados de glutelinas de nuez podrán ser considerados como fuente de péptidos bioactivos anticarcinogénicos, ya que se han probado en diferentes líneas celulares con cáncer cervicouterino como HeLa, CaSki y SiHa. Concluimos, que los péptidos que provienen de la proteína de reserva de la nuez, puede llegar a intervenir en funciones regulatorias para la progresión del ciclo celular y que pueden ser utilizados como agentes coadyuvantes para el tratamiento de enfermedades como el cáncer cervicouterino.

BIBLIOGRAFÍA

- FAO 1985. Amino-acid content of foods by Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAO). Disponible en: <http://www.fao.org/documents/en/detail/115324>
- López Castro, A. (2015) *Análisis del proteoma de interacción de los biopéptidos de nuez (Carya illinoensis) Vs línea celular de cáncer cervicouterino*. Tesis de Maestría. Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Vida. Campus Irapuato-Salamanca. Irapuato, Guanajuato.
- Mares, E. (2012). *Identificación y caracterización de péptidos bioactivos en proteínas de Reserva de Nuez (Carya illinoensis)*. Tesis de Maestría. Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Vida. Campus Irapuato-Salamanca. Irapuato, Guanajuato.
- Mulero Cánovas, J., Zafrilla Rentero, P., Martínez-Cachá Martínez, A., Leal Hernández, M., & Abellán Alemán, J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e investigación en arteriosclerosis*, 23(5), 219-227.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2014). *Nota descriptiva N° 380* noviembre del 2014. [En línea] Documento electrónico recurso de internet. [Fecha de consulta: 16 de mayo 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/es/>
- Osborne, T. B. (1924). *Proteínas de los vegetales*. Disponible en: www.archive.org/details/vegetableprotein00osbouoft
- Woo, H.-H., X. Yi, T. Lamb, I. Menzl, T. Baker, D. J. Shapiro, y S. K. Chambers, 2011, Posttranscriptional Suppression of Proto-Oncogene c-fms Expression by Vigilin in Breast Cancer: *Molecular and Cellular Biology*, v. 31, p. 215-225.