



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Evaluación *in vitro* del efecto de la fracción
G10P1.7.57 y la proteína DING de Chile habanero
(*Capsicum chinense* Jacq.) sobre el crecimiento de
líneas tumorales**

Tesis que presenta

José Aarón Tamayo Sansores

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2016

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de José Aarón Tamayo Sansores titulado “Evaluación *In vitro* del efecto de la fracción G10P1.7.57 y la proteína DING de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) sobre el crecimiento de líneas tumorales”. fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en la línea de investigación planta-ambiente en el laboratorio 06 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, agosto de 2016

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

Nombre: José Aarón Tamayo Sansores

Se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "Caracterización bioquímica de una proteína DING con elevado potencial terapéutico y agroecológico, presente en la fracción proteica G10P1.7.57 de semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)" bajo la dirección del Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY), por permitirme el acceso a las instalaciones y a las diferentes facilidades de investigación para realizar este trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca N°**590219/308133** otorgada a un servidor para la realización de mis estudios de Maestría dentro del proyecto de investigación CB 2010/00157135 titulado: “Caracterización bioquímica de una proteína DING con elevado potencial terapéutico y agroecológico, presente en la fracción proteica G10P1.7.57 de semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)”

A mis asesores Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores y a la Dra. Rosy Esther Moo Puc por toda su asesoría, apoyo y consejos durante la realización de este proyecto.

A mis sinodales Dr. Enrique Castaño de la Serna y al Dr. Sergio Peraza por todos sus consejos durante el desarrollo de este trabajo.

A los demás participantes de mi comité de revisión de tesis Dra. Georgina Estrada Tapia y Dra. Nancy Santana Buzzy por todo el apoyo brindado.

A la M.C. Ligia Guadalupe Brito Argáez, por su apoyo técnico en el laboratorio, por su paciencia, porque ante toda adversidad siempre tenía un consejo, además de todas sus enseñanzas durante mi estancia de investigación, así como durante la maestría

A la Q.F.B. Cristina Castillo por el apoyo técnico brindado durante el desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy, mis logros se los debo a ustedes, por creer en nosotros, ya que siempre han dado lo mejor de ustedes, con su ejemplo, dedicación y palabras de aliento.

A mis hermanitos Alondra, Alan, Argel y Anthony les agradezco por estar presentes batallando juntos en toda circunstancia, aportando alegrías y han estado presentes siempre, y más cuando les he necesitado.

A mis amigos del laboratorio 06 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular Diane, Yamily, Margarita, Rita, Martha, Jacobo y Luis, por todos sus buenos consejos y brindarme su amistad en estos años, además de trabajar a la par para alcanzar nuestra meta.

De igual manera a mis amigos de la UMAE del Hospital Regional N.1 Ignacio García Téllez, Cristina, Iía, Aarón, Laura, Juan por sus buenos deseos, consejos y brindarme su amistad

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 Cáncer.....	3
1.2 Epidemiología del cáncer	4
1.3 <i>Capsicum chinense</i> Jacq. (Chile Habanero)	5
1.4 Proteínas DING	12
1.5 Modificaciones postraduccionales	17
1.5.1 Fosforilación de proteínas	17
1.5.2 Glicosilación de proteínas	18
1.6 HIPOTESIS.....	23
1.7 OBJETIVO GENERAL	23
1.7.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
1.8 JUSTIFICACIÓN	24
CAPÍTULO II	27
2.1 INTRODUCCIÓN	27
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.2.1 Obtención de semillas y desinfección	28

2.2.2 Obtención del extracto crudo y extracto soluble	28
2.2.3 Purificación del extracto soluble y fracción G10P1.7.57.....	29
2.2.4 Secuenciación de la proteína DING presente en la fracción G10P1.7.57 ...	29
2.2.5 Cuantificación de proteína por el método de Peterson (1977)	30
2.2.6 Electroforesis de proteínas en geles de 15% de poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
2.2.7 Preparación del gel de 15% de poliacrilamida.....	31
2.2.8 Electroforesis en geles de 13% de poliacrilamida (SDS-PAGE)	32
2.2.9 Electroforesis en geles de 12% de poliacrilamida (SDS-PAGE)	33
2.2.10 Tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie	33
2.2.11 Tinción del perfil proteico con nitrato de plata.....	34
2.2.12 Inmunodetección en la fracción G10P1.7.57 y de la proteína DING presente en dicha fracción	34
2.2.13 Detección de glucosilación en la fracción G10P1.7.57 y en la proteína DING contenida en dicha fracción.....	35
2.2.14 Desglucosilación de la fracción G10P1.7.57 y de la proteína DING	35
2.2.15 Inmunodetección con el anticuerpo COM2 de la proteína DING-glicosilada en la fracción G10P1.7.57.....	36
2.2.16 Fosforilación de la fracción G10P1.7.57 e inmunodetección de fosfoproteínas en la fracción G10P1.7.57	36
2.2.17 Evaluación de la citotoxicidad de la fracción G10P1.7.57 glicosilada/desglucosilada y fosforilada/desfosforilada sobre las líneas tumorales Hep-G2 (carcinoma laríngeo), SiHa (adenocarcinoma escamoso de cérvix), PC-3 (carcinoma de próstata humano) y MCF-7 (cáncer de mama).....	37

CAPÍTULO III	41
3. RESULTADOS	41
3.1 Obtención de la proteína soluble, la fracción G10P1.7.57 y la proteína DING de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. (chile habanero)	41
3.2 Glicosilación de la fracción G10P1.7.57	44
3.3. Evaluación de la citotoxicidad y efecto antiproliferativo de la fracción G10P1.7.57 sobre las líneas de células tumorales Hep-G2, SiHa, PC-3, MCF-7 y línea normal Vero	46
3.4 Evaluación de citotoxicidad y efecto antiproliferativo de la fracción G10P1.7.57 desglicosilada y fosforilada sobre la línea de células tumorales MCF-7 y la línea normal Vero	48
3.5 Evaluación de la citotoxicidad y efecto antiproliferativo de la proteína DING sobre la línea tumoral MCF-7 y Vero	50
3.6 Rendimiento del proceso de purificación de la proteína DING	51
3.7 Fosforilación de la fracción G10P1.7.57 y la proteína DING	52
3.8 Desglicosilación de la fracción G10P1.7.57 y la proteína DING	54
CAPÍTULO IV	57
Conclusiones generales	57
PERSPECTIVAS	60
CAPÍTULO V	61
BIBLIOGRAFIA	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Frutos de diferentes ejemplares del género <i>Capsicum</i> sp., cultivados en diferentes regiones de México	6
Figura 1. 2 Vía de la <i>N</i> -glicosilación.	20
Figura 1.3 Estrategia experimental desarrollada para la purificación de la fracción G10P1.7.57 y de la proteína DING, así como del ensayo de su actividad biológica sobre diferentes líneas tumorales	25
Figura 3.1 Cromatograma de la proteína soluble después de ser fraccionada en una columna de cristal rellena con resina Sephadex G-50.....	41
Figura 3.2 Cromatograma de la fracción G50P2 en columna de cristal, empacada con resina Sephadex G-10.	42
Figura 3.3 Análisis de la pureza de la proteína electroeluída después de ser teñida con azul de Coomassie o inmunodetectada por Western blot con el anticuerpo COM2..	43
Figura 3.4 Determinación de glicosilación de proteínas en gel de poliacrilamida de 13% (SDS-PAGE) teñido con reactivo de Schiff-ácido periódico.	45
Figura 3.5 Inmudetección por Western blot de la proteína DING presente en la fracción G10P1.7.57.	46
Figura 3.6 Perfil de las proteínas de la fracción G10P1.7.57 fosforiladas y sin fosforilar mediante SDS-PAGE.....	53
Figura 3.7 Inmunodetección con el anticuerpo anti-fosfotirosina (a) inmunodetección con el anticuerpo anti-fosfoserina (b) y anti-fosfotreonina(c)..	54
Figura 3.8 Perfil de proteínas de la fracción G10P1.7.57 glicosilada y desglicosilada e inmunodetección con el anticuerpo COM2.....	55
Figura 3.9 inmunodetección de la fetuina glicosilada y desglicosilada	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Tasa de mortalidad en México en el año 2012 de acuerdo a los cinco principales tipos de cáncer incidentes en los diferentes sexos.	5
Cuadro 1.2 <i>Capsicum</i> domesticados con sus descripciones botánicas, lugar de origen, así como de su especie progenitora	7
Cuadro 2.1 Composición de la mezcla para el gel de 15% de poliacrilamida.....	31
Cuadro 2.2 Composición de la mezcla para la preparación del gel de 4% de poliacrilamida.	32
Cuadro 2.3 Composición de la mezcla para la formación del gel de 13% de poliacrilamida	32
Cuadro 3.1 Secuencia de péptidos de la proteína purificada por medio de la electroilución.....	44
Cuadro 3.2 Concentración citotóxica de la fracción G10P1.7.57 (µg/mL) evaluada en las líneas celulares Vero, Hep-G2, PC-3, SiHa y MCF-7.....	46
Cuadro 3.3 Concentración antiproliferativa de la fracción G10P1.7.57 (µg/mL) evaluada en las líneas celulares Vero, Hep-G2, PC-3, SiHa y MCF-7.	47
Cuadro 3.4 Actividad citotóxica CC ₅₀ para cada fracción G10P1.7.57 (µg/mL) y la fracción G10P1.7.57 fosforilada en la línea celular MCF-7.....	48
Cuadro 3.5 Actividad citotóxica CC ₅₀ para cada fracción G10P1.7.57 (µg/mL) glicosilada y desglicosilada evaluada en la línea celular MCF-7	49
Cuadro 3.6 Actividad antiproliferativa de la fracción G10P1.7.57 (µg/mL) fosforilada y la fracción G10P1.7.57 sobre la línea celular MCF-7.....	49
Cuadro 3.7 Actividad antiproliferativa de la fracción G10P1.7.57 (µg/mL) glicosilada y desglicosilada evaluada en la línea celular MCF-7	50
Cuadro 3.8 Actividad citotóxica de la proteína DING aislada de semillas de <i>Capsicum chinense</i> . El fármaco docetaxel se utilizó como control positivo.	50

Cuadro 3.9 Actividad antiproliferativa de la proteína DING purificada a partir de la fracción G10P1.7.57 sobre la línea celular MCF-7.	51
Cuadro 3.10 Índice de actividad de la Proteína DING aislada de semillas de chile habanero sobre la línea celular MCF-7	51
Cuadro 3.11 Tabla de rendimiento de los diferentes procesos de purificación para la obtención de la proteína DING.....	52

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
A.C	Antes de cristo
AF	Factor atenuante
AP	Fosfatasa alcalina
Asn	Asparagina
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina Sérica Bovina
C.	<i>Capsicum</i>
C/EBPβ	Factor de transcripción C/EBPβ
CC₅₀	Actividad citotóxica
CI₅₀	Actividad antiproliferativa al 50%
CID	Disociación inducida por colisión
Cm	Centímetros
COM2	Anticuerpo policlonal contra DING e inmunopurificado
D.C	Después de cristo
Da	Daltones
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DOC	Desoxicolato de Sodio
F.A.O.	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Fe	Hierro
g	Gravedades
Glc	Glucosa
GLP	Proteína parecida a germina
G	Gramos

H	Horas
Ha	Hectáreas
HCD	Disociación inducida por colisión de alta energía
HCl	Ácido Clorhídrico
HEP-G2	Línea celular de adenocarcinoma de hígado humano
HPBP	Proteína humana de unión a fosfato
IA	Índice de actividad
IC50	Concentración inhibitoria al 50%
IgG	inmunoglobulina G
IS	Índice de selectividad
kDa	Kilodaltones
LC	Cromatografía líquida
M	Molar
Man	Manosa
MCF-7	Adenocarcinoma de mama de humanos
Mg	Miligramos
Min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MS	Espectrofotometría de masas
MW	Marcador de peso molecular
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
Nm	Nanómetro
O	Oxígeno
O-	Orto
PBS	Amortiguador salino de fosfato
PBS- Tween 20	Amortiguador salino de fosfato adicionado con Tween 20
PC3	Línea celular de adenocarcinoma de próstata humana
PfluDING	Proteína DING de Pseudomonas fluorescens
pH	Potencial de hidrógeno

Ppm	Partes por millón
RE	Retículo endoplásmico
RER	Retículo endoplásmico rugoso
SBW	Unión de fosfato y cotinina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
Ser	Serina
SiHA	Línea celular de cáncer cérvico uterino de humanos
Sp.	Especie
SRB	Sulforodamina
SSA	Secretaría de salubridad y asistencia
St	Saint
TBS	Amortiguador salino de Tris-HCl
TBS- Tween 20	Amortiguador salino de Tris-HCl adicionado Tween 20
TCA	Ácido tricloroacético
Thr	Treonina
Ton	Toneladas
U.S.A.	Estados Unidos de América
UV	Ultravioleta
Var.	Variedad
Vero	Línea celular derivada de riñón de mono verde africano
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Las proteínas son biomoléculas que poseen funciones específicas y actividades biológicas fundamentales para los seres vivos. Debido a que muchas de las propiedades biológicas se mantienen aun después de que las proteínas han sido aisladas de su fuente original y a que dichas propiedades pueden ser utilizadas en beneficio del hombre es que algunas de esas proteínas tienen un alto valor de comercialización. La insulina, por ejemplo, se utiliza en el tratamiento de la diabetes, las enzimas digestivas son utilizadas para tratar problemas digestivos, las inmunoglobulinas frecuentemente se utilizan como apoyo del sistema inmune de pacientes inmunocomprometidos y las lipasas son componentes comunes de los detergentes de nueva generación. El número de proteínas con aplicaciones potenciales aumenta de forma constante al igual que sus fuentes de origen, entre las cuales se incluyen las plantas.

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), es una especie vegetal cuyo cultivo hoy en día es de gran importancia en la región de la península de Yucatán. Sus frutos se caracterizan por su pungencia, color, aroma y sabor; características que en conjunto lo colocan como uno de los elementos más utilizados en la comida tradicional. Al chile habanero también se le han atribuido propiedades preventivas y curativas contra diversas enfermedades. Esta característica ha sido asociada a su alto contenido de capsaicina, un compuesto que de manera natural se encuentra y acumula en las venas y semillas del fruto de chile y cuyas propiedades antimicrobianas han sido ampliamente documentadas. Adicionalmente, en las últimas décadas se ha visto que el género *Capsicum* también posee proteínas y péptidos antimicrobianos, tal es el caso de las defensinas y las proteínas de transferencia de lípidos.

A la par de tales descubrimientos también se ha descrito que las plantas y el resto de los seres vivos poseen un grupo de proteínas conocidas como DING, cuyo nombre se deriva de su alta conservación de aminoácidos ácido aspártico (D), isoleucina (I), asparagina (N) y glicina (G) en su extremo *N*-terminal. Este grupo de proteínas ha sido asociado a múltiples funciones biológicas, aunque algunas de ellas son controversiales.

Se ha documentado que las proteínas DING de *Hypericum perforatum*, *Sesbania grandiflora* y de *Helianthus tuberosus* ejercen actividad citotóxica sobre el crecimiento de líneas tumorales, por lo que representan una opción como agentes anticancerígenos naturales.

En el caso de *Capsicum chinense* Jacq., a partir de semillas de esta especie se aisló una fracción proteica denominada G10P1.7.57; análisis posteriores por medio de secuenciación de aminoácidos mostraron que dicha fracción contiene una proteína DING. La aplicación *in vitro* de la fracción G10P1.7.57 sobre las líneas celulares humanas de carcinoma de hígado (Hep-G2), cáncer de próstata (PC-3), tumor cervico uterino (SiHa), adenocarcinoma de mama (MCF-7) y la línea celular del epitelio de riñón de mono verde africano (Vero), inhibió el 50% del crecimiento celular en concentraciones de entre 20 y 45 µg/mL, con la mejor inhibición en la línea celular MCF-7.

De igual manera se sabe que las proteínas pueden estar sujetas a sufrir modificaciones postraduccionales y que tal evento permite su adecuado plegamiento y adquisición de función. Por tal razón se realizó la modificación por fosforilación/desfosforilación y glicosilación-desglicosilación de la fracción proteica G10P1.7.57 y la proteína DING.

Enseguida se analizó el efecto de tales modificaciones en la actividad biológica de la fracción G10P1.7.57 y la proteína DING, adicionando las proteínas modificadas en la línea tumoral MCF-7. se determinó que estas modificaciones post-traduccionales tienen efectos contrastantes pues la desglucosilación aumentó la potencia de la fracción G10P1.7.57 dado que se requirió de menor cantidad de proteína (17.2 µg/mL) para inhibir el crecimiento de la línea MCF-7, en contraste, se requirió de 35.73 µg/mL de la fracción glicosilada para inhibir el crecimiento de la línea MCF-7). Cuando la fracción G10P1.7.57 está desfosforilada inhibe el crecimiento a 35.73 µg/mL y cuando está fosforilada la inhibe a 44.53. Tales resultados sugieren que, dependiendo de las modificaciones postraduccionales el efecto de la fracción puede ser regulado y con ello el índice de selectividad puede ser aumentado o disminuido.

ABSTRACT

Proteins are biomolecules that possess specific functions and biological activities that are fundamental to living beings. Due to many of the biological properties are maintained, even after that proteins have been isolated from their original source, and that these properties may be used in the benefit of man, is that some of these proteins have a high commercialization value. Insulin, for example, is used in the treatment of diabetes, digestive enzymes are used to treat digestive problems, the immunoglobulins, are frequently used in support of the immune system of immunocompromised patients, and the lipases, are common components of detergents of new generation. The number of proteins with potential applications increases steadily at the same way as their original sources of origin, among which plants are included.

The Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.), is a plant species whose cultivation, today is of great importance in the region of the Yucatan Peninsula. Its fruits are characterized by their high pungency, color, aroma and flavor; characteristics that together placed it as one of the vegetables most commonly used in traditional cuisine. The habanero chilli is also attributed with preventive and curative properties against various diseases. This characteristic had been associated with his high content of *capsaicin*, a compound that is naturally found and builds up in the veins and seeds of the chilli fruit, and whose antimicrobial properties have been widely documented. Additionally, in the last decades it has been seen that the *Capsicum* genus also possess proteins and antimicrobial peptides, such is the case of defensins and lipid transfer proteins.

Together with these findings it has also been described that plants and the rest of living beings possess a group of proteins known as DING, whose name is derived from its high conservation of amino acids aspartic acid (D), isoleucine (I), asparagine(N) and glycine (G) at the N-terminal. This group of proteins had been associated with multiple biological functions, although some of these functions are controversial

It has been documented that DING proteins of *Hypericum perforatum*, *Sesbania grandiflora* and *Helianthus tuberosus*, exert cytotoxic activity on the growth of tumor cell lines, thus representing an option as natural anticancer agents.

In the case of *Capsicum chinense*, from the seeds of this species it was isolated a protein fraction called G10P1.7.57, further analysis by amino acid sequencing showed that

this fraction contains a DING protein. The *in vitro* application of the G10P1.7.57 protein fraction on the human cell lines of carcinoma of liver (Hep-G2), prostate cancer (PC3), cervix tumor (SiHa), breast adenocarcinoma (MCF-7) and the kidney epithelial cell line (Vero cells) derived from the African green monkey; inhibited the 50% of cell growth at concentrations ranging from 20 to 45 µg/mL, with the best inhibition in the MCF-7 cell line.

It is also well known that proteins may be subject to suffer post translational modification and that such event permits their proper folding and acquisition of function. For this reason the modification of phosphorylation/dephosphorylation and glycosylation /desglycosilacion was done in the G10P1.7.57 protein fraction and in the DING protein from *C. chinense*. Then, the effect of this modifications in the biological activity of the G10P1.7.57 protein fraction, and the DING protein, was analyzed by adding the modified proteins on the MCF-7 tumor cell line. It was determined that these post-traductional modifications has contrasting effects on the biological activity because the desglycosilation increased the potency of the fraction G10P1.7.57 because it was required less amount of protein (17.2 µg/mL) to inhibit the growth of MCF-7 cell line; in contrast, it was required of 35.73 µg/mL of the glycosylated protein fraction to inhibit the growth of MCF-7 line. When the G10P1.7.57 protein fraction is dephosphorylated, it inhibited the growth with 35.73µg/mL and when it was phosphorylated it inhibit at 44.53 µg/mL. Such results suggest that, depending of the post-translational modifications, the effect of the protein fraction might be regulate

INTRODUCCIÓN

El cáncer se caracteriza por una multiplicación anormal y desordenada de células; estas últimas pueden tener la capacidad de diseminarse e invadir tejidos diferentes a los de su origen (metástasis), (Weigelt *et al.*, 2005).

El tratamiento del cáncer y sus secuelas es una de las prioridades en los sistemas de salud mundial, dado que los métodos de tratamiento actual además de ser costosos tienen efectos secundarios indeseables para los pacientes. Es por ello que en la actualidad se está en la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad. (Muñoz *et al.*, 1997; Miller, 1981).

En las plantas en particular, se ha reportado la existencia de un nuevo grupo de proteínas con capacidad para inhibir enfermedades como el síndrome de inmunodeficiencia humana (VIH-1) y el cáncer. Ese grupo ha sido descrito como la familia de proteínas DING. (Sachdeva *et al.*, 2015; Zuoqi *et al.*, 2013; Ivanova *et al.*, 2012; Bookland *et al.*, 2011; Lesner *et al.*, 2009).

La familia de las proteínas DING comprende a polipéptidos con un peso molecular aproximado de 40 kDa, que poseen una secuencia de aminoácidos altamente conservada en su extremo N-terminal compuesta de ácido aspártico (D), isoleucina (I), asparagina (N) y glicina (G). Al momento, las proteínas DING han sido identificadas en todos los reinos de la vida y sus funciones biológicas aún son controversiales pues su presencia se asocia tanto con enfermedad como con salud. Lo cierto es que las proteínas DING tienen efectos benéficos contra ciertos tipos de cáncer y por ello están siendo objeto de intensa investigación (Bernie, 2013; Berna 2009).

Es por ello que en el presente trabajo a partir de semillas de *Capsicum chinense* Jacq. se aisló una fracción proteica denominada G10P1.7.57, la cual contiene una proteína DING, y se evaluó el efecto de la fracción G10P1.7.57 sobre las líneas tumorales MCF-7 (células de carcinoma de mama humano), SiHa (células escamosas de carcinoma de cérvix humano), PC3 (células de carcinoma de próstata humano) y HEP-G2 (células de carcinoma de hígado humano). La fracción G10P1.7.57 presentó una menor IC₅₀ e índice de selectividad (IS) más efectivo en la línea celular MCF-7 de todas las líneas celulares evaluadas. Posteriormente, a partir de la fracción G10P1.7.57, se purificó a la proteína

DING, de ~39 kDa y se evaluó su efecto sobre las líneas tumorales MCF-7 y SiHa. Los valores de IC₅₀ e IS de la proteína DING disminuyeron con respecto a los observados en la fracción G10P1.7.57. Dicho resultado confirmó que *in vitro*, la proteína DING de *C. chinense* es la responsable de la inhibición del crecimiento de la línea tumoral MCF-7.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Cáncer

Una neoplasia es un desorden en el crecimiento celular, caracterizado por una proliferación excesiva, alterada e incontrolada de las células y que no guarda relación alguna con las demandas fisiológicas del órgano implicado (Granados *et al.*, 2006). Se denomina cáncer a un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y la propagación de células anormales (ACS, 2012). El cáncer puede empezar casi en cualquier lugar del cuerpo humano. Normalmente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células normales envejecen, se dañan o mueren, células nuevas las reemplazan. Sin embargo, en el cáncer, las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir, y células nuevas se forman cuando no son necesarias. Estas células adicionales pueden dividirse sin interrupción y pueden formar masas que se llaman tumores. Si esta propagación no se controla puede causar la muerte. El cáncer es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados donde además su incidencia tiende a aumentar (ACS, 2012; Granados *et al.*, 2006).

El cáncer es causado por cambios en los genes que controlan la forma como funcionan nuestras células, especialmente la forma como crecen y se dividen.

Los cambios genéticos que causan cáncer pueden heredarse de los padres. Pueden suceder también en la vida de una persona como resultado de errores durante la división celular. Otras causas son los factores tanto externos (tabaco, organismos infecciosos, alimentación deficiente, sustancias químicas y radiación) como internos (mutaciones heredadas, niveles hormonales, problemas inmunitarios y mutaciones debidas al metabolismo; ACS, 2012).

Los tumores pueden formarse en todos los tipos de tejidos y de acuerdo a sus características pueden considerarse como benignos o malignos. Los tumores benignos generalmente pueden removerse y, en la mayoría de los casos, no reaparecen. Lo que es más importante, las células de tejidos tumorales no se extienden a otras partes del cuerpo, permanecen juntas y a menudo están rodeadas por una membrana de contención. En contraste en los tumores malignos las células pueden invadir, dañar tejidos y órganos

cercanos al tumor. Las células pueden separarse del tumor maligno y entrar al sistema linfático o el flujo sanguíneo, que es la manera en que el cáncer alcanza otras partes del cuerpo. La propagación del cáncer a otros sitios u órganos en el cuerpo mediante el flujo sanguíneo o el sistema linfático se llama metástasis. (Weigelt *et al.*, 2005).

1.2 Epidemiología del cáncer

Existen más de 100 tipos diferentes de cáncer, y se denominan de acuerdo a la parte del cuerpo donde inicia su desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2012 murieron 8.2 millones de personas por esta enfermedad; los varones principalmente por cáncer de pulmón, estómago, riñón, colon y esófago; mientras que las mujeres por cáncer de seno, pulmón, estómago, colon y cervical. Asimismo, destaca que aproximadamente 70% de las muertes por cáncer se presentan en países de ingresos bajos y medios (World Health Organization [WHO], 2013 y 2014a) donde se dificulta la atención de esta enfermedad.

En México el cáncer representa la tercera causa de muerte. En 2012 se registraron 78,719 defunciones por esta causa con una tasa de mortalidad general de 67.8 por cada 100,000 habitantes y de acuerdo al género, las mujeres resultaron ligeramente más afectada con una tasa de mortalidad de 68% y el masculino 67.5% (SSA, 2015). Durante el 2013, del total de defunciones, 12.8% se debieron a algún tumor y de éste total, el 93.4% fue por tumores malignos.

Los tipos de cáncer que causan la mayor mortalidad en orden de importancia son: pulmonar, prostático, gástrico, hepático y mamario (World Health Organization [WHO], 2013; SSA, 2015). Sin embargo, de acuerdo al sexo, para el femenino se presentan mamario, cervicouterino y hepático, mientras que los hombres se ven mayormente afectados por el cáncer prostático, pulmonar y gástrico (Cuadro 1.1; SSA, 2015).

Dada la tendencia creciente de la incidencia del cáncer en la población mundial y en particular en la mexicana, así como al fuerte impacto económico que esta enfermedad tiene sobre los sistemas de salud de cada país es que es necesario encontrar alternativas de tratamiento para esta devastadora enfermedad

Cuadro 1.1 Tasa de mortalidad en México en el año 2012 de acuerdo a los cinco principales tipos de cáncer incidentes en los diferentes sexos

Tipo de cáncer en hombres	Defunciones en 2012	Tipo de cáncer en mujeres	Defunciones en 2012
Próstata	5,908	Mama	5,612
Bronquios y pulmón	4,140	Cervicouterino	3,840
Estómago	2,981	Hígado	2,890
Hígado	2,757	Estómago	2,593
Colon	2,034	Bronquios y pulmón	2,238

Fuente: Base de defunciones 1990-2012. Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). Secretaría de Salud, México. Estimaciones de población; Consejo Nacional de Población (CONAPO), México 1990-2012.

Las plantas medicinales han sido una opción que se ha utilizado durante siglos para combatir o prevenir todo tipo de enfermedades, desde resfriados comunes hasta afecciones más avanzadas como el cáncer. Muchas de las especies vegetales de tipo medicinal ayudan a fortalecer el sistema inmunológico para que el organismo resista los embates de los agentes causales de la enfermedad, impidiendo su establecimiento, desarrollo y avance.

1.3 *Capsicum chinense* Jacq. (Chile Habanero)

En las diferentes culturas americanas el chile ha sido una parte predominante de la dieta alimenticia dado el gusto de los nativos por aderezar sus platillos con ingredientes naturales que les proveían de color, olor y sabor, tal es el caso del chile, una pungente verdura (Hernández-Becerra, 2010).

En México y la península de Yucatán, los chiles han sido parte de la dieta humana desde el año 7500 Antes de Cristo (A.C.); mucho antes del esplendor de las culturas maya y azteca; dos grandes civilizaciones centroamericanas. A partir de su uso como especia, los chiles fueron ganando importancia, y en la cultura Olmeca, 1000 años A.C., ya eran un alimento y condimento esencial. No obstante, fue en la cúspide de la civilización maya (500 años después de Cristo (D.C), particularmente en el sur de México. y en la península de

Yucatán donde se llegaron a cultivar hasta treinta diferentes variedades de *Capsicum* sp (Figura 1.1; Long-Solís, 1998).



Figura 1.1 Frutos de diferentes ejemplares del género *Capsicum* sp., cultivados en diferentes regiones de México

El picor o pungencia es una característica típica de los chiles y se debe a la presencia de diferentes concentraciones de capsaicina en la placenta y en el pericarpio de los frutos. Además de su picor, los frutos de chile son una excelente fuente de vitaminas A y C, además de que su elevada concentración de betacarotenos y flavonoides los convierte en una magnífica fuente de antioxidantes (Ruiz-Lau *et al.*, 2011).

El género *Capsicum* comprendido en la familia de las solanáceas, incluye 38 especies y 300 variedades (Ramchiary *et al.*, 2014; Mongkolporn *et al.*, 2011).

De las 38 especies del género *Capsicum* 5 han sido domesticadas. *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum pubescens* y *Capsicum baccatum* L. (Cuadro 1.2) y son usadas en el mundo como verdura fresca o como especias y condimentos (Ramchiary *et al.*, 2014; Mongkolporn *et al.*, 2011).

Las diferentes clasificaciones taxonómicas de las especies de chiles a menudo se han realizado con diferentes criterios, en algunos casos en las especies silvestres se han realizado en base a los frutos pequeños, mientras que en las domesticadas se han realizado con base en los frutos grandes. Otro criterio ha sido el contenido de capsaicina responsable

de la pungencia del chile y también se han utilizado criterios dependiendo del color que tuviese la flor (Long-Solís, 1998).

La clasificación de los *Capsicum* domésticos, basada en el color de las flores, produce tres grupos: dos de flores blancas y uno de flores moradas, el grupo de las flores blancas está compuesto por: *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum chinense* Jacq. con bastante similitud entre sí. El otro conjunto con flores blancas está representado por *Capsicum baccatum* L.; en contraste, *Capsicum pubescens* R. & P. tiene flores moradas y varias características morfológicas que lo separan de las demás (Ramchiary *et al.*, 2014; Long-Solís, 1998).

Cuadro 1.2 *Capsicum* domesticados con sus descripciones botánicas, lugar de origen, así como de su especie progenitora

Especie cultivadas	Progenitores espontáneos	Lugar de origen	Descripción botánica
<i>Capsicum annuum</i> L. var. annuum	<i>Capsicum annuum</i> Var. Glabruscum/ Aviculare	Mesoamérica	Es una hierba anual erecta, Los tallos son erectos de hasta 1 m de altura, las hojas son de color verde oscuro y las flores se presentan en grupos de uno a cinco, su fruto es una baya.
<i>Capsicum frutescens</i> L.	<i>Capsicum frutescens</i>	Cuenca amazónica	Es un sub-arbusto perenne y leñoso, de hasta 1,5 m, similar en estructura a <i>C. annuum</i> . Los frutos son pequeños y generalmente de color rojo cuando están maduros y muy picantes
<i>Capsicum baccatum</i> L.	<i>Capsicum baccatum</i> var. <i>bacatum</i>	Bolivia zona tropical. (500 – 1500 metros)	Es un arbusto leñoso, se distingue de otras especies por las marcas verdes amarillentas, marrones o negras en la garganta de la corola
<i>Capsicum chinense</i> Jacq.	<i>Capsicum frutescens</i>	Cuenca amazónica	Es un arbusto leñoso. Las plantas son de hasta 75 cm de altura. Las hojas son de color verde oscuro y los frutos son esféricos alargados lisos o arrugados y al madurar los frutos pueden ser de color rojo, naranja, amarillo o marrón.

Cuadro 1.2 continuación

Especie cultivadas	Progenitores espontáneos	Lugar de origen	Descripción botánica
<i>Capsicum pubescens</i> R. & P.	<i>Capsicum eximium</i> <i>Capsicum cardenasii</i>	Bolivia zona tropical (1500 - 3000 metros)	Hierba perenne de hasta 0.5 m de altura, Las flores son de color azul o púrpura en lugar de blanco o verdoso. Los frutos son variables en forma y son de color verde y amarillo cuando están inmaduros y rojo-anaranjado o marrón cuando maduran

Fuente: Charles, 2011; Long- Solís, 1998.

Diversos estudios ubican como centro de origen del género *Capsicum* al área comprendida entre el sur de Brasil y el este de Bolivia, el oeste de Paraguay y el norte de Argentina. Esto porque en dicha región se observa la mayor distribución y diversidad de especies silvestres de chile en el mundo (Soria *et al.*, 2012; Long-Solís, 1998). En el caso de la especie *Capsicum chinense* Jacq, también conocida como chile habanero, se ha propuesto que ésta se originó en el área de América del sur y que de ahí fue introducida a Cuba, antes de ser traída a la península de Yucatán (Long-Solís, 1998). En la actualidad el género *Capsicum* se cultiva en diversas partes del mundo, incluyendo India, China, África, Japón, Sureste de Asia, Belice, E.U.A. y México. Se sabe que la península de Yucatán, en México es donde se encuentra otro de los centros de diversificación de esta especie (Denys, 2013).

El chile “habanero” (*Capsicum chinense* Jacq.) es ampliamente consumido especialmente en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche y Tabasco. Yucatán ocupa uno de los primeros lugares en importancia en cuanto a la siembra de esta hortaliza se refiere (Tucuch-Haas *et al.*, 2012). Esta especie se encuentra distribuida en toda la península, donde se le puede encontrar mostrando diferentes formas, colores y tamaños del fruto. Como cultivo, tiene gran importancia económica para los productores de hortalizas en el estado de Yucatán, además de contar con la denominación de origen (Ruiz-Lau *et al.*, 2010).

En el mundo entero la importancia económica del chile se basa principalmente en la utilización de sus frutos. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el chile es a nivel mundial el quinto producto hortícola,


por superficie cultivada, dado que en la actualidad la superficie sembrada con estas especies es de 612,800 millones de hectáreas, lo que representa el 36% de la superficie total sembrada en el mundo con una producción de 12,531,000 toneladas anuales de fruto. México ocupa la tercera posición en el cultivo de chile con una superficie sembrada de 144,000 hectáreas y con una producción de 1,950,000 toneladas (Aceves *et al.*, 2008; Tucuch-Haas *et al.*, 2012; Santoya-Juárez *et al.*, 2012). México además de destacar a nivel mundial por poseer la mayor diversidad genética de chiles también se destaca por poseer más de 40 tipos o variedades de chiles.

En el caso del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), en México están sembradas 964 ha y se obtiene una producción de 5,300 toneladas anuales de fruto, concentradas principalmente en los estados del sureste del país (Tucuch-Haas *et al.*, 2012). El estado de Yucatán es el principal productor de *Capsicum chinense* Jacq. con una superficie sembrada de 708 ha y un volumen de producción de 3,295 toneladas anuales, seguido por los estados de Tabasco, Campeche y Quintana Roo (Tucuch-Haas *et al.*, 2012; Aceves *et al.*, 2008).

Aunque Yucatán es el estado con mayor superficie cultivada, sus rendimientos no alcanzan a cubrir la demanda local necesaria para la producción de salsas y condimentos. El bajo nivel de tecnología de producción y el uso de cultivos criollos degradados en su pureza y calidad de semilla son las causas principales de pobres cosechas, además de la incidencia de plagas y enfermedades, e insuficiente control de la nutrición y el riego (Tucuch-Haas *et al.*, 2012; Rincones, 2009).

Como cultivo, *Capsicum chinense* Jacq. tiene gran importancia económica para los productores de hortalizas en el estado de Yucatán, pues ocupa el segundo lugar, después del tomate, en cuanto a superficie sembrada. La mayor superficie de cultivo se encuentra en la parte norte del estado, y contribuye con más de 90 por ciento del volumen de la producción estatal, la cual principalmente se comercializa y se consume en fresco (Ruiz-Lau *et al.*, 2011). Desde el punto de vista botánico, el chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) se clasifica tal como se muestra en el Cuadro 1.3.

Cuadro 1.3 Clasificación taxonómica del *Capsicum chinense* Jacq.

Reino ^α	Plantae ^α	
Subreino ^α	Tracheobionta ^α	
Superdivisión ^α	Spermatophyta ^α	
División ^α	Magnoliophyta ^α	
Clase ^α	Magnoliopsida ^α	
Subclase ^α	Asteridae ^α	
Orden ^α	Solanales ^α	
Familia ^α	Solanaceae ^α	
Género ^α	<i>Capsicum</i> ^α	
Especie ^α	<i>Capsicum chinense</i> Jacq. ^α	

Las plantas de *Capsicum chinense* Jacq. son típicas de las áreas tropicales y cuentan con variedades como son el chile habanero, el ají panca y el ají limo. El chile habanero en particular es una de las variedades con mayor picor en todo el género *Capsicum*. Este género es originario de las amazonas y se introdujo en América Central, en la región de Yucatán y el Caribe donde se cultiva desde siglos atrás. Fue mal nombrado *Capsicum chinense* (de China) por Nikolaus von Jacquin, un médico holandés (Lim, 2013).

Las propiedades medicinales del género *Capsicum* se han atribuido a su alto contenido de capsaicina, un compuesto de tipo amida al cual se le atribuyen propiedades analgésicas contra el dolor crónico, muscular, de cabeza y las migrañas, además de poseer propiedades antibacteriales, su composición química se puede observar en el Cuadro 1.4 (Santoya Juárez *et al.*, 2012). Recientemente se ha demostrado que el género *Capsicum* también contiene péptidos y proteínas con propiedades antibacteriales y antifúngicas como

las proteínas de transferencia de lípidos o las defensinas (Hernández-Becerra, 2010) y que dichas proteínas en conjunto con la capsaicina forman parte de los compuestos con potencial terapéutico de los chiles.

Cuadro 1.4 Composición química del *Capsicum chinense* Jacq.

Nutriente (%)	Cantidad
Agua	91
Carbohidratos	5.30 g
Proteínas	2.2 g
Fibra	1.6 g
Grasas totales	0,8 g
Colesterol	0 g
Calcio	18 mg
Hierro	2,4 mg
Magnesio	25.00 mg
Sodio	7.00 mg
Potasio	340 mg
Zinc	0.30 mg
Retinol	59.00 mg
Ácido ascórbico	94.00 mg
Tiamina	0.11 mg
Riboflavina	0.16 mg
Niacina	0.70 mg
Piridoxina	0.28 mg
Ácido fólico	23.00 mg

Fuente: Long Solís, 1998; Hernández-Becerra, 2010.

Una de las propiedades que han sido conferidas al consumo de chile es su capacidad para prevenir o inhibir algunos tipos de cáncer, tal es el caso de los de intestino, colon y estómago. Sin embargo, hasta hoy no se ha determinado si dicha capacidad se asocia con la presencia de capsaicina o con los péptidos antimicrobianos o si tal resultado

es producto del efecto sinérgico de ambos tipos de compuestos (Santoya-Juárez *et al.*, 2012).

Estudios con los péptidos antimicrobianos de *Capsicum* sp han mostrado que estos péptidos presentan su efecto debido a su capacidad para interactuar con los grupos de lípidos cargados negativamente y que exponen sus cargas hacia la superficie externa de la membrana de los patógenos; de hecho tal asociación causa una disminución en la fluidez de la membrana y en consecuencia resulta en la formación de poros o huecos en la membrana mismos, que ocasionan la pérdida del contenido celular y la muerte del patógeno (Santoya-Juárez *et al.*, 2012). Hasta hoy se desconoce si tal mecanismo también funciona en la inhibición de las células cancerígenas.

1.4 Proteínas DING

Estudios recientes del grupo de trabajo han descrito la presencia de una familia de proteínas DING en las semillas de *Capsicum chinense* Jacq. (datos no publicados). La presencia de dichas proteínas en las semillas de *Capsicum chinense* Jacq. es interesante porque en otras especies a estas proteínas se les han atribuido propiedades antimicrobianas y anticancerígenas (Bernier, 2013). En el caso de *Capsicum chinense* Jacq. aun se desconoce cuál es la función de las proteínas DING en esta especie. Se ha descrito que DING es una familia de proteínas con un peso molecular aproximado de 40 kDa, con una secuencia de aminoácidos N-terminal conservada que comprende al ácido aspártico (D), isoleucina (I), asparagina (N) y glicina (G). Las proteínas DING han sido identificadas en un amplio rango de organismos desde: procariontes, animales, hongos y plantas. No obstante, las proteínas DING presentan diferentes funciones biológicas: algunas se comportan como receptores, otras exhiben actividades enzimáticas diversas y se ha asociado su presencia con enfermedades como la artritis reumatoide, la litiasis, la aterosclerosis, aparición de algunos tumores, caquexia asociada a tumores y las infecciones bacterianas y virales (Cuadro 1.5) (Zuoqi *et al.*, 2013; Bookland *et al.*, 2011; Berna *et al.*, 2009; Lesner *et al.*, 2009), aunque su función en dichos desórdenes no es clara (Bernier, 2013).

Filogenéticamente, las proteínas DING pertenecen a la superfamilia de proteínas de unión a fosfato (PBP) que comprende también a PstS y a la fosfatasa alcalina (AP), las dos últimas se encuentran exclusivamente en procariontes. A la fecha, más de medio

centenar de diferentes proteínas DING han sido reportadas en todos los reinos de la vida, sin embargo, su estructura genómica y ubicación cromosómica en la mayoría de los organismos eucariotas es todavía desconocida (Berna *et al.*, 2009; Sachdeva *et al.*, 2013).

Estudios estructurales de la proteína humana de unión de fosfato (HPBP) y la proteína DING de *Pseudomonas fluorescens* (PfluDING) revelan interesantes detalles acerca de su conformación proteica pues de manera similar a PstS, las proteínas DING están formadas por dos dominios globulares unidos entre sí por una bisagra flexible que permite movimientos en el sitio de unión a fosfato, también conocido como “trampa de venus” (Sachdeva *et al.*, 2013).

Las proteínas DING son un grupo de la superfamilia de proteínas de unión a fosfato y que en procariontas incluye a tres familias de proteínas. El primero comprende a las proteínas DING "reales", que comienzan con la firma DINGG-terminal típica, mientras que los otros dos grupos no muestran el dominio DING N-terminal e incluyen a las fosfatasas alcalinas y a las subunidades PstS de los transportadores de fosfato tipo ABC (MW entre 38 y 40 kDa). El porcentaje de identidad de los aminoácidos entre estos dos últimos grupos de proteínas (PstS o el transportador de fosfato tipo ABC con las proteínas DING reales, se encuentra entre un 30 a 50%, mientras que las identidades entre las proteínas DING verdaderas es siempre mayor de 70% (Bernier, 2013).

En el caso de las proteínas DING cada vez hay más evidencia de que participan en procesos relacionados con la salud tales como la inhibición del cáncer e infecciones virales, particularmente en la inhibición de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana, tipo 1 (HIV-1, de sus siglas en inglés), por mecanismos que están empezando a ser elucidados, pero de los que aún se desconoce bastante (Lesner *et al.*, 2009). Por tanto, las proteínas DING representan blancos atractivos para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos, especialmente contra el VIH-1 o el cáncer (Bernier, 2013). Esto podría abrir una nueva época en la investigación, acerca de la importancia y aplicación de esta familia de proteínas (Bernier, 2013).

Cuadro 1.5 Proteína DING, procedencia, funciones y potencial para la salud

Especie de procedencia de la proteína DING	Fuente de origen de la proteína DING	Funciones conocidas /ligandos
BACTERIAS		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MDR1, MDR13 GP-56	- Virulencia: la adhesión y la alteración de las células del epitelio intestinal -Asociada con leishmaniasis
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	SBW25 (expresada en <i>E. coli</i>)	-Unión a fosfato y cotinina, mitógeno (SBW25)
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> ^a	N.E.	N.E.
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> ^a	N.E.	N.E.
<i>Pseudomonas</i> sp. PAMC 25886 ^a	N.E.	N.E.
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	N.E.	Hidrogenasa Fe
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	DSM1675 (crecimiento en malato/etanol)	Hidrogenasa
<i>Prevotella nigrescens</i>	Cepa Pn77 (pacientes con periodontitis)	Ligando para lactoferrina
<i>Thermus thermophilus</i>	Cepa HB8	Fosfatasa alcalina, ATPasa, fosfodiesterasa.
<i>Bacillus mojavensis</i>	Cepa A21	Proteasa alcalina de serina
<i>Bacillus licheniformis</i>	N.E.	Queratinasa
<i>Streptomyces mirabilis</i>	Cepa DUT001	Nitroreductasa
HONGOS		
<i>Ganoderma lucidum</i>	Crecido en selenio	Unión a selenio
<i>Colletotrichum kahawae</i> and <i>C. gloeosporioides</i>	Café infectado	Cutinasa

Cuadro 1.5 continuación

Especie de procedencia de la proteína DING	Fuente de origen de la proteína DING	Funciones conocidas/ligandos
ANIMALES		
<i>Homo sapiens</i>	Plasma HPBP Fibroblastos.	Unión a fosfato Proteína estimuladora sinovial
<i>Homo sapiens</i>	-Orina -Células cancerígenas, fluido folicular de ovarios -Fibroblastos carcinomas -Secretadas de células CD4	-unión a oxalato -Unión a genisteína -Unión a hirudina -Inhibición de VIH
<i>Cercopithecus aethiops (mono)</i>	-Células de riñón	Unión a oxalato
<i>Bos taurus (Bovino)a</i>	-Fluido folicular	inhibición de oleada Gonadotropinas / factor atenuante (GnSIF/AF)
<i>Mus musculus (ratón)</i>	- Células de mioblasto	proteólisis factor inductor del receptor
<i>Rattus norvegicus (rata)</i>	-Neuronas -tero	- receptor de cotinina -unión a manosa
<i>Oryctolagus cuniculus (Conejo)a</i>	-aorta	Desconocido
<i>Marmota monax (marmota)</i>	-plasma (infectado de VIH)	Asociado con partículas virales del virus de la hepatitis B
<i>Meleagris gallopavo (Pavo)</i>	-Fluido del saco de aire y el suero	Polisacárido
<i>Agkistrodon acutus (serpiente)a</i>	-Veneno	Fosfatasa alcalina

Cuadro 1.5 continuación

Especie de procedencia de la proteína DING	Fuente de origen de la proteína DING	Funciones conocidas/ligandos
ANIMALES		
<i>Brachionus plicatilis</i> (Rotífera)	- medio acondicionado	Proteína inductora de Mixis
PROTOZOARIOS		
<i>Cryptosporidium parvum</i> ^a	-Células superficiales	Ligando Circumsporozoito (adhesión a células epiteliales)
<i>Leishmania major</i> Friedlin	N.E.	N.E.
<i>Thalassiosira rotula</i> (Diatomea) ^a	N.E.	Enzima hidrolasa- de galactolipidos
PLANTAS		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	N.E.	N.E.
<i>Brassica rapa</i>	Brotos de flores	β -esterasa
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Frijol Francés)	Cultivos celulares en suspensión	Proteína de pared celular
<i>Triticum aestivum</i> (Trigo)	Hojas	N.E.
<i>Hypericum perforatum</i> (St John's wort)	Callos	Fosfatasa; ligando a C/EBP β , Tat, MCP-1
<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabaco)	Hojas	Proteína parecida a germina (GLP)
<i>Helianthus tuberosum</i> (Girasol)	Tubérculos	Citotóxico para células tumorales en plantas y animales
<i>Sesbania grandiflora</i>	Flores	Inhibidor de α -glucosidasa
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Tilacoides	Fosfatasa

Fuente: Bernier, 2013. N.E.= No establecido

1.5 Modificaciones postraduccionales

La modificación postraducciona de una proteína es un cambio químico ocurrido en dichas macromoléculas después de que ha ocurrido su síntesis en los ribosomas (Martínez *et al.*, 2008). Tales modificaciones tienen por objetivo el alterar la estructura de los polipéptidos recién sintetizados con el fin de producir el correcto plegamiento y la adquisición de la conformación de las proteínas. En conjunto esos factores son fundamentales para la actividad biológica de las proteínas (Pérez, 2013).

Son varias las modificaciones postraduccionales que las células llevan a cabo, y no todas las proteínas se modifican para ser funcionales. Se han reportado cerca de 200 modificaciones postraduccionales y consisten en la alteración química o la escisión de péptidos de la estructura proteica (Garzón, 2011).

Una proteína puede ser modificada más de una vez. Dichas modificaciones pueden producirse separadas o de forma continua en un mismo residuo de la proteína. Algunas modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, formación de enlaces disulfuro o la modificación por ciertos lípidos, pueden estar involucradas en la maduración, correcto plegamiento y localización de las proteínas recién sintetizadas. Otras, como la fosforilación, son transitorias y son esenciales en la señalización celular (Garzón, 2011). Si se toman en cuenta estas modificaciones y cambios de estructura, entonces la función de las proteínas aumenta hasta dar lugar a más de un millón de posibilidades de diferentes proteínas y todas ellas pueden desempeñar distintas funciones en las células. Entonces, la modificación postraducciona de proteínas es un evento fundamental en la regulación de las respuestas celulares (Pérez, 2012).

1.5.1 Fosforilación de proteínas

La fosforilación-desfosforilación de proteínas es un proceso que ocurre en todos los seres vivos. Dicho evento de adición-remoción de fosfato en las proteínas es el resultado de la acción concertada de cinasas y fosfatasas, las cuales mantienen los niveles de fosforilación en las proteínas blanco (Flores *et al.*, 2005). Como consecuencia de tal modificación, las actividades regulatorias de las proteínas blanco resultan modificadas. Por ejemplo, los estímulos que modulan el crecimiento o la muerte celular lo hacen a través de la fosforilación de proteínas (Pérez, 2012; Flores *et al.*, 2005). El conocimiento en detalle

de tal evento ha permitido diseñar y sintetizar inhibidores específicos de las proteínas cinasas y tales compuestos actualmente se emplean para bloquear la proliferación de las células en terapias antitumorales o se encuentran en fase experimental con este fin (Pérez, 2012).

1.5.2 Glicosilación de proteínas

La glicosilación es una modificación que consiste en la unión de oligosacáridos a residuos de aminoácidos. Las proteínas de la membrana plasmática y las de secreción son glicoproteínas (Martínez *et al.*, 2008). Estas proteínas son sintetizadas en los ribosomas, transportadas al interior del retículo endoplásmico rugoso donde a su paso incorporan cadenas de oligosacáridos. Se conoce que la glicosilación de proteínas ocurre tanto en el retículo endoplásmico como en el aparato de Golgi (www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/capítulo_03). Aunque el tipo de glicosilación (*N*-glicosilación u *O*-glicosilación) no es un evento exclusivo de organelos, se acepta que en el retículo endoplásmico ocurre mayoritariamente la *N*-glicosilación, evento en el cual los oligosacáridos se conjugan al grupo amino (NH₂) de un residuo de asparagina a través de un enlace *N*-glicosídico. Por otra parte, en el aparato de Golgi ocurre la *O*-glicosilación, la cual involucra la adición de oligosacáridos en el grupo hidróxilo (OH) de serina, treonina o tirosina con la formación de un enlace *O*-glicosídico (Martínez *et al.*, 2008).

N-glicosilación

La *N*-glicosilación es una modificación co- y post-traducciona que ocurre en el retículo endoplásmico (RE) y en el aparato de Golgi, principalmente bajo la acción de diversas enzimas llamadas glicosiltransferasas (Martínez *et al.*, 2008).

Las proteínas *N*-glicosiladas en el Retículo Endoplásmico Rugoso son modificadas en el aparato de Golgi por distintos tipos de proteínas que tienen diferentes actividades enzimáticas ya que añaden o quitan diferentes tipos de azúcares (*N*-acetilglucosamina, ácido siálico, glucosa, galactosa, fucosa, etc.) en los *N*-oligosacáridos (Martínez *et al.*, 2008). ácido siálico, glucosa, galactosa, fucosa, etc.) en los *N*-oligosacáridos (Martínez *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008).

Los *N*-oligosacáridos se sintetizan en el aparato de Golgi mediante una secuencia ordenada de reacciones de modificación del *N*-oligosacárido y se añaden a las proteínas 14 residuos de azúcares (GlcNAc₂Man₉Glc₃, considerado como el *N*-oligosacárido base).

En el retículo endoplásmico rugoso (RER) se elimina parte del *N*-oligosacárido base (los tres residuos de glucosa (Glc) y una de las manosas (Man)). Tras el transporte de la proteína al aparato de Golgi, ese *N*-oligosacárido (GlcNAc₂Man₈) sufre diversas modificaciones llamadas glicosilación. La primera modificación, es la eliminación de tres residuos de manosa. A esto le sigue la adición de la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), la eliminación de dos manosas más y la adición de una fucosa y de otras dos *N*-acetilglucosaminas. Finalmente se añaden dos galactosas y dos residuos de ácido siálico. Las distintas *N*-glicoproteínas se modifican de modo diferente durante su paso a través del aparato de Golgi (Martínez *et al.*, 2008) y dependiendo de su estructura, es como la proteína será procesada, así como la cantidad de enzimas implicadas en tal proceso. Por dicha razón las proteínas pueden salir del aparato de Golgi con diversos *N*-oligosacáridos unidos a ellas (Martínez *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008).

Los azúcares añadidos a las proteínas tienen un papel primordial en promover el correcto plegamiento y ensamblaje, aumentar la estabilidad de la proteína o pueden estar involucrados en la interacción proteína-proteína o en el reconocimiento de célula a célula (Martínez *et al.*, 2008).

O-glicosilación

Además de la *N*-glicosilación, las proteínas pueden estar sujetas a eventos de O-glicosilación para dar origen a las O-glicoproteínas. Durante este proceso, los O-oligosacáridos se añaden a las proteínas en el aparato de Golgi. Los O-oligosacáridos están unidos por enlaces O-glicosídicos al átomo de oxígeno(O) de los aminoácidos Serina (Ser) o Treonina (Thr) de una cadena polipeptídica (Martínez *et al.*, 2008).

La O-glicosilación de proteínas comienza en el aparato de Golgi con la unión de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) o manosa (Man) a residuos de serina (Ser), treonina (Thr) o tirosina (Tyr) de la proteína. Los residuos de *N*-acetilgalactosamina, galactosa, fucosa o ácido siálico son añadidos unos a uno de manera secuencial con diferentes tipos de enlaces, resultando por ello en diferentes O-oligosacáridos (O-glicanos) con una estructura ramificada. Un ejemplo característico de O-oligosacáridos con cadenas laterales que pueden inducir una respuesta inmunológica son los grupos sanguíneos (antígenos) A, B, y O los cuáles están unidos a proteínas o lípidos presentes en la superficie de los eritrocitos (glóbulos rojos) y otros tipos de células (Martínez *et al.*, 2008).

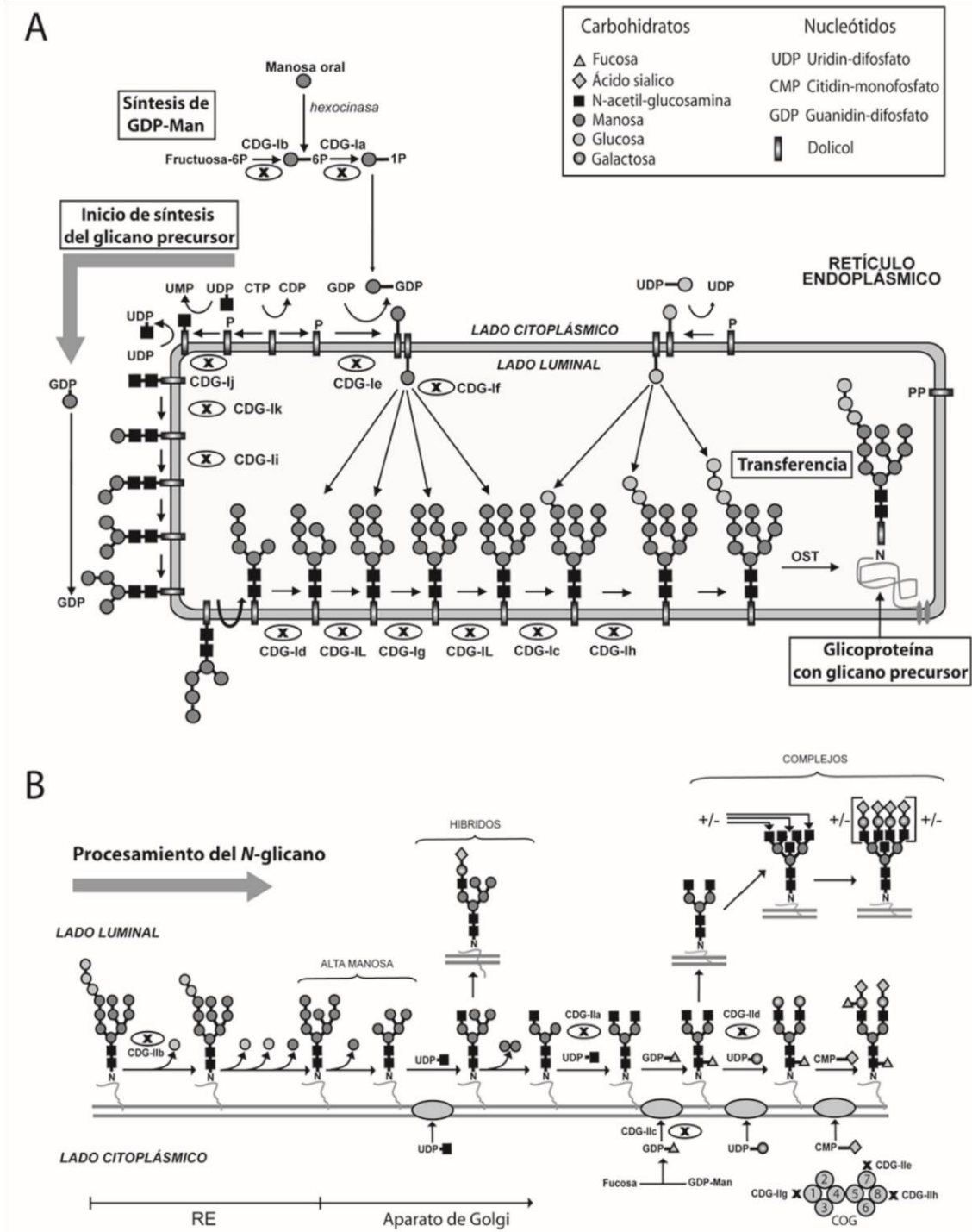


Figura 1. 2 Vía de la *N*-glicosilación. A. Síntesis del oligosacárido precursor GlcNAc2Man9Glc3 que se inicia por una serie de reacciones en la cara citosólica del retículo endoplásmico (RE). B. Procesamiento de la glicoproteína; comienza en el RE y finaliza en

Dado lo interesante que resulta el entender el mecanismo de acción de las proteínas DING y a que no se conoce si esta familia de proteínas presenta modificaciones postraduccionales así como el efecto que tales modificaciones podrían estar ejerciendo en las funciones biológicas de dichas proteínas, entonces la proteína DING aislada en semillas de *Capsicum chinense* Jacq. representa una posibilidad para determinar si dicha proteína está fosforilada o glicosilada y si tal clase de modificaciones pudieran estar regulando su actividad biológica.

En el grupo de trabajo se han realizado diferentes análisis bioquímicos sobre la fracción G10P1.7.57 y se determinó su capacidad para inhibir el crecimiento de diferentes bacterias fitopatógenas (Brito-Argáez *et al.*, 2009). De igual forma se ha confirmado que dicha fracción posee actividad de fosfatasa sobre diferentes sustratos fosfatados (Brito-Argáez *et al.*, datos no publicados). Por medio de secuenciación de proteínas se determinó que la fracción G10P1.7.57 está constituida por cuatro polipéptidos y que el mayoritario de 7.57 kDa corresponde a un producto de proteólisis de la proteína DING de ~ 39 kDa (datos no publicados). Experimentos de fosforilación con ^{32}P - γ -ATP en la fracción G10P1.7.57 mostraron que el péptido mayoritario (7.57 kDa) resultó fosforilado (datos no publicados), aunque no se determinó si la incorporación de $^{32}\text{PO}_4$ fue el resultado de su utilización como sustrato o si él mismo actúa como cinasa.

A partir de la secuenciación del péptido de 7.57 kDa se seleccionó la secuencia de aminoácidos ITYMSPDYAAPTLAGLDDATK y contra ella se produjo e inmunopurificó un anticuerpo altamente específico, el cual reconoce a una proteína DING de ~ 39 kDa en semillas de *Capsicum chinense* Jacq. (Uc-Ku, 2013; datos no publicados). Con dicho anticuerpo, por medio de western blot se ha determinado que la proteína de ~ 39 kDa está presente en el tallo, hojas, semillas y flores de *Capsicum chinense* Jacq. (Uc-Ku, 2013; datos no publicados).

En este trabajo se propuso determinar si el nivel de glicosilación o de fosforilación de la fracción G10P1.7.57 es un factor determinante en la actividad biológica de la proteína. De igual manera y dado lo interesante que resulta el determinar si una vez aislada de la fracción G10P1.7.57, la proteína DING (~ 39 kDa) de *Capsicum chinense* Jacq. mantiene su actividad biológica y como dicha actividad se afectaría si se remueven sus modificaciones postraduccionales. Con ese objetivo, en este trabajo dicha proteína se aisló de la fracción G10P1.7.57 y una vez aislada, tanto la fracción G10P1.7.57 como la proteína

DING, se aplicaron en las líneas celulares SiHa, MCF-7, Hep-G2 y PC-3. Por otra parte, la fracción G10P1.7.57 y la proteína DING de manera independiente fueron desglucosiladas por medio de mezclas de *N*- y *O*-glucosidasas o fosforiladas-desfosforiladas por medio de cinasas y fosfatasas. Una vez que la fracción G10P1-7.57 y la proteína DING que habían sido sometidas a la adición/remoción de los grupos pertinentes, entonces fueron adicionadas a las líneas tumorales (SiHa, MCF-7, Hep-G2 y PC-3), con el objetivo de determinar cómo dicha manipulación afecta la actividad biológica de la fracción y de la proteína DING. La actividad biológica se evaluó mediante la determinación del crecimiento de las líneas tumorales, así como mediante la evaluación de la actividad de fosfatasa de la fracción G10P1.7.57 y de la proteína DING de *Capsicum chinense* Jacq.

1.6 HIPOTESIS

Las proteínas DING de origen vegetal participan en la inhibición de la división celular de líneas tumorales de mamíferos, entonces es posible que la fracción G10P1.7.57 de *Capsicum chinense* Jacq. y la proteína DING contenida en ella mantenga propiedades de inhibición parecidas a las de sus homólogos proteicos.

1.7 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la fracción G10P1.7.57 y de la proteína DING de *Capsicum chinense* Jacq. sobre el crecimiento *in vitro* de líneas tumorales.

1.7.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el efecto de la fracción G10P1.7.57 sobre el crecimiento de las líneas tumorales, Hep-G2, SiHa, MCF-7 y PC-3
- Evaluar el efecto de la proteína DING de *Capsicum chinense* sobre el crecimiento de la línea tumoral MCF-7
- Evaluar el efecto de la fracción G10P1.7.57 desglucosilada y fosforilada sobre el crecimiento de la línea tumoral MCF-7

1.8 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la humanidad se encuentra en la búsqueda de productos alternativos para afrontar la grave problemática sanitaria que se presenta en enfermedades tales como el cáncer. Esta enfermedad aún no cuenta con una cura por lo cual es un reto vigente para el sector salud. En los últimos años se ha propuesto que las proteínas DING podrían ser utilizadas como un medio alternativo de tratamiento contra esta insidiosa enfermedad. Bajo esa perspectiva, la proteína DING detectada en las semillas de *Capsicum chinense* Jacq., así como la fracción G10P1.7.57 son buenos candidatos de estudio para evaluar su efecto *in vitro* sobre líneas tumorales, esto con el objetivo de determinar su potencial ya sea como inhibidores del desarrollo de la enfermedad o como componentes de tratamientos contra el desarrollo de la enfermedad.

1.9 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

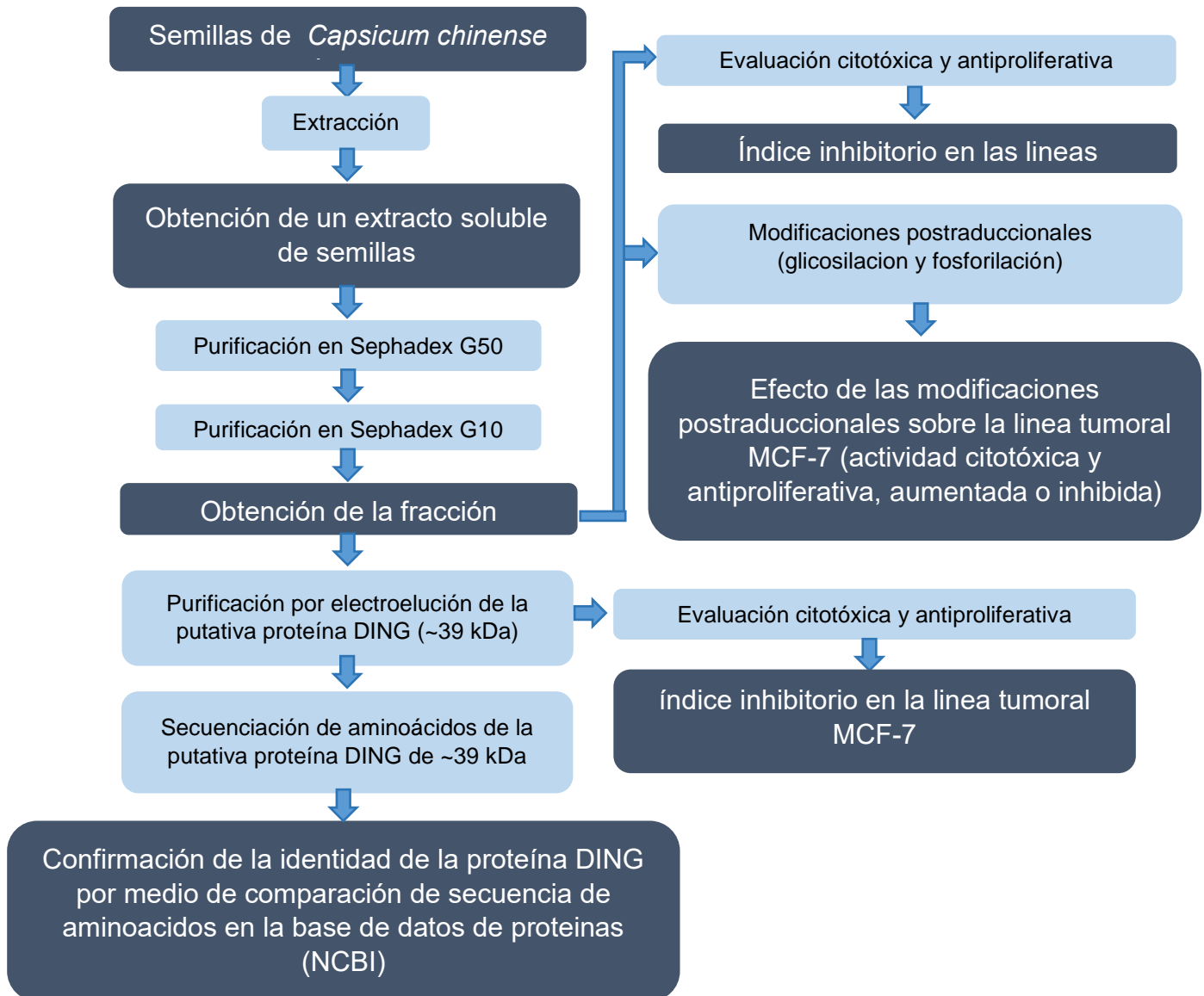


Figura 1.3 Estrategia experimental desarrollada para la purificación de la fracción G10P1.7.57 y de la proteína DING, así como del ensayo de su actividad biológica sobre diferentes líneas tumorales

CAPÍTULO II

2.1 INTRODUCCIÓN

Hoy en día hay múltiples medicamentos de uso clínico que son generados para el tratamiento de enfermedades como el cáncer. Este tipo de fármacos está dirigido para bloquear el crecimiento y diseminación de las células cancerígenas ya que interfieren con blancos específicos que controlan la división celular o el crecimiento). Desafortunadamente, su baja selectividad de acción, sus costosos efectos secundarios y la generación de resistencia celular contra dichos compuestos es un reto de salud que debe resolverse (American Cancer Society 2012; Cancer Council NSW en su página [www. http://languages.cancercouncil.com.au/](http://languages.cancercouncil.com.au/); Luna *et al.*, 2006).

Las diferentes opciones con las que se puede tratar el cáncer están determinadas por varios factores, entre ellos se incluyen las condiciones físicas del paciente, la edad, la nutrición y lamentablemente, los económicos (Cancer Quest., <http://www.cancerquest.org/>). Dependiendo de dichos factores y del tipo de cáncer, será la terapia que el paciente recibirá y sin ninguna garantía de solución al problema. Dentro de las opciones más socorridas se mencionan las siguientes.

a) Cirugía; se utiliza para el diagnóstico del cáncer, determinar su estado, tipo y probable agresividad y posible tratamiento. La biopsia es un tipo común de cirugía que consiste en tomar una muestra de tejido sospechoso de ser canceroso para que sea examinado en un laboratorio por un especialista (American Cancer Society 2012; Cancer Quest., <http://www.cancerquest.org/>; Muñoz, 1997; Miller, 1981).

b) Quimioterapia; en esta estrategia se emplean fármacos para matar las células cancerosas. El tratamiento puede ser administrado oralmente o inyectado en vena. Algunos de estos medicamentos son compuestos naturales que se encuentran en varios tipos de plantas y algunos compuestos son productos de síntesis química (American Cancer Society, 2012; Cancer Quest., <http://www.cancerquest.org/>; Muñoz, 1997; Miller, 1981).

c) Radioterapia; en este método se usan ondas de alta energía para dañar o matar las células cancerosas y prevenir el crecimiento de estas (American Cancer Society 2012; Cancer Vuest., <http://www.cancerquest.org/>; Muñoz, 1997; Miller, 1981).

Dado lo fortuito de la remisión de los casos de cáncer que se ha conseguido con los tratamientos descritos anteriormente, en los últimos años se ha intensificado la investigación en busca de nuevas alternativas, para la cura o la prevención de dicho desorden. Los productos naturales y particularmente los relacionados con el uso de proteínas terapéuticas es un área que está siendo reanalizada de manera muy cuidadosa pues en años recientes se ha visto que estas macromoléculas son una fuente potencial de prevención de dicha enfermedad. Las proteínas DING son una clase particular de proteínas con actividad enzimática de fosfatasa y con interesantes funciones biológicas. En células animales, la presencia de esta familia de proteínas está asociada con funciones contradictorias en la salud; por ejemplo, su aparición se relaciona con el desarrollo de enfermedades como el cáncer de mama y la caquexia, pero también con la protección contra la arterioesclerosis y la litiasis y algunas proteínas DING muestran propiedades citotóxicas sobre células tumorales o de inhibición de la replicación del virus VIH-1. Estudios acerca de las actividades biológicas de las proteínas DING demuestran que sus funciones biológicas y su mecanismo de acción puede ser variado y el resultado contrastante. Por ello, en este estudio se analizará el efecto de la fracción G10P1.7.57 y de la proteína DING purificada a partir de dicha fracción sobre las líneas tumorales PC-3, MCF-7, SiHa y Hep-G2.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Obtención de semillas y desinfección

Las semillas de *Capsicum chinense* Jacq. se obtuvieron a partir de frutos verdes que estaban disponibles para su consumo en fresco (madurez comercial). Los pericarpios del fruto se separaron por medio de un corte transversal con un bisturí. Las semillas se removieron de la placenta con una pinza. Las semillas se desinfectaron por 10 min en una disolución de cloro comercial al 5%. Concluido el tiempo de lavado, a las semillas se les adicionó etanol al 5% por 10 min. Concluida la incubación, las semillas se enjuagaron por tres veces con agua bidestilada estéril, cada lavado se realizó bajo agitación constante por 10 min. concluidos los lavados, las semillas se procesaron de inmediato. En caso contrario, las semillas fueron almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.2 Obtención del extracto crudo y extracto soluble

Las semillas fueron colocadas en una licuadora industrial desinfectada, se les adicionó nitrógeno líquido y se homogeneizaron hasta formar un polvo fino. Al polvo se le

agregaron 80 mL de amortiguador de extracción (50 mM Tris-HCl, 1 mM NaCl pH 7.4 y una pastilla/L de inhibidores de proteasas (Complete™ Roche). La mezcla se homogeneiza. posteriormente se filtró en una malla de 6 capas de gasa estéril; posteriormente el filtrado se centrifugó a 14,000 × *g* por 30 min. Se recuperó el sobrenadante y se le denominó como extracto crudo. El extracto crudo se centrifugó por segunda ocasión a 100,000 × *g* por 45 min. Al concluir la centrifugación se recuperó el sobrenadante y se le denominó como fracción soluble, se dividió en alícuotas de 1200 µL y se almacenó en congelación a –20 °C.

2.2.3 Purificación del extracto soluble y fracción G10P1.7.57

Se inyectaron 1200 µL de fracción soluble en una columna de cristal empacada con 45 mL de resina Sephadex G-50, equilibrada con amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 7.4 adicionado con 1 mM NaCl. En cada proceso de cromatografía se colectaron 95 fracciones, cada fracción contenía 750 µL de eluato, dicho volumen se colectó en 3 min. Las fracciones conteniendo las proteínas de interés fueron mezcladas y liofilizadas como mínimo por 3 días, o hasta que la muestra estuvo completamente deshidratada. El liofilizado se resuspendió en 250-300 µL del amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 7.4 adicionando con 1 mM NaCl y se le denominó fracción G50P2. Las resuspensiones de G50P2 fueron mezcladas y aplicadas en una segunda columna empacada con 40 mL de Sephadex G10. Las fracciones de esta segunda columna fueron colectadas en volúmenes de 750 µL, analizadas para la presencia de la proteína de interés y las fracciones que contenían a la proteína de interés fueron mezcladas y liofilizadas tal como se describió arriba. Los liofilizados fueron resuspendidos en 250 µL de amortiguador 50 mM Tris-HCl, 1 mM NaCl pH 7.4. Cada una de las fracciones resultantes fue denominada como fracción G10P1.7.57.

2.2.4 Secuenciación de la proteína DING presente en la fracción G10P1.7.57

Las muestras fueron reducidas con ditioneitol (DTT), se alquilaron con iodoacetamida (Sigma-Aldrich) y se digirieron “in gel” con tripsina (Promega Sequencing Grade Modified trypsin), los péptidos fueron aplicados en un sistema LC-MS con una bomba de nanoflujo EASY- nLC II (Thermo Fisher Co. San Jose, Ca) acoplada a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap velos (ESI). La calibración del espectrómetro fue realizada con una disolución Calmix para permitir las determinaciones con exactitud a menos de 5 ppm (partes/millón). En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un sistema de gradiente

de 10-80% de disolvente B (agua-acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) por 120 min utilizando una columna capilar RC-C18 de ID 0.75 μm y 10 cm de largo. El flujo del sistema LC fue de nanolitros/min. Para la fragmentación de los péptidos se utilizaron los métodos de disociación inducida por colisión (CID) y de disociación por colisión de alta energía (HCD).

Los datos espectroscópicos fueron sometidos a búsqueda contra la base de datos del NCBIInr a través del programa Protein Prospector.

2.2.5 Cuantificación de proteína por el método de Peterson (1977)

El contenido de proteína en el extracto total y las fracciones solubles, G50P2 y G10P1.7.57 se cuantificó de acuerdo con Peterson (1977) o a Bradford (1970). Brevemente, en tubos de ensayo individuales se adicionaron concentraciones crecientes (1 a 100 μg) de la proteína Albúmina Sérica Bovina (Fracción V, Sigma). El volumen final en cada tubo se completó a 1000 μL con agua bidestilada. A cada uno de los tubos se les adicionó 100 μL de desoxicolato de sodio (DOC) al 0.15% y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Enseguida se les adicionó 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 72%, se agitaron en vórtex y se incubaron por 20 min en hielo. Concluida la incubación los tubos se centrifugaron a 3500 rpm por 30 min a 25 $^{\circ}\text{C}$ en una centrifuga Legend Mach 1.6 R. Al concluir la centrifugación, los tubos se recuperaron y el sobrenadante de cada uno de ellos se decantó y la pastilla se resuspendió en 1 mL de agua destilada, enseguida cada tubo se adicionó con 1 mL de una mezcla compuesta de partes iguales de CTC, H_2O , 10% de SDS y 0.8 M NaOH. La disolución de CTC se compone de (0.1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0.2% de $\text{C}_4\text{NaKH}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 10% Na_2CO_3). Los tubos se incubaron a 25 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Concluida la incubación los tubos se adicionaron con 500 μL de reactivo de Folin (dilución 1:6) y se dejaron incubando a 25 $^{\circ}\text{C}$ por 30 min. La absorbancia de las muestras se determinó a 750 nm en un espectrofotómetro Génesis 10 UV. En el caso de las muestras de concentración desconocida, se empleó un volumen de 30 μL y cada una de ellas recibió el tratamiento previamente descrito en la elaboración de la curva de referencia.

2.2.6 Electroforesis de proteínas en geles de 15% de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La preparación de las muestras para la electroforesis y para el análisis del perfil polipeptídico se realizó en un volumen final de 60 μ L. La cantidad de proteína aplicada por gel varió entre 20 y 60 μ g. Brevemente 30 μ L de la fracción G10P1.7.57 se adicionaron con 20 μ L de agua bidestilada y por último se le adicionó 10 μ L de amortiguador de Laemmli 5x (Laemmli, 1970). La mezcla se agitó, se centrifugó brevemente e incubó a 95 C por 5 min. Concluida la incubación, los tubos se colocaron en hielo por 2 min, se centrifugaron brevemente y la muestra se aplicó en el gel de 15% de poliacrilamida (SDS-PAGE), que previamente había sido polimerizado. La mezcla para la preparación de los geles contenía los elementos descritos en el cuadro 2.1 y 2.2.

2.2.7 Preparación del gel de 15% de poliacrilamida

Los geles de 15% de poliacrilamida se polimerizaron de inicio y contenían los reactivos indicados en el cuadro 2.1 (Laemmli, 1970).

Cuadro 2.1 Composición de la mezcla para el gel de 15% de poliacrilamida.

Reactivos	Cantidades (mL)
H ₂ O destilada	2.39 mL
Poliacrilamida 30% (acrilamida 29.2%, bisacrilamida 0.8%).	5 mL
1.5 M Tris HCl pH 8.8	2.47 mL
SDS 10%	0.1 mL
Persulfato de amonio 10%	0.025 mL
N,N,N',N'Tetrametiletildiamina (TEMED)	0.0125 mL

Posteriormente se prepararon los geles de apilamiento de 4% de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se dejaron polimerizar por 20 min a 25 °C. El cuadro 2.2 muestra la composición de la mezcla del gel de 4% de poliacrilamida.

Cuadro 2.2 Composición de la mezcla para la preparación del gel de 4% de poliacrilamida.

Reactivos	Cantidades (mL)
H ₂ O destilada	2.21 mL
1 M Tris HCl pH 6.8	0.78 mL
Poliacrilamida 30% (acrilamida 29.2%, bisacrilamida 0.8%).	0.8 mL
SDS 10%	0.060 mL
Persulfato de amonio 10%	0.045 mL
TEMED	0.010 mL

Los geles ya polimerizados fueron introducidos en la cámara de electroforesis (BioRad) y cargados con las muestras de interés previamente desnaturalizadas. La cámara fue llenada con el amortiguador de electroforesis (Tris 0.025 M, glicina 0.19 M, SDS 0.05%) y sometidos a electroforesis a 60 volts por 4 a 5 horas.

2.2.8 Electroforesis en geles de 13% de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La preparación de las muestras para la electroforesis y para el análisis del perfil polipeptídico en los geles de poliacrilamida de 13% se realizó tal como se describió para los geles de 15% de poliacrilamida (SDS-PAGE), excepto que la concentración de poliacrilamida en la mezcla del gel se modificó de acuerdo a lo que se muestra en el Cuadro 2.3. El gel de resolución se preparó como se indica en el cuadro 2.1. Las condiciones de electroforesis fueron las descritas para los geles SDS-PAGE de 15 % de poliacrilamida (Laemmli, 1970).

Cuadro 2.3 Composición de la mezcla para la formación del gel de 13% de poliacrilamida

Reactivos	Cantidades (mL)
H ₂ O destilada	3.11 mL
Poliacrilamida 30% (acrilamida 29.2%, bisacrilamida 0.8%).	4.33 mL
1.5 M Tris HCl pH 8.8	2.47 mL
SDS 10%	0.01 mL

Persulfato de amonio 10%	0.025 mL
TEMED	0.0125 mL

2.2.9 Electroforesis en geles de 12% de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los geles de poliacrilamida de 12% se realizaron tal como se describe para los geles de 15% de poliacrilamida (SDS-PAGE), excepto que la concentración de poliacrilamida y agua en la mezcla del gel se modificó tal como se muestra en el Cuadro 2.4. El gel de resolución se preparó como se indica en el cuadro 2.1. Las condiciones de electroforesis fueron las descritas para los geles SDS-PAGE de 15 % de poliacrilamida (Laemmli, 1970).

Cuadro 2.4 Composición de la mezcla para la formación del gel de 12% de poliacrilamida

Reactivos	Cantidades (mL)
H ₂ O destilada	3.44 mL
Poliacrilamida 30% (acrilamida 29.2%, bisacrilamida 0.8%)	4 mL
1.5 M Tris HCl pH 8.8	2.47 mL
SDS 10%	0.1 mL
Persulfato de amonio 10%	0.025 mL
TEMED	0.0125 mL

2.2.10 Tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie

Terminada la electroforesis, el gel se colocó en una solución de tinción compuesta de 0.25% de azul de Coomassie R-250 disuelto en 10% de ácido acético y 40% de metanol. En esta condición, la solución debe ser suficiente para cubrir el gel. La incubación para la tinción se realizó toda la noche en agitación constante. El desteñido del gel se realizó en una solución compuesta de 25% de metanol y 10% de ácido acético. El proceso de desteñido del gel se realizó hasta que el perfil proteico fue visible sobre un fondo claro.

2.2.11 Tinción del perfil proteico con nitrato de plata

Cuando por medio de la tinción con azul de Coomassie no se consiguió observar el perfil proteico en el gel de poliacrilamida, entonces se optó por la tinción de proteínas con nitrato de plata. Esto porqué la sensibilidad del método es superior a la de la tinción con azul de Coomassie. La tinción del gel se inició mediante la adición de una solución de fijación compuesta de 12.5 mL de metanol, 9.2 mL, de ácido acético y 15 μ L de formaldehído. El gel se incubó en agitación toda la noche. Al concluir la incubación, la solución de fijación se decantó y el gel se lavó tres veces en 30% de etanol, cada lavado fue de 20 min. Enseguida, el gel se sumergió por 1 min en una solución de pretratamiento (0.02 g de tiosulfato de sodio en 100 mL); enseguida, el gel se lavó tres veces con agua destilada, cada lavado fue de 20 segundos. Concluidos los lavados, el gel se adicionó con la solución de plata (0.06 g nitrato de plata y 22.5 μ L de formaldehído en 30 mL de agua), el gel se incubó en esta solución por 20 min, posteriormente, el gel se lavó tres veces por 20 segundos cada vez con agua destilada. Enseguida, el gel se incubó en la solución de revelado (carbonato de sodio 1.8 g, formaldehído 15 μ L, tiosulfato de sodio 600 μ L en un volumen final de 30 mL), la reacción se dejó proceder hasta que las bandas de proteína se visualizaron en un fondo translucido-amarillento (10 min). La reacción de revelado se detuvo cuando al gel se le adicionó 30 mL de una solución formada de 15 mL de metanol, 3.6 mL de ácido acético y agua destilada.

2.2.12 Inmunodetección en la fracción G10P1.7.57 y de la proteína DING presente en dicha fracción

Después de resolver por electroforesis el perfil de proteínas de la fracción G10P1.7.57, o de la proteína DING, dichos perfiles se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa por toda la noche, concluida la transferencia, las membranas se bloquearon con PBS 1x conteniendo 5% de leche descremada Svelty posteriormente, las membranas se lavaron tres veces por 15 min cada vez con PBS 1x y Tween 20 (0.025%). Enseguida, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario COM2 (1:10000) toda la noche a 4 °C. El anticuerpo primario se decantó y las membranas se lavaron 3 veces por 15 min cada vez con PBS 1x y Tween 20 (0.025%). Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario contra conejo (1:7500) por 4 horas en agitación a 4 °C. Concluida la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 3 veces con PBS 1x adicionado con Tween 20 (0.025%). La reacción de inmunodetección se reveló con amortiguador de

fosfatasa alcalina (Trizma-base 0.1 M, NaCl 0.1 M, MgCl₂ 0.1 M) adicionadas con 118 µL NBT y 76 µL BCIP.

2.2.13 Detección de glucosilación en la fracción G10P1.7.57 y en la proteína DING contenida en dicha fracción

El gel de 12% de poliacrilamida (SDS-PAGE) conteniendo el perfil de polipéptidos de la fracción G10P1.7.57 de la proteína DING electroeluida se fijó toda la noche en 50 mL de una solución compuesta de 40% metanol y 7.5% de ácido acético. La solución de incubación se decantó y el gel se adicionó con 50 mL de una mezcla de 40% metanol y 7% de ácido acético y se incubó por una hora en agitación. Posteriormente el gel se incubó por una hora en una solución de 7.5% de ácido acético. Al finalizar la incubación, el gel se adicionó con 40 mL de una solución compuesta de 1% ácido periódico y 7.5% de ácido acético y se incubó por una hora a 4 °C en oscuridad. Concluido el tiempo de incubación, la solución se decantó y al gel se le adicionó una solución de 1% de ácido periódico y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad. Finalizada la incubación, el gel se lavó seis veces (10 min en cada lavado) en 7.5% de ácido acético. La reacción positiva de glucosilación de las proteínas se observó como bandas púrpuras en un fondo de gel de color rosa (Zacharius *et al.*, 1996). El gel se fijó en 7.5% de ácido acético.

2.2.14 Desglicosilación de la fracción G10P1.7.57 y de la proteína DING

La desglicosilación de la fracción G10P1.7.57 y de la proteína DING de *Capsicum chinense* Jacq. se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor (SIGMA). Como control positivo se utilizó a la fetuina bovina, ya que esta proteína contiene N- y O-glicosilación.

La desglicosilación de la fracción G10P1.7.57 y de la proteína DING purificada se realizó en tubos Eppendorf. Brevemente, en tubos Eppendorf se colocó una alícuota (10 a 15 µg) de las muestras a desglicosilar y se aforaron hasta 30 µL, enseguida se añadieron 10 µL de amortiguador de reacción 5x y 2.5 µL de solución de desnaturalización. Las muestras se calentaron a 100 °C por 5 min.

Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, se les añadieron 2.5 µL de la solución de TRITON X-100, por último, se les adicionó 1 µL de cada una de las enzimas PNGasa F, O-glucosidasa, y A-Neuraminidasa y se incubaron por 3 horas a 37 °C. Para analizar el efecto de la desglicosilación sobre la actividad biológica de la fracción

G10P1.7.57, la fracción G10P1.7.57 desglicosilada (10 µg) fue aplicada sobre las líneas tumorales Hep-G2, SiHa, MCF-7 y PC-3 y su efecto citotóxico (IC₅₀) sobre las células tumorales fue registrado. Como control se utilizó a la línea celular Vero.

2.2.15 Inmunodetección con el anticuerpo COM2 de la proteína DING-glicosilada en la fracción G10P1.7.57

La fracción G10P1.7.57 previamente desglicosilada se cargó en un gel del 12% SDS-PAGE; enseguida, el gel se sometió a electroforesis, concluida la electroforesis, el perfil proteico fue electrotransferido a membranas de nitrocelulosa durante toda la noche a 4 °C. Enseguida, la membrana conteniendo a la proteína DING glicosilada y desglicosilada fue bloqueada con PBS 1x conteniendo 5% de leche Svelty por toda la noche a 4 °C. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces por 15 min cada vez, con PBS 1x y Tween 20 (0.025%). Enseguida, la membrana se incubó con el anticuerpo primario COM2 (1:10000) durante toda la noche a 4 °C y agitación. Concluida la incubación, el anticuerpo primario se decantó y la membrana se lavó por tres veces de 15 min cada vez con PBS 1x y Tween 20 (0.025%). La membrana se adicionó con el anticuerpo secundario contra conejo (1:7500) y se incubó por 4 horas en agitación a temperatura ambiente. Concluida la incubación, la membrana se lavó 3 veces por 15 min cada vez con PBS 1x adicionado con Tween 20 (0.025%). La reacción de inmunodetección en la membrana se reveló mediante la adición de amortiguador de fosfatasa alcalina (Trizma-base 0.1 M, NaCl 0.1 M, MgCl 0.1 M) adicionado con 118 µL NBT y 76 µL BCIP. La presencia o ausencia de glicosilación en la proteína DING fue observada como un ligero decremento en el peso molecular de la proteína desglicosilada.

2.2.16 Fosforilación de la fracción G10P1.7.57 e inmunodetección de fosfoproteínas en la fracción G10P1.7.57

La fracción G10P1.7.57 fue fosforilada en 30 µL (volumen final) de 50 mM de HEPES pH 7.5, adicionado con 10 mM de MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM de Ortovanadato de Sodio, 1 mM de β- glicerofosfato y 50 µM ATP; la reacción se colocó por 10 min a 4 °C y enseguida se incubó por 30 min a temperatura ambiente. La reacción de fosforilación se detuvo mediante la adición de 10 µL de amortiguador de Laemmli 5x. Enseguida, las muestras fosforiladas fueron aplicadas en geles de 12% SDS-PAGE y los geles sometidos a electroforesis a 60 volts; concluida la electroforesis, el perfil proteico fue electrotransferido

a membranas de nitrocelulosa por toda la noche a 4 °C. Enseguida, las membranas se bloquearon por 2.5 horas a temperatura ambiente con 5% de leche descremada Svelty disuelta en TBS 1x (10 mM de Trizma pH 7.4, 0,9% de NaCl). Concluido el bloqueo; una de las membranas fue incubada con el anticuerpo anti fosfotirosina (1:2000), otra con el anticuerpo antifosfotreonina (1:100) y la última membrana con anticuerpo antifosfoserina (1:500). Otra de las membranas se incubó con el anticuerpo primario COM2 (1:10000) en PBS 1x. Todas las membranas se incubaron 2.5 horas en agitación a temperatura ambiente. Enseguida, las membranas se lavaron 3 veces por 10 min con TBS 1x adicionado con 0.1% Tween 20, excepto la membrana que se incubó con el anticuerpo COM2, y cuyo proceso de inmunodetección se continuó realizando con amortiguador de PBS 1x. La membrana que se incubó con el anticuerpo COM2 se adicionó con el anticuerpo secundario contra conejo (1:7500) en PBS, mientras que las membranas que fueron incubadas con los anticuerpos contra los diferentes fosfoaminoácidos, se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario contra ratón (1: 10,000) diluido en TBS. Concluida la incubación con los anticuerpos secundarios, las membranas se lavaron 3 veces por 15 min cada vez con TBS 1x adicionado con Tween 20 (0.1%) (membranas incubadas con el anticuerpo secundario contra ratón), mientras que la membrana que se incubó con el anticuerpo COM2, se lavó con PBS 1x y Tween 20 (0.025%). Concluidos los lavados, la reacción de inmunodetección fue revelada por medio de la reacción de fosfatasa alcalina en un amortiguador compuesto de 0.1 M Trizma-base pH 7.5, 0.1 M NaCl, 0.1 M MgCl₂, adicionado con 118 µL NBT y 76 µL BCIP.

2.2.17 Evaluación de la citotoxicidad de la fracción G10P1.7.57 glicosilada/desglicosilada y fosforilada/desfosforilada sobre las líneas tumorales Hep-G2 (carcinoma laríngeo), SiHa (adenocarcinoma escamoso de cérvix), PC-3 (carcinoma de próstata humano) y MCF-7 (cáncer de mama)

La realización de estas pruebas, fueron en la Unidad de Investigación, Medica Yucatán, del Hospital Regional de Alta Especialidad del Instituto Mexicano del Seguro Social “Ignacio García Téllez” bajo la asesoría de la Dra. Rosa Esther Moo Puc.

Las líneas celulares utilizadas para este estudio fueron: células normales de riñón de mono verde africano (Vero; ATCC #CCL81), células de carcinoma de cérvix humano (SiHa; ATCC # HTB-35), células de adenocarcinoma de próstata metastásico (PC3; ATCC

#CRL1435), células adenocarcinoma de mama (MCF-7; ATCC #HTB22), células de carcinoma de hígado humano (Hep-G2: ATCC #HB 8065)

Las células de las diferentes líneas tumorales se mantuvieron en medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) y de manera independiente se adicionaron con 4.5 mL de medio de cultivo suplementado con 0.5 mL de suero fetal bovino. Las células se colocaron en placas de crecimiento y se incubaron por 72-96 horas a una atmósfera de presión con 95% de humedad y 5% de CO₂. Concluido el tiempo de incubación. El medio de cultivo se decantó y las células fueron adicionadas con 1 mL de triple E (Colagenasa) y se incubaron por 30 min. Una vez que las células se desagregaron se les adicionó medio de cultivo fresco y a partir de este stock celular se transfirieron 100 µl (50,000 células por mL) hacia una nueva placa y se incubaron por 24 h.

El análisis de citotoxicidad fue realizado cuando las células alcanzaron entre un 90% a 100% de confluencia celular o hasta que las células formaron una monocapa que cubría todo el espacio de crecimiento. Entonces se decantó el medio de crecimiento y a las diferentes líneas tumorales se les adicionó medio de cultivo sin SFB (suero fetal bovino) conteniendo cantidades crecientes de la fracción G10P1.7.57 o de la proteína DING (de 10 a 100 µg de proteína. Las placas se incubaron por tres días a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. La evaluación del efecto citotóxico de la fracción G10P1.7.57 o de la proteína DING se reveló en las placas de ensayo después de que las soluciones contenidas en dichas placas fueron decantadas y los remanentes de líquido removidos con gasas estériles.

Para el ensayo de antiproliferación o para determinar la inhibición del crecimiento celular, este método se realizó cuando las células alcanzaron entre un 70% a 80% de confluencia celular. Entonces se decantó el medio de crecimiento y a las diferentes líneas tumorales se les adicionó medio de cultivo con SFB (suero fetal bovino) conteniendo cantidades crecientes de la fracción G10P1.7.57 o de la proteína DING (de 10 a 100 µg de proteína. Las placas se incubaron por tres días a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. La evaluación del efecto de antiproliferación de la fracción G10P1.7.57 o de la proteína DING se reveló en las placas de ensayo después de que las soluciones contenidas en dichas placas fueron decantadas y los remanentes de líquido removidos con gasas estériles

Para la evaluación del efecto inhibitorio, después de la incubación, ambas pruebas se analizaron por el ensayo de la sulforodamina B (SRB) y la inhibición del crecimiento se determinó mediante análisis colorimétrico, dado que estima indirectamente el número de células tiñendo la proteína celular total con el colorante SRB, enseguida, a la placa se le adicionó 100 μ L de 10% de ácido tricloroacético (TCA), las placas se dejaron reposar 20-30 min a 4 °C, se les retiró el TCA y los pocillos fueron adicionados con 50 μ L de 0.1% de sulforodamina (SRB); las placas se incubaron por 30 min a temperatura ambiente y enseguida se le retiró la SRB, los pocillos de la placas se lavaron con 100 μ L de ácido acético al 1% durante 30 min. Finalmente, los pocillos se adicionaron con 100 μ L de 10 mM Trizma base pH 7.2 y su absorbancia se determinó a 560 nm (Rahman *et al.* 2001).

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS

3.1 Obtención de la proteína soluble, la fracción G10P1.7.57 y la proteína DING de *Capsicum chinense* Jacq. (chile habanero)

La proteína soluble de las semillas de *Capsicum chinense* Jacq. se obtuvo después de centrifugar la proteína total a $100,000 \times g$. La proteína soluble se fraccionó por cromatografía en dos columnas de cristal, la primera rellena de resina Sephadex G-50. Esta separación resultó en la resolución de dos máximos de absorbancia, el primero comprendido entre las fracciones 18 a 26 (G50P1) y el segundo entre las fracciones 40 a 54 (G50P2). La proteína de interés en este estudio eluyó en el pico 2. El perfil cromatográfico resuelto en la columna empacada con Sephadex G-50 se muestra en la Figura 3.1.

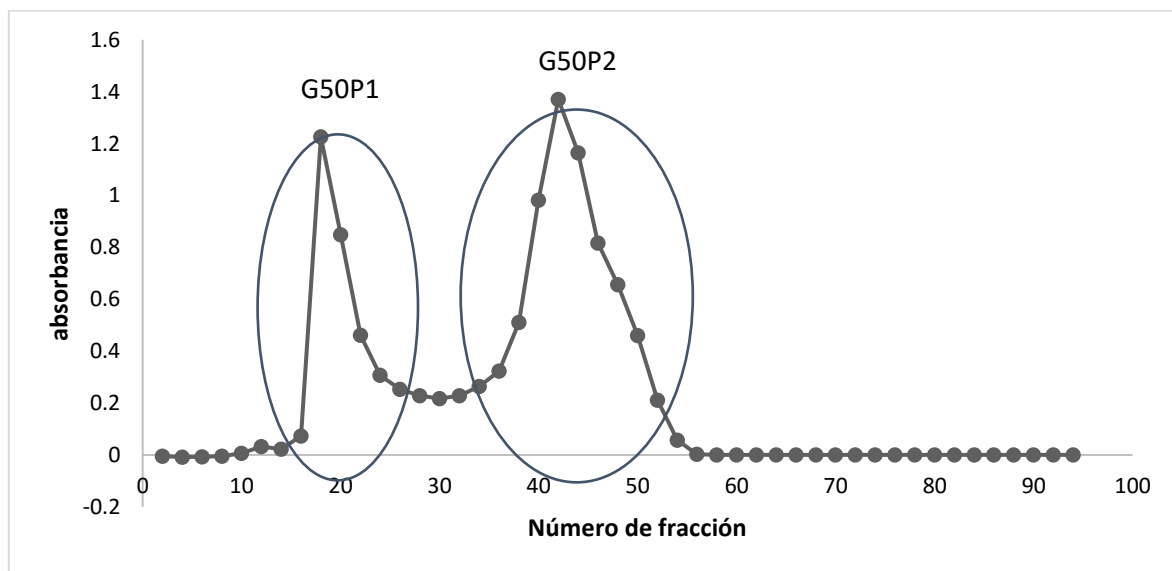


Figura 3.1 Cromatograma de la proteína soluble después de ser fraccionada en una columna de cristal rellena con resina Sephadex G-50. La elución de las proteínas produjo dos máximos de absorbancia a 280 nm y fueron denominados G50P1 y G50P2. En el eje de las Y se muestra la absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones que fueron colectadas durante el proceso de cromatografía.

Las fracciones correspondientes al pico G50P2 fueron mezcladas y liofilizadas. La resuspensión del liofilizado de G50P2 fue entonces refraccionada en una segunda columna de cromatografía empacada con la resina Sephadex G-10. El fraccionamiento resultó en dos máximos de absorbancia denominados G10P1.7.57 y G10P2 (Figura 3.2). Se colectaron las fracciones correspondientes a la fracción G10P1.7.57 comprendido entre la fracción 16 a 25 dado que se conoce que en dicho pico eluyó la proteína de nuestro interés. Estudios anteriores nos demostrarán por medio de inmunodetección con el anticuerpo COM2 que en el pico de interés (G10P1.7.57) eluyó la proteína DING. (datos no mostrados, (Brito-Argáez *et al.*, datos no publicados).

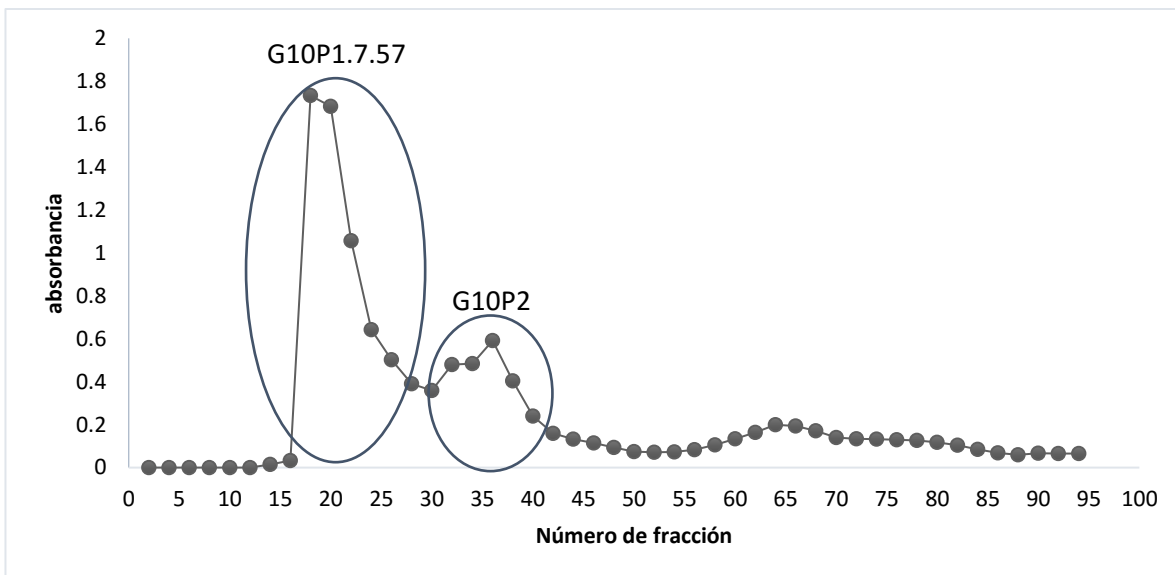


Figura 3.2 . Cromatograma de la fracción G50P2 en columna de cristal, empacada con resina Sephadex G-10. El cromatograma resultante después de leer las muestras a 280 nm mostró dos máximos de absorbancia denominados G10P1.7.57 y G10P2

Las muestras que comprendieron al pico 1 fueron mezcladas y liofilizadas y posteriormente resuspendidas, esto produjo la fracción denominada G10P1.7.57 la cual fue denominada de esta manera dado que se conoce que contiene al péptido de 7.57 kDa, un producto de proteólisis de la proteína DING de ~ 39 kDa.

El siguiente paso en la purificación de la proteína DING a partir de la fracción G10P1.7.57 fue la separación por electroforesis en geles de 15% SDS-PAGE de los diferentes polipéptidos que constituyen a la fracción G10P1.7.57 (datos no publicados).

Dado que en el grupo de investigación se cuenta con el anticuerpo COM2, el cual fue producido de manera comercial contra el péptido ITYMSPDYAAPTLAGLDDTK de la

proteína DING de *Capsicum chinense* Jacq. (Uc-Ku, 2014), entonces dicho anticuerpo se utilizó para inmunodetectar por Western blot a la proteína DING en la fracción G10P1.7.57.

La proteína de ~ 39 kDa fue purificada por electroelución a partir de la fracción G10P1.7.57. El electroeluito fue sometido nuevamente a electroforesis en gel de poliacrilamida o inmunodetectado por western blot con el anticuerpo COM2 (Fig 3.3). La tinción del gel de poliacrilamida con azul de Coomassie mostró la presencia del polipéptido de interés (~39 kDa); el Western blot con el anticuerpo COM2 confirmó que la banda electroeluida corresponde a la proteína DING de *Capsicum chinense* Jacq.

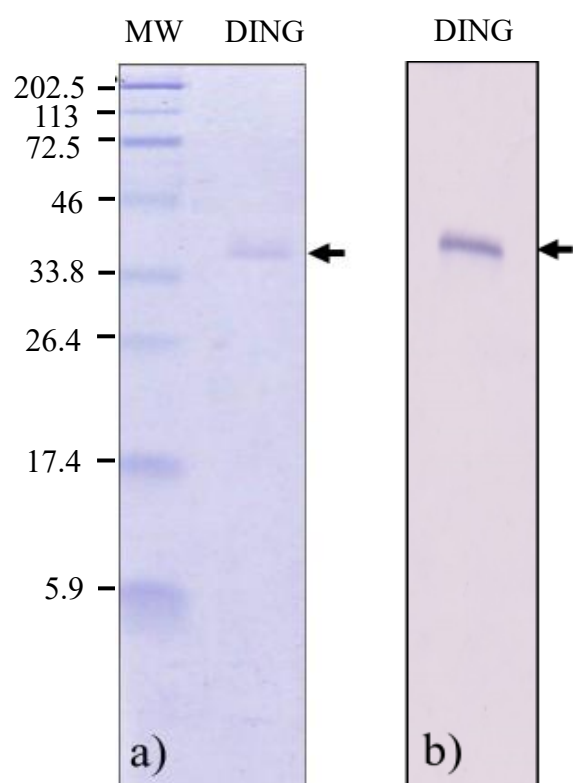


Figura 3.3 Análisis de la pureza de la proteína electroeluida después de ser teñida con azul de Coomassie o inmunodetectada por Western blot con el anticuerpo COM2. El SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (A) o el Western blot (B) muestran un solo polipéptido de ~ 39 kDa.

La banda de proteína de ~ 39 kDa se envió a secuenciar y los péptidos resultantes de la secuenciación por medio de programas bioinformáticos fueron comparados con los de la base de datos del NCBI; el resultado mostró que dichos péptidos mostraban homología con proteínas DING (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1 Secuencia de péptidos de la proteína purificada por medio de la electroelución.

Masa (Da)	SECUENCIA
1019.60	TGNIVVYR (DING)
1324.64	NEASGTTELFTR (DING)
1359.74	ITTWNQLPATGR (DING)
1400.72	TSTELSTYASTK (GLP/DING)
1560.82	TSNFVTATSALSLGK (fosfatasa alcalina)
1750.96	FGASALNSNDNAIK (fosfatasa alcalina)
1774.86	LAFLNNDYSQFGTGK (DING)
1783.04	QVPSVATSVAIPFNK (DING)
2066.02	AVDLSVDQLcGVFSGR (DING)
2229.06	ITYMSPDYAAPTLAGLDDTK (DING)

3.2 Glicosilación de la fracción G10P1.7.57

El análisis de glicosilación de la fracción G50P1.7.57 mediante el reactivo de Schiff-ácido periódico produjo una señal tenue en el carril donde se aplicaron 20 µg de la fracción G10P1.7.57, dicha señal se incrementó conforme la cantidad de proteína aumentó a 40 y 60 µg (Figura 3.4, carriles 40 y 60). En el control positivo para glicosilación cargado con 40 µg de IgG humana, se observó señal de varios polipéptidos. En contraste, en la línea correspondiente al control negativo (40 µg de BSA fracción V de alta pureza) no se detectó señal de glicosilación (Figura 3.4).

Con el objetivo de determinar si la proteína glicosilada en la fracción G10P1.7.57 corresponde a la proteína DING, se realizó un Western blot con el anticuerpo COM2 el cual reconoce a la proteína DING de *Capsicum chinense* (Uc Ku, 2014), la inmunodetección mostró una señal de intensidad creciente en los sitios adicionados con cantidades de 1, 2.5 y 5 µg de la fracción G10P1.7.57 (Figura 3.5). En lo que respecta a la IgG humana y al BSA, también mostraron una ligera señal, aunque esta señal podría estar más relacionada con

pegado inespecífico del anticuerpo secundario dado que en esos carriles se aplicaron 40 μg de proteína.

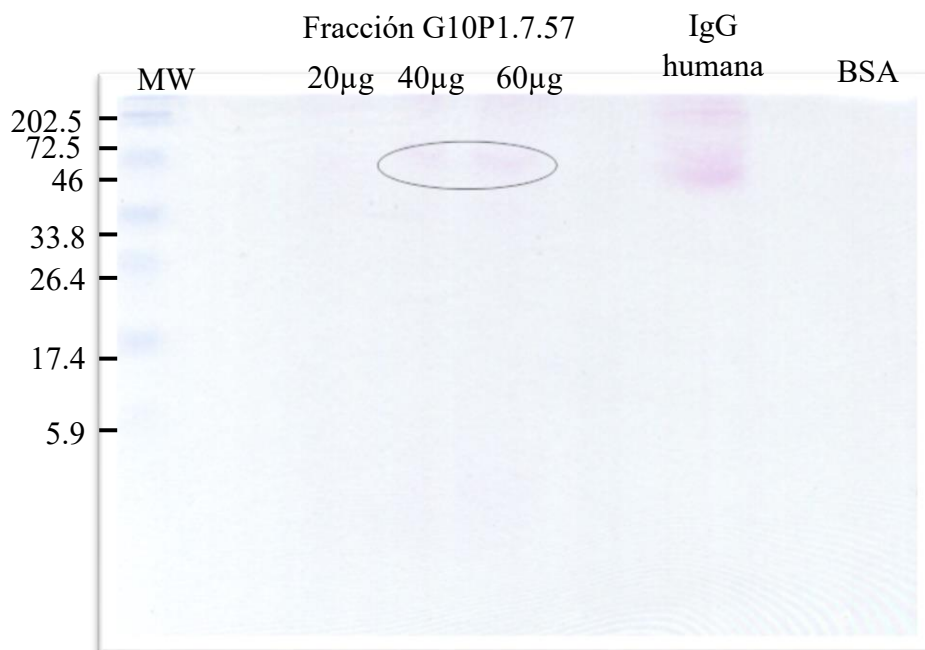


Figura 3.4 . Determinación de glicosilación de proteínas en gel de poliacrilamida de 13% (SDS-PAGE) teñido con reactivo de Schiff-ácido periódico. Diferentes cantidades de la fracción G10P1.7.57 o 40 μg de IgG humana o de BSA fueron teñidos para glicosilación con el reactivo de Schiff-ácido periódico. MW= marcador de peso molecular para proteínas. El círculo indica la posición de la proteína DING con señal positiva para glicosilación.

El hecho de que el anticuerpo anti-DING reconozca a la proteína de ~ 39 kDa en las muestras de G10P1.7.57 (Figura 3.5 a), y que dicha señal correlacione con la posición de la señal de glicosilación en la fracción G10P1.7.57 (Figura 3.4), apoya el hecho de que la proteína DING de *Capsicum chinense* Jacq. es una proteína glicosilada. La tinción con azul de Coomassie de un gel de poliacrilamida desarrollado en paralelo al inmunoblot, reveló el perfil de proteínas que se electrotransfirieron a la membrana de nitrocelulosa (Figura 3.5 b).

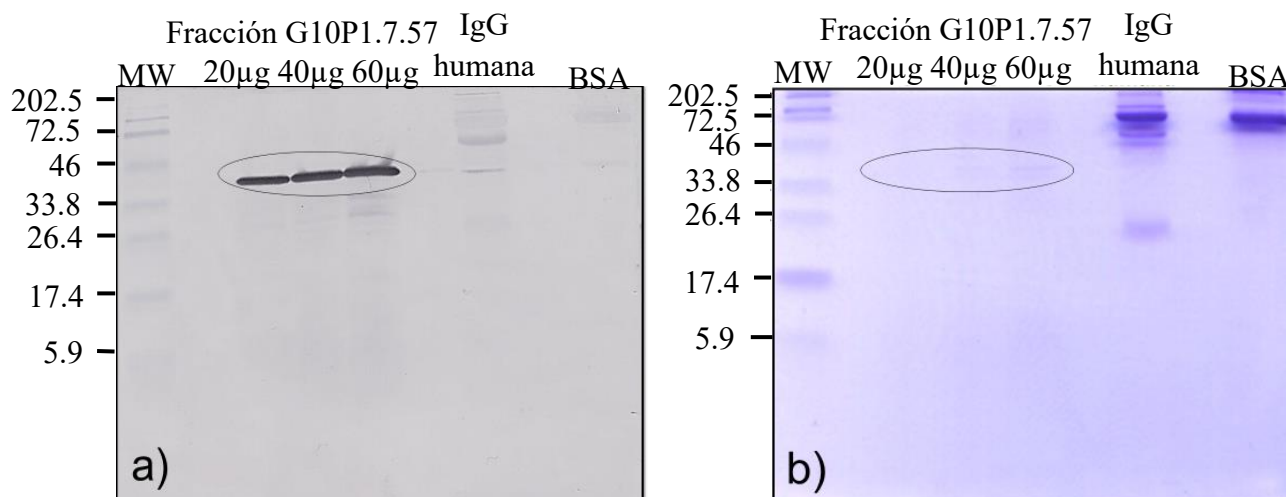


Figura 3.5 Inmudetección por Western blot de la proteína DING presente en la fracción G10P1.7.57 (a) y perfil de proteínas de la fracción G10P1.7.57 en geles de 13% de poliacrilamida (b)

3.3. Evaluación de la citotoxicidad y efecto antiproliferativo de la fracción G10P1.7.57 sobre las líneas de células tumorales Hep-G2, SiHa, PC-3, MCF-7 y línea normal Vero

La evaluación de la citotoxicidad de la fracción G10P1.7.57, sobre las líneas tumorales Hep-G2, SiHa, PC-3, MCF-7 y Vero mostró que la fracción G10P1.7.57 inhibió el crecimiento de las diferentes líneas tumorales con diferente eficiencia dado que en las líneas tumorales Hep-G2 y SiHa inhibió el crecimiento con 48.9 y 25.19 µg, respectivamente (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Concentración citotóxica de la fracción G10P1.7.57 (µg/mL) evaluada en las líneas celulares Vero, Hep-G2, PC-3, SiHa y MCF-7

Fracción	Líneas celulares CC_{50} (µg/mL) ± DE (IS)				
	Vero	Hep-G2	PC-3	SiHa	MCF-7
Fracción G10P1.7.57	32.19± 0.11	48.99± 0.26(0.65))	43.35± 0.67(0.74)	25.84± 0.14(1.24)	35.7±1.68(0.9)

CC_{50} = Concentración citotóxica en µg/mL; DE = desviación estándar; IS = Índice de selectividad

Mientras la actividad antiproliferativa se observó con 56.48 y 28.6 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Como control se incluyó a la línea celular Vero, derivada de mono verde y que aún muestra regulación de la división celular dado que aún inhibe su crecimiento por contacto con las células vecinas. Dicha línea celular mostró efecto citotóxico con la adición de 32.19 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción G10P1.7.57 mientras que la actividad antiproliferativa se alcanzó con 40.53 $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3 Concentración antiproliferativa de la fracción G10P1.7.57 ($\mu\text{g/mL}$) evaluada en las líneas celulares Vero, Hep-G2, PC-3, SiHa y MCF-7

Fracción	Líneas celulares CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE (IS)				
	Vero	Hep-G2	PC-3	SiHa	MCF-7
Fracción G10P1.7.57	40.53 \pm 0.26	54.68 \pm 0.34(0.74)	25.19 \pm 0.005(1.6)	28.6 \pm 25.19(1.41)	26.74 \pm 1.5(1.51)

CI_{50} = Concentración citotóxica en $\mu\text{g/mL}$; DE = desviación estándar; IS = Índice de selectividad

Al analizar los índices de inhibición de las líneas tumorales (IS) se detectó que si bien la fracción G10P1.7.57 inhibe de manera adecuada a las líneas tumorales, no se puede asumir que dicha fracción es idónea para aplicar tratamientos en individuos debido a que la selectividad resultó con valores menores a 1%, mientras que los valores recomendados deben tener valores de CI mayores o iguales a 10.

Los resultados obtenidos nos demostraron que las mejores IC_{50} en las evaluaciones citotóxicas y antiproliferativas se obtuvieron en las líneas tumorales de SiHa y MCF-7, por lo que dado el interés de saber si a la proteína DING se le podría atribuir el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la línea tumoral, se decidió continuar los estudios sobre la línea tumoral de cáncer de mama (MCF-7), dado que este tipo de cáncer es de las principales causas de muerte en México y en el mundo.

3.4 Evaluación de citotoxicidad y efecto antiproliferativo de la fracción G10P1.7.57 desglicosilada y fosforilada sobre la línea de células tumorales MCF-7 y la línea normal Vero

La evaluación del efecto de la fosforilación de la fracción G10P1.7.57 sobre su citotoxicidad al 50% (CC_{50}) en la línea celular MCF-7 se observó con 44.53 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción G10P1.7.57 fosforilada; en contraste la fracción desfosforilada, alcanzó su CC_{50} con 32.19 $\mu\text{g/mL}$ en la misma línea celular. Para la línea celular Vero se necesitaron concentraciones mayores a 100 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción G10P1.7.57 fosforilada para alcanzar la CC_{50} (Cuadro 3.4) con respecto a los 32.19 μg de la fracción desfosforilada.

Cuadro 3.4 Actividad citotóxica CC_{50} para cada fracción G10P1.7.57 ($\mu\text{g/mL}$) y la fracción G10P1.7.57 fosforilada en la línea celular MCF-7

Fracción	Líneas celulares CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE (IS)	
	Vero	MCF-7
Fracción G10.P1.7.5 fosforilada	>100	44.53 \pm 1.62 (2.24)
Fracción G10P1.7.57	32.19 \pm 0.11	35.73 \pm 1.68(0.9)

CC_{50} = Concentración citotóxica en $\mu\text{g/mL}$; DE = desviación estándar; IS = Índice de selectividad

Mientras la fracción G10P1.7.57 desglicosilada inhibió el crecimiento de la línea tumoral con 17.20 $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro 3.5). Para la línea celular Vero se necesitaron concentraciones mayores a 100 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción G10P1.7.57 desglicosilada para alcanzar la CC_{50} ; en contraste, con la fracción G10P1.7.57 glicosilada se necesitaron 35.73 $\mu\text{g/mL}$ y 32.19 $\mu\text{g/mL}$ para alcanzar las CC_{50} en las líneas celulares MCF-7 y Vero, respectivamente.

Cuadro 3.5 Actividad citotóxica CC_{50} para cada fracción G10P1.7.57 ($\mu\text{g/mL}$) glicosilada y desglicosilada evaluada en la línea celular MCF-7

Fracción	Líneas celulares CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE (IS)	
	Vero	MCF-7
Fracción G10P1.7.5 glicosilada	32.19 \pm 0.11	35.73 \pm 1.68 (0.9)
Fracción G10P1.7.5 desglicosilada	>100	17.20 \pm 1.68 (5.8)

CC_{50} = Concentración citotóxica en $\mu\text{g/mL}$; DE = desviación estándar; IS = Índice de selectividad

La actividad antiproliferativa (CI_{50}) de la fracción G10P1.7.57 fosforilada sobre la línea celular MCF-7 se determinó con 40.44 $\mu\text{g/mL}$, con respecto a la línea celular Vero, que se consiguió con 72.18 $\mu\text{g/mL}$, de igual manera, con la misma fracción G10P1.7.57 desfosforilada la actividad antiproliferativa se obtuvo con 26.74 $\mu\text{g/mL}$ para la línea celular MCF-7 y con 40.53 μg para la línea celular Vero (Cuadro 3.6).

Cuadro 3.6 Actividad antiproliferativa de la fracción G10P1.7.57 ($\mu\text{g/mL}$) fosforilada y la fracción G10P1.7.57 sobre la línea celular MCF-7

Fracción	Líneas celulares CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE (IS)	
	Vero	MCF-7
Fracción G10P1.7.5 fosforilada	72.18 \pm 1.69	40.44 \pm 1.58 (1.78)
Fracción G10P1.7.57	40.53 \pm 0.26	26.74 \pm 1.5(1.5)

CI_{50} = Concentración citotóxica en $\mu\text{g/mL}$; DE = desviación estándar; IS = Índice de selectividad

En contraste, la fracción G10P1.7.57 desglicosilada inhibió el crecimiento de la línea tumoral con 9.67 $\mu\text{g/mL}$ de proteína (Cuadro 3.7). La adición de 22.48 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción G10P1.7.57 desglicosilada en la línea celular Vero inhibió en un 50% el crecimiento (CI_{50}); en contraste, la fracción G10P1.7.57 glicosilada inhibió el crecimiento en un 50% con 26.78 $\mu\text{g/mL}$ de proteína (Cuadro 3.7).

Cuadro 3.7 Actividad antiproliferativa de la fracción G10P1.7.57 ($\mu\text{g/mL}$) glicosilada y desglicosilada evaluada en la línea celular MCF-7

Fracción	líneas celulares CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE (IS)	
	Vero	MCF-7
Fracción G10P1.7.5 glicosilada	40.53 \pm 0.26	26.74 (1.5)
Fracción G10P1.7.5 desglicosilada	22.48 \pm 1.58	9.67 \pm 1.94 (2.3)

CI_{50} = Concentración citotóxica en $\mu\text{g/mL}$; DE = desviación estándar; IS = Índice de selectividad

3.5 Evaluación de la citotoxicidad y efecto antiproliferativo de la proteína DING sobre la línea tumoral MCF-7 y Vero

La evaluación de la citotoxicidad de la proteína DING purificada sobre la línea tumoral MCF-7 mostró que 1.29 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína purificada inhibió el crecimiento de la línea tumoral MCF-7 en un 50%. En contraste, dicho efecto (CC_{50}) en la línea Vero (línea celular no tumorígena) se obtuvo con 4.79 $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro 3.8). La comparación con el docetaxel (control positivo de citotoxicidad), un fármaco aprobado para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer mostró que este compuesto indujo la CC_{50} en la línea MCF-7 a 0.001 $\mu\text{g/mL}$ y a 1.1 $\mu\text{g/mL}$ en la línea Vero (Cuadro 3.8).

Cuadro 3.8 Actividad citotóxica de la proteína DING aislada de semillas de *Capsicum chinense*. El fármaco docetaxel se utilizó como control positivo

Compuesto	Línea celular CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE (IS)	
	Vero	MCF-7
Proteína DING	4.79 \pm 0.82	1.29 \pm 0.46 (3.71)
Docetaxel	1.1	0.001 (11)

CC_{50} = Concentración citotóxica en $\mu\text{g/mL}$; DE = desviación estándar; IS = Índice de selectividad

La actividad antiproliferativa de la proteína DING purificada sobre las células MCF-7 se consiguió con 2.79 μg de proteína (Cuadro 3.8), mientras que en la línea celular Vero, el efecto antiproliferativo se obtuvo con 2.95 $\mu\text{g/mL}$ de proteína (Cuadro 3.9).

Cuadro 3.9 Actividad antiproliferativa de la proteína DING purificada a partir de la fracción G10P1.7.57 sobre la línea celular MCF-7

Compuesto	Línea celular CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE (IS)*	
	Vero	MCF-7
Proteína DING	2.95 \pm 0.45	2.79 \pm 0.38 (1.05)
Docetaxel	0.1	0.001 (11)

CI_{50} = Concentración citotóxica en $\mu\text{g/mL}$; DE = desviación estándar; IS = Índice de selectividad

Al analizar el índice de actividad de las líneas tumorales (CC/CI) (Cuadro 3.10) se encontró que la proteína DING pura aumentó su índice de actividad a valores de 3.53, con respecto a los valores observados cuando se aplicó la fracción G10P1.7.57.

Cuadro 3.10 Índice de actividad de la Proteína DING aislada de semillas de *Capsicum chinense* Jacq. sobre la línea celular MCF-7

Compuesto	Línea celular MCF-7
Proteína DING	3.53

3.6 Rendimiento del proceso de purificación de la proteína DING

El rendimiento de proteína durante el proceso de purificación de la proteína DING a partir de la proteína total de semillas de *Capsicum chinense* Jacq (Cuadro 3.11), mostró que en 60 mL de extracto total de semilla se obtuvieron 133.8 mg de proteína total. El fraccionamiento de este volumen mediante ultracentrifugación permitió recuperar 40 mL de extracto soluble conteniendo 61.36 mg/mL de proteína con un rendimiento del 45.85%. Esa fracción proteica fue fraccionada por cromatografía en una columna rellena de Sephadex G50, a partir de la misma se recuperaron 16.2 mL, conteniendo 8.72 mg de proteína, cantidad que representa un rendimiento de 6.51%. La recromatografía de esa fracción en una columna empacada con resina Sephadex G10 permitió recuperar 5.4 mL con 1.64 mg

de proteína para un rendimiento de 1.22%. Por último, la separación por electroforesis de los polipéptidos de la fracción G10P1.7.57 en geles de 15% SDS-PAGE permitió seleccionar un polipéptido de ~ 39 kDa, el cual fue escindido del gel y electroeluido. Después del proceso de electroelución se recuperó 1 mL de electroeluto, conteniendo 0.16 mg de proteína para un rendimiento final de proteína de 0.12% (Cuadro 3.11).

Cuadro 3.11 Tabla de rendimiento de los diferentes procesos de purificación para la obtención de la proteína DING

Fracciones	Volumen (mL)	Concentración de proteína (mg/μL)	Proteína total (mg)	Rendimiento (%)
Extracto total	60	2.23	133.8	100
Extracto soluble	40	1.53	61.36	45.85
Fracción G50	16.2	0.53	8.72	6.51
Fracción G10	5.4	0.30	1.64	1.22
Proteína DING	1	0.16	0.16	0.12

3.7 Fosforilación de la fracción G10P1.7.57 y la proteína DING

Después de la reacción de fosforilación de la fracción proteica G10P1.7.57, los productos resultantes de la fosforilación se sometieron a electroforesis en geles de 12% de poliacrilamida (Figura 3.7a) o el perfil de proteínas se electrotransfirió a membranas de nitrocelulosa para ser inmunodetectado con el anticuerpo COM2 (Figura 3.6b) o incubado con el anticuerpo secundario contra conejo (Figura 3.6c). La tinción de los geles con azul de Coomassie no mostró diferencias significativas en el tamaño de los polipéptidos contenidos en la fracción G10P1.7.57 desfosforilada o fosforilada (Figura 3.6a). La inmunodetección con el anticuerpo COM2 reveló la presencia de un polipéptido de ~ 39 kDa tanto en la fracción G10P1.7.57 fosforilada como desfosforilada (Figura 3.6b) y también se observó un ligero retraso en la migración del polipéptido de ~ 39 kDa fosforilado con

respecto al polipéptido sin fosforilar. La incubación de una membrana que contenía un perfil idéntico de proteínas con el anticuerpo secundario no produjo ninguna señal de detección (Figura 3.6c).

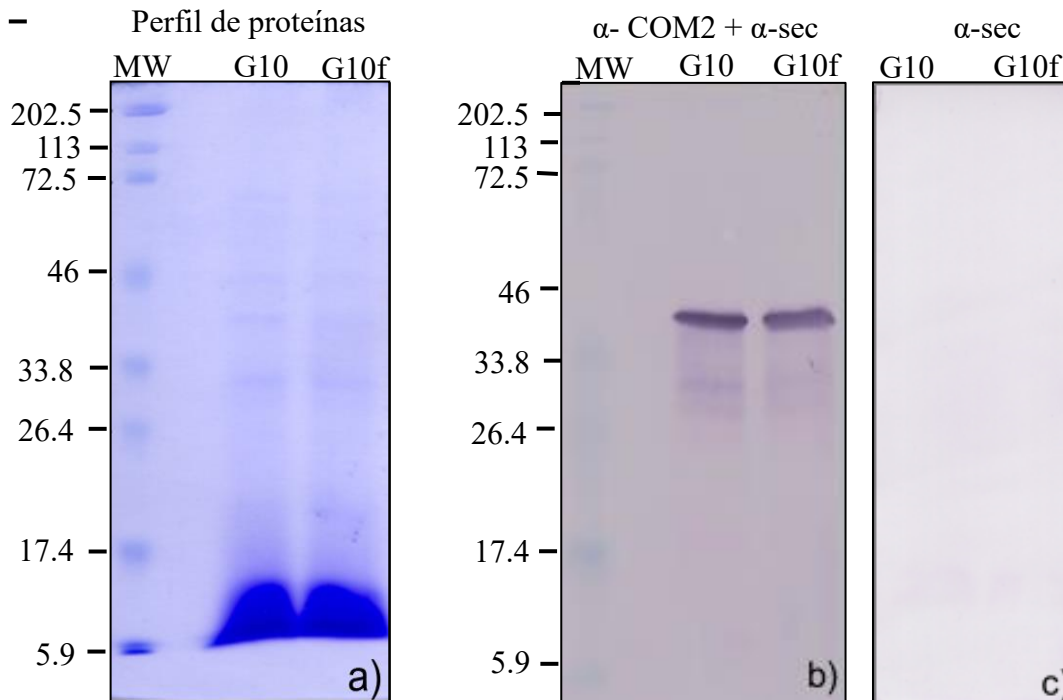


Figura 3. 6 Perfil de las proteínas de la fracción G10P1.7.57 fosforiladas y sin fosforilar mediante SDS-PAGE en geles al 12% de poliacrilamida e inmunodetección con el anticuerpo COM2 o con el anticuerpo secundario contra IgG de conejo. Tinción del gel de poliacrilamida con azul de Coomassie (a) o inmunodetección con el anticuerpo anti DING (b) o con el anticuerpo secundario contra IgG de conejo (c), utilizando 12 μ g de fracción proteica por carril.

Por otra parte, la inmunodetección de la fracción G10P1.7.57 fosforilada y sin fosforilar con anticuerpos contra fosfotirosina (Figura 3.7a), contra fosfoserina (Figura 3.7b) o contra fosfotreonina (Figura 3.7c), mostró que en ambas fracciones (fosforilada o sin fosforilar), el anticuerpo contra fosfotirosina detectó proteínas fosforiladas de bajo peso molecular (Figura 3.7a); un resultado similar se observó con el anticuerpo contra fosfoserina (Figura 3.7b), aunque de manera adicional el anticuerpo contra fosfoserina también reconoció al polipéptido de ~ 39 kDa en ambas fracciones, fosforilada y sin fosforilar (Figura 3.7b). En contraste, el anticuerpo contra fosfotreonina no reaccionó con ninguna proteína (Figura 3.7c). Este resultado sugiere que la fracción G10P1.7,57 presenta fosforilación en residuos de tirosina y de serina.

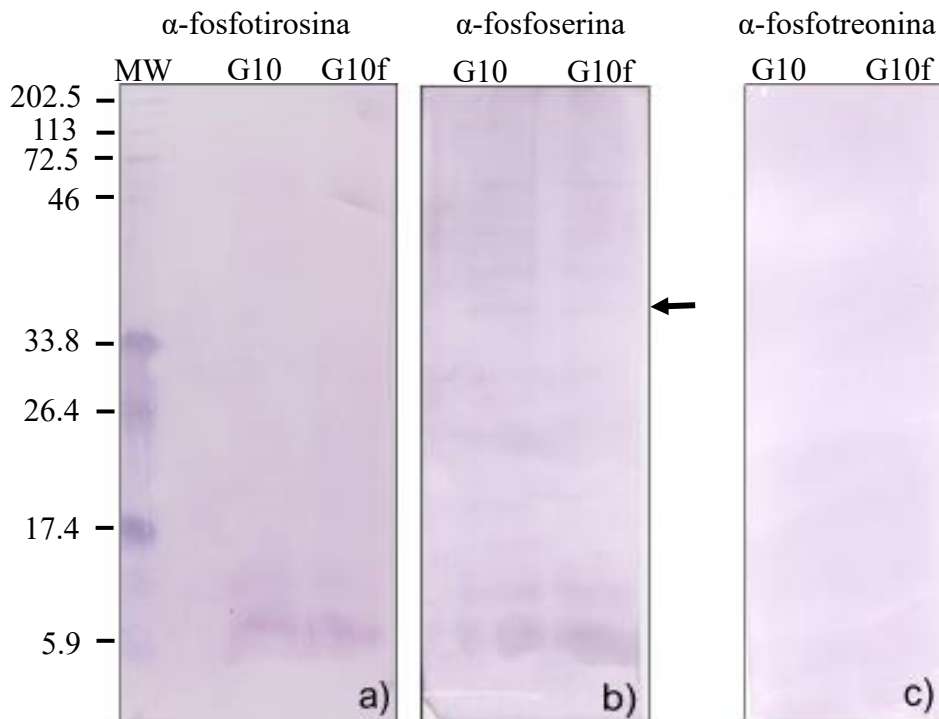


Figura 3.7 Inmunodetección con el anticuerpo anti-fosfotirosina (a) inmunodetección con el anticuerpo anti-fosfoserina (b) y anti-fosfotreonina(c). utilizando 12 μ g de fracción proteica por carril.

3.8 Desglicosilación de la fracción G10P1.7.57 y la proteína DING

Experimentos previos de este trabajo mostraron que algunas de las proteínas presentes en la fracción G10P1.7.57 y la proteína DING de *Capsicum chinense* Jacq. están glicosiladas, lo cual va de acuerdo con la tinción de carbohidratos con el reactivo de Schiff-ácido periódico (Figura 3.4). Entonces, con el objetivo de confirmar tal resultado se utilizó un paquete comercial Enzymatic Protein Deglycosylation Kit para desglicosilar a la fracción G10P1.7.57. Una vez desglicosilada, la fracción G10P1.7.57 se sometió a electroforesis en un gel de 12% SDS-PAGE y se tiñó con nitrato de plata (Figura 3.8a) o se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa y se inmunodetectó con el anticuerpo anti DING (Figura 3.8b). La tinción con nitrato de plata mostró que el polipéptido de ~ 39 kDa de la fracción G10P1.7.57 desglicosilada tuvo una migración ligeramente mayor (Figura 3.8a, línea G10d), con respecto al polipéptido de ~ 39 kDa contenido en la fracción G10P1.7.57 sin desglicosilar (Figura 3.8, línea G10). La desglicosilación de la fetuina resultó en dos bandas de polipéptidos con pesos moleculares parecidos a los de la fracción G10P1.7.57

desglucosilada (Figura 3.8a, línea fetuinad). El Western blot, con el anticuerpo contra la proteína DING confirmó que el polipéptido de ~ 39 kDa contenido en la fracción G10P1.7.57 desglucosilada migra más con respecto al polipéptido de ~ 39 kDa de la fracción G10P1.7.57 glicosilada (Figura 3.8, líneas G10d y G10, respectivamente). La fetuina utilizada como control positivo de glucosilación no fue reconocida en su estado glucosilado (Figura 3.8b, línea fetuina). Sin embargo, al ser desglucosilada, la fetuina mostró una señal intensa (Figura 3.8b, línea fetuinad).

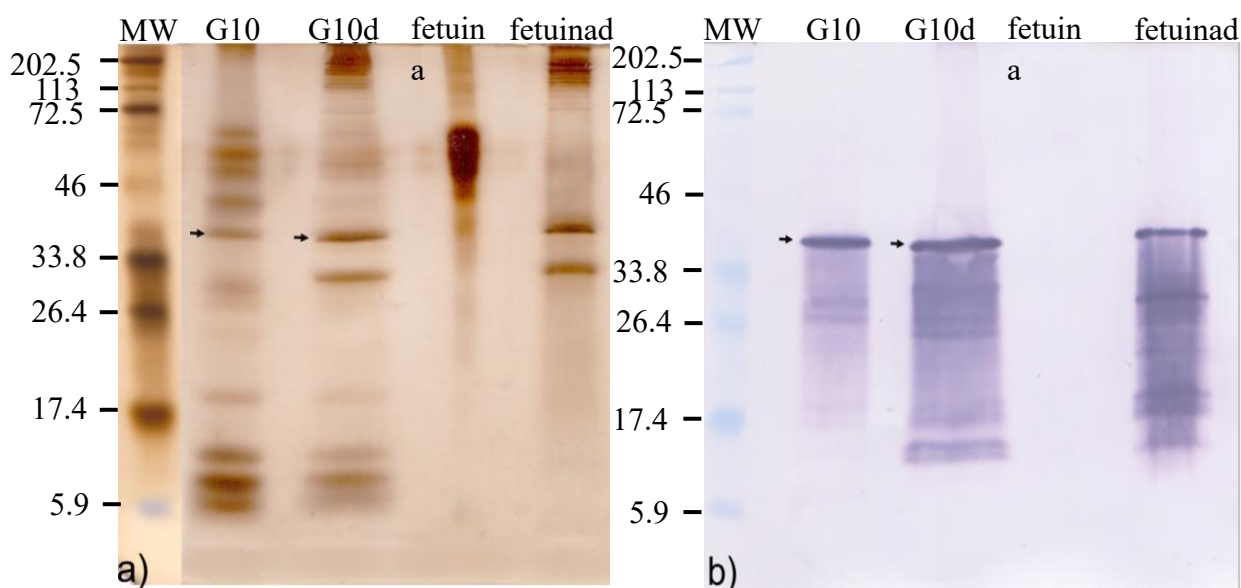


Figura 3. 8 Perfil de proteínas de la fracción G10P1.7.57 glicosilada y desglucosilada e inmunodetección con el anticuerpo COM2. Tinción con nitrato de plata del perfil de proteínas de la fracción G10P1.7.57 glicosilada y desglucosilada (a) y Western blot con el anticuerpo COM2 (b). La fetuina fue incluida como control positivo de glucosilación. El gel se cargó con 15 µg de proteína.

Un experimento posterior incubando la fetuina desglucosilada con el anticuerpo secundario contra conejo resultó en una detección intensa del polipéptido de un peso molecular de 40 kDa. Ese resultado sugiere que la señal detectada en la fetuina desglucosilada es producto de la unión inespecífica del anticuerpo secundario con dicha proteína (Figura 3.9a). En la figura 3.9b se puede observar diferencia en el perfil proteico, en el carril de la fetuina se puede observar una proteína en abundancia que oscila entre los 50 a 70 kDa y concuerda con el peso característico de la fetuina, en el carril aledaño, se observa que la fetuina es desglucosilada, ya que se puede observar un perfil diferente al de la fetuina.

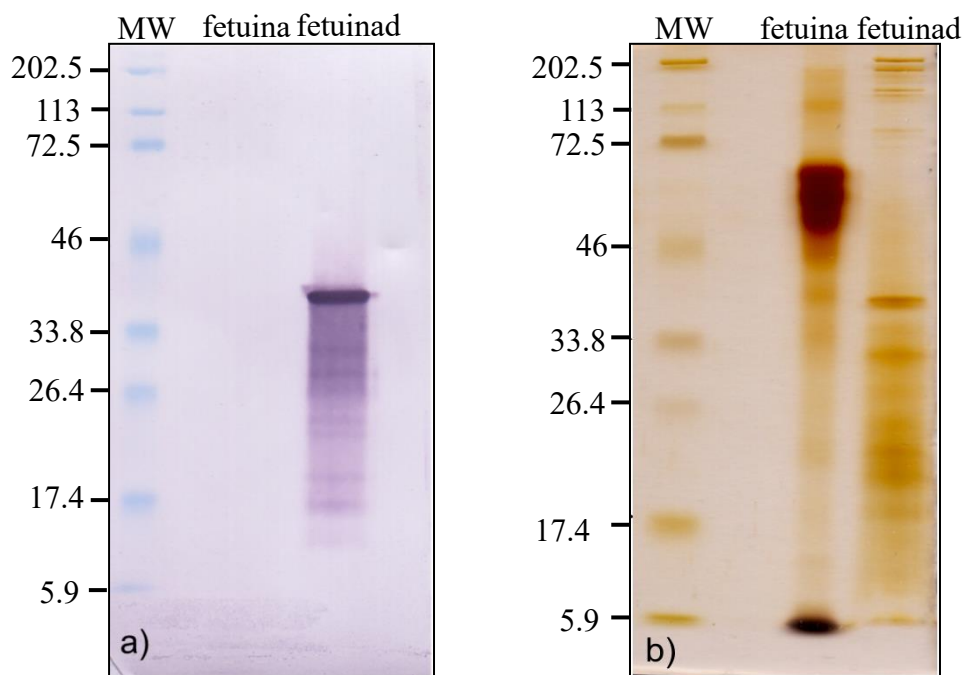


Figura 3. 9 inmunodetección de la fetuina glicosilada y desglicosilada (a) con el anticuerpo secundario contra conejo. (b) perfil proteico de la fetuina y fetuinad desglicosilada, utilizando 12 μ g de fracción proteica por carril

CAPÍTULO IV

Conclusiones generales

Se ha descrito que las proteínas DING en las diferentes especies tienen un peso molecular característico de entre ~ 38 y ~ 40 kDa. Las proteínas DING han sido identificadas en organismos pertenecientes a todos los reinos de la vida (Berna *et al.*, 2009; Bernier, 2014). En este trabajo se determinó que la proteína DING purificada por electroelución a partir de la fracción G10P1.7.57 tiene un peso molecular de ~ 39 kDa; lo cual concuerda con los resultados hasta ahora descritos en la literatura.

Dado el interés en el grupo de trabajo por determinar la presencia de la proteína DING en extractos proteicos de semillas de *Capsicum chinense* Jacq., y de que a partir de la secuencia de aminoácidos determinada experimentalmente a partir de un polipéptido de 7.57 kDa, se observó que éste tenía homología con las proteínas DING. El péptido ITYMSPDYAAPTLAAGLDDTK, se sintetizó y de manera comercial se produjo e inmunopurificó un anticuerpo policlonal denominado COM2. Dicho anticuerpo reconoce a la proteína DING de *Capsicum chinense* Jacq (Uc-Ku, 2013).

Después de determinar que el anticuerpo COM2 reconoce de manera específica al polipéptido de ~ 39 kDa en las semillas de *Capsicum chinense* Jacq, dicho polipéptido se purificó por electroelución a partir de la fracción G10P1.7.57 y se secuenció otra vez. La comparación de los péptidos resultantes en la base de datos del NCBI confirmó que el polipéptido de ~ 39 kDa es una proteína DING (Tabla 3.1). El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína de ~ 39 kDa de *Capsicum chinense* Jacq. con la hasta ahora única secuencia completa de una proteína DING reportada en plantas, perteneciente a la proteína DING p38sj de *Hypericum perforatum*, demostró una alta homología entre ambas.

Las proteínas DING son de interés para nuestro grupo de trabajo ya que en estudios realizados en otras especies se le han atribuido propiedades que van desde las antimicrobianas hasta de importancia para el sector salud, ya que inhiben la replicación del virus del VIH-1 e inhibe la proliferación celular en líneas cancerígenas (Lesner *et al.*, 2009 ; Berna *et al.*, 2009; Bernier, 2014). Con el objetivo de implementar alternativas de tratamiento a los tratamientos oncológicos existentes y particularmente, enfocados en que los tratamientos alternativos de nuevo desarrollo tengan alta selectividad sobre las células

cancerígenas y baja toxicidad sobre las células sanas, entonces en el grupo de trabajo se evaluó el efecto anticancerígeno de la fracción G10P1.7.57 y de la proteína DING presente en semillas de *Capsicum chinense* Jacq. Se encontró que su aplicación en varias líneas tumorales tiene un efecto inhibitorio del crecimiento, así como citotóxico (Cuadro 3.2 y 3.3), pero su mejor índice de selectividad fue en las líneas MCF-7 y SiHa. Además del efecto biológico de la fracción G10P1.7.57 observado sobre las líneas tumorales, también se detectó que la fracción proteica tiene poca selectividad ya que su efecto no diferenció entre células cancerígenas y células normales. La proteína DING una vez purificada también inhibió a la línea tumoral MCF-7, tal inhibición se consiguió con concentraciones de proteína muy bajas (Cuadro 3.8 y 3.9) en comparación con la concentración que se necesitó aplicar de la fracción G10P1.7.57 para alcanzar el mismo efecto de inhibición. Esos resultados permiten concluir que la proteína DING purificada debe ser sometida a más análisis en la búsqueda de potenciar su efecto anticancerígeno así como su selectividad para atacar a las células anormales. Además, se puede concluir que bajo las condiciones experimentales en las cuales se realizó este trabajo, la fracción G10P1.7.57 tiene poca posibilidad de ser utilizada como alternativa para el tratamiento del cáncer dada su complejidad proteica y su baja selectividad para afectar sólo células tumorales.

Cabe mencionar que resultados similares han sido descritos para otras proteínas DING que han sido utilizadas con propósitos terapéuticos, tal es el caso de la proteína DING denominada p38sj de *Hypericum perforatum* la cual inhibió el crecimiento de la línea celular U87 MG de glioblastoma primario y la T98G, una línea celular de glioblastoma que contiene el doble de cromosomas, es de resaltar que dicha inhibición se observó cuando dichas líneas celulares fueron transformadas con vectores de expresión para la proteína p38sj (Bookland *et al.*, 2012). De manera similar se ha reportado que la proteína de 28 kDa de tubérculos de *Heliantus tuberosus* que es expresada como mecanismo de defensa contra la infección de *Agrobacterium tumefaciens* inhibe el crecimiento *in vitro* de células de cáncer de mama denominadas MCF-7 y MDA MB 23 (Griffaut *et al.*, 2007) y que dicha inhibición comprende de un 50 a un 70% mientras que en células PC3 de cáncer de próstata sólo inhibe en un 50% (Griffaut *et al.*, 2007). Esos resultados son similares a los obtenidos en este estudio, aunque no profundizaron en el análisis de las proteínas correspondientes.

Por otra parte, las proteínas DING filogenéticamente pertenecen a la superfamilia de proteínas de unión a fosfato (PBP) y por ello unen grupos fosfato (Berna *et al.*, 2009; Bernier, 2014). En los ensayos de fosforilación de la fracción G10P1.7.57 y de la proteína

DING, se sugiere que algunos de los componentes proteicos de la fracción presentan fosforilación en serina y tirosina ya que dichos anticuerpos reaccionaron con algunos de sus polipéptidos (Figura 3.7). Cuando se analizó el efecto de la fracción G10P1.7.57 fosforilada sobre el crecimiento de la línea celular MCF-7 se encontró que su efecto biológico disminuyó debido a la fosforilación dado que para obtener las IC_{50} se necesitó de mayores cantidades (Cuadro 3.4 y 3.6) de la fracción proteica. Eso sugiere que la modificación atenúa la actividad biológica de la fracción G10P1.7.57.

El efecto de la modificación por glicosilación sobre la actividad biológica de la fracción proteica G10P1.7.57 mostró que la fosforilación-desfosforilación de la fracción proteica atenúa o potencia el efecto inhibitorio sobre las líneas tumorales, una vez más confirmando que la actividad biológica de la fracción es regulable por más de un tipo de modificación postraduccional, aunque no se conoce que en la proteína DING se presente más de un tipo de modificación a la vez, tal posibilidad deberá analizarse en estudios futuros. Hasta el momento no se ha descrito que las proteínas DING de otras especies presenten modificaciones postraducionales.

Con base en los resultados obtenidos es posible concluir que la fracción G10P1.7.57 y la proteína DING de *Capsicum chinense* Jacq. (~ 39 kDa) tienen características interesantes en la regulación de su actividad biológica, especialmente sobre sus mecanismos de regulación, tal es el caso de las modificaciones postraducionales. No obstante, también es posible concluir que, bajo las condiciones de este estudio, la posibilidad de utilizar a la fracción G10P1.7.57 y a la proteína DING como componentes únicos de tratamientos alternativos de control contra el cáncer parece lejana pues ambas muestran poca selectividad para afectar sólo a las células cancerígenas.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se obtuvo una proteína DING pura y se secuenció a nivel de aminoácidos, con esas nuevas secuencias se obtuvo una mayor cobertura de la proteína DING de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Se espera que de igual manera las nuevas secuencias permitan hacer modelado *in silico* de la proteína DING de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.).

Una posibilidad futura es que con las nuevas secuencias de aminoácidos que se obtuvieron a partir de la secuenciación de la proteína DING se puedan generar nuevos iniciadores de ADN con el propósito de clonar los genes de la proteína DING de *Capsicum chinense* Jacq; una tarea que hasta ahora ha demostrado ser más complicada de lo esperado.

La proteína DING de ~ 39 kDa purificada de *Capsicum chinense* Jacq. podría ser utilizada en estudios de cristalización de proteínas, para comparar su estructura con la de las dos únicas proteínas DING hasta ahora cristalizadas, la HPBP de humanos y la pFLUDING de *Pseudomonas fluorescens*. Esta comparación permitiría visualizar diferencias entre las proteínas de la misma familia DING.

Dado que en este trabajo se determinó que la proteína DING de ~ 39 kDa de *Capsicum chinense* Jacq. presenta glicosilación y fosforilación y que ambos eventos parecen estar involucrados en la regulación de su actividad biológica, entonces sería interesante determinar si dichas modificaciones también están involucradas en la regulación de las interacciones proteína-proteína que establecen las proteínas DING con otras proteínas, ya sea del propio organismo o de organismos invasores.

Dado que se ha documentado que algunas de las proteínas DING, particularmente la proteína DING denominada X-DING-CD4, son secretada por los seres humanos, entonces sería deseable que en un futuro se analizara si las modificaciones postraduccionales desempeñan una función importante para la secreción de la proteína DING.

CAPÍTULO V

BIBLIOGRAFIA

Agency for toxic substances and disease registry, en su página en internet
<http://www.atsdr.cdc.gov/>

Ahn, S., S. Moniot, M. Elias, E. Chabriere, D. Kim, & K. Scott (2007). Structure–function relationships in a bacterial DING protein. *FEBS letters*, 581(18), 3455-3460.

American Cancer Society, Inc, 2016, disponible en: <http://www.cancer.org/>

Amigo-Benavent, M. (2010). Efecto de la desglicosilación enzimática en la antigenicidad del alérgeno beta-conglicinina (7S globulina) de soja. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Madrid. pp. 62.

Arias Gómez, C. L. (2012). Caracterización de la ruta de N-glicosilación de proteínas en el sistema de endomembranas del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*: distribución al cloroplasto de N-glicoproteínas Characterization of the N-glycosylation pathway through the endomembrane system in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*; N-glycoprotein trafficking to the chloroplast. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. pp. 65

Ariño, J. (1997). Proteína fosfatasa en eucariotas: un ejemplo de conservación de estructuras y de diversidad de funciones. In Organización y evolución del genoma eucariota: marcadores moleculares (pp. 129-148). Universidad de la Coruña.

Avilés-Viñas, S. A., C. A. Lecona-Guzmán, A. Canto-Flick, S. López-Erosa, & N. Santana-Buzzy (2013). Morpho-histological and ultrastructural study on direct somatic embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. in liquid medium. *Plant Biotechnology Reports*, 7(3), 277-286.

Belenky, M., J. Prasain, H. Kim, & S. Barnes (2003). DING, a genistein target in human breast cancer: a protein without a gene. *The Journal of Nutrition*, 133(7), 2497S-2501S.

-
- Berna, A., F. Bernier, E. Chabrière, T. Perera, & K. Scott (2008). DING proteins; novel members of a prokaryotic phosphate-binding protein superfamily which extends into the eukaryotic kingdom. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(2), 170-175.
- Berna, A., K. Scott, E. Chabrière, & F. Bernier, (2009). The DING family of proteins: ubiquitous in eukaryotes, but where are the genes?. *Bioessays*, 31(5), 570-580.
- Bernier, F. (2013). DING proteins: numerous functions, elusive genes, a potential for health. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(17), 3045-3056.
- Bookland, M. J., N. Darbinian, M. Weaver, S. Amini, & K. Khalili, (2012). Growth inhibition of malignant glioblastoma by DING protein. *Journal of Neuro-Oncology*, 107(2), 247-256.
- Brito-Argáez L., M. Chi-Poot, R. Uc-Ku, J. A. Tamayo-Sansores, D. Madera-Piña & I. Islas-Flores (2014). Las proteínas DING, una familia con intrigantes funciones celulares, *Tecnociencia Chihuahua*, 8(1): 17-29.
- Brito-Argáez, L., F. Moguel-Salazar, F. Zamudio, T. González-Estrada & I. Islas-Flores (2009). Characterization of a *Capsicum chinense* seed peptide fraction with broad antibacterial activity. *Asian Journal of Biochemistry*, 4(3), 77-87.
- Cabezas Fernández del Campo, J. A. (2012). Glicopatología, glicoterapéutica y marcadores tumorales glicánicos. *Annu Real Acad Farmacol*, 169-191.
- Cancer Quest. En su página de internet <http://www.cancerquest.org/>
- Cetz luit, J. (2005). Micropropagación de chile dulce (*Capsicum annuum* L. var. Najera) y chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con miras al mejoramiento genético del cultivo. Tesis de Maestría. Centro Agronómico tropical de investigación y Enseñanza. pp. 65
- Charles, D. J. (2012). *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*. (ed) Springer Science & Business Media. pp. 189.

-
- Collombet, J. M., M. Elias, G. Gotthard, E. Four, E. Renault, A. Joffre & E. Chabrière (2010). Eukaryotic DING proteins are endogenous: an immunohistological study in mouse tissues. *PloSOne*, 5(2), e9099.
- Dennis, J. W., Granovsky, M., & Warren, C. E. (1999). Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1473(1), 21-34.
- Di Maro, A., A. De Maio, S. Castellano, A. Parente, B. Farina & M. R. Faraone-Mennella (2009). The ADP-ribosylating thermozyyme from *Sulfolobus solfataricus* is a DING protein. *Biological Chemistry*, 390(1), 27-30.
- Diemer, H., M. Elias, F. Renault, D. Rochu, C. Contreras-Martel, C. Schaeffer & E. Chabriere (2008). Tandem use of X-ray crystallography and mass spectrometry to obtain ab initio the complete and exact amino acids sequence of HPBP, a human 38-kDa apolipoprotein. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 71(4), 1708-1720.
- Douglass, J. F., N. N. Jaya, T. S. Vedvick, S. G. Reed, Y. Zhang & D. Carter (2001). Chemical deglycosylation can induce methylation, succinimide formation, and isomerization. *Journal of Protein Chemistry*, 20(7), 571-576.
- Flores-Vieyra, R., J. C. Raya-Pérez & M. E. Torres-Márquez (2005). Proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} : características y activación. *Revista de Educación Bioquímica*, 24(3-4), 74-80.
- García-Luna, P. P., Parejo Campos, J., & Pereira Cunill, J. L. (2006). Causas e impacto clínico de la desnutrición y caquexia en el paciente oncológico. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 10-16.
- Goetz, P. & R. Le Jeune, (2012). *Capsicum annum* et *Capsicum frutescens* Piment. *Phytothérapie*, 10(2), 126-130.
- Granados, S., Quiles, J. L., Gil, A., & Ramírez-Tortosa, M. C. (2006). Lípidos de la dieta y cáncer. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 44-54.
-

-
- Griffaut, B., Debiton, E., Madelmont, J. C., Maurizis, J. C., & Ledoigt, G. (2007). Stressed Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.) excrete a protein fraction with specific cytotoxicity on plant and animal tumour cell. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(9), 1324-1330.
- Grueninger-Leitch, F., A. D'Arcy, B. D'Arcy & C. Chène, (1996). Deglycosylation of proteins for crystallization using recombinant fusion protein glycosidases. *Protein Science*, 5(12), 2617-2622.
- Ibiza, V. P., J. Cañizares & F. Nuez (2010). EcoTILLING in *Capsicum* species: searching for new virus resistances *BMC genomics*, 2010, vol. 11, no 1, pp. 65
- Ivanova, A., Shilpi, R. Y., Sachdeva, R., Li, G., & Simm, M. (2012). Native X-DING-CD4 protein secreted by HIV-1 resistant CD4+ T cells blocks activity of IL-8 promoter in human endothelial cells infected with enteric bacteria. *Innate immunity*, 18(4), 571-579.
- Kaji, H., & T. Isobe (2013). Stable isotope labeling of *N*-glycosylated peptides by enzymatic deglycosylation for mass spectrometry-based glycoproteomics. *Mass Spectrometry of Glycoproteins: Methods and Protocols*, (ed) springer p.p 217-227.
- Kochieva, E. Z. & N. N. Ryzhova (2009). Analysis of resistance gene family diversity in pepper (*Capsicum annuum*). In *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 425(1) 73-75.
- Kole, C. (2011). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Industrial Crops*. (ed) Springer. pp.43
- Kurkin, V. A., L. R. Suleimanova, E.D. Daeva & V.I. Kadentsev (2011). Components of *Capsicum annuum* fruit. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(4), 667-668.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 15, 680.
- Lesner, A., R. Shilpi, A. Ivanova, M. A. Gawinowicz, J. Lesniak, D. Nikolov & M. Simm (2009). Identification of X-DING-CD4, a new member of human DING protein family
-

-
- that is secreted by HIV-1 resistant CD4+ T cells and has anti-viral activity. *Biochemical and Biophysical Research communications*, 389(2), 284-289.
- Long-Solís, J. (1987). *Capsicum* y cultura: La historia del chilli. Fondo de Cultura Económica. July 1987, Volume 41, Issue 3, pp 410–410.
- López, P. G., A. F. Canto & N. B. Santana (2009). El reto biotecnológico del chile habanero. *Ciencia*, 60, 30-35.
- MARTÍNEZ-DUNCKER, Iván, Dra. Laura Palomares-Aguilera,² QBP Domingo Sánchez-Francia,³ Dra. Rosella Mollicone,⁴ M en C Isabel Ibarra-González⁵. Trastornos congénitos de la glicosilación: abordaje clínico y de laboratorio. *Acta Pediátrica de México*, 2008, vol. 29, no 2, p. 78-88.
- Mehta, S & A. Singh (2006). Adsorption isotherms for red chilli (*Capsicum annum* L.). *European Food Research and Technology*, 223(6), 849-852.
- Miller, A. B., Hoogstraten, B. F. A. U., Staquet, M. F. A. U., & Winkler, A. (1981). Reporting results of cancer treatment. *cancer*, 47(1), 207-214.
- Mongkolporn, O & P. W. Taylor, (2011). Capsicum. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* (pp. 43-57). Springer Berlin Heidelberg.
- Moo-Puc, R, Robledo, D, & Freile-Pelegrián, Y. (2009). Actividad citotóxica y antiproliferativa in vitro de macroalgas marinas de Yucatán, México. *Ciencias marinas*, 35(4), 345-358. Recuperado en 29 de junio de 2016, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-38802009000400003&lng=es&tlng=es.
- Morales, R., A. Berna, P. Carpentier, C. Contreras-Martel, F. Renault, M. Nicodeme, F. B. chesne-seck, J. Dupuy, C. Schaeffer, H. Diemer, A. Van-Dorselaer, J.C. Fontecilla-Camps, P. ,D. DRochu, & E. Chabiere (2006). Serendipitous discovery and X-ray structure of a human phosphate binding apolipoprotein. *Structure*, 14(3), 601-609.
- Muñoz, A. (1997). *Cáncer: genes y nuevas terapias*. Editorial Hélice. (Vol. 2). p. 373.
-

Nava-Zuazo, C., F. Chávez-Silva, R. Moo-Puc, M.J. Chan-Bacab, B.O. Ortega-Morales, H. Moreno-Díaz & G. Navarrete-Vázquez (2014). 2-acylamino-5-nitro-1, 3-thiazoles: preparation and *In vitro* bioevaluation against four neglected protozoan parasites. *Bioorganic & Medicinal chemistry*, 22(5), 1626-1633.

Nuck, R., M. Zimmermann, D. Sauvageot, D. Josić & W. Reutter (1990). Optimized deglycosylation of glycoproteins by peptide-N4-(N-acetyl- β -glucosaminy)-asparagine amidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Glycoconjugate Journal*, 7(4), 279-286.

Organización mundial de la salud, en su página en línea: <http://www.who.int/es/>

Pantazaki, A. A., G. P. Tsolkas & D. A. Kyriakidis (2008). A DING phosphatase in *Thermus thermophilus*. *Amino Acids*, 34(3), 437-448.

Pérez-Aguilar, M. C., Goncalves, L., Mogollón, N., & Bonfante-Cabarcas, R. (2013). O-glicosilación incompleta en células cancerígenas y parásitos: Importancia biomedica. *Salus*, 17(2), 58-67.

Rahman A, Choudhary MI, Thomsen WJ. 2001. Bioassay Techniques for Drug Development. In: Manual of Bioassay Techniques for Natural Products Research, Harwood Academic Publishers, Netherlands, pp. 34–35

Ramchiary, N., M. Kehie, V. Brahma, S. Kumaria, & P. Tandon (2014). Application of genetics and genomics towards *Capsicum* translational research. *Plant Biotechnology Reports*, 8(2), 101-123.

Ruiz-Lau, N., F. M. Lara, & M. M. Estévez, (2011). El chile Habanero: su origen y usos. *Ciencia*. pp 70-77.

Sachdeva, R., N. Darbinian, K. Khalili, S. Amini, D. Gonzalez, A. Djeghader, E. chabriere, A. Suh, K. Scott & M. Simm (2013). DING proteins from phylogenetically different species share high degrees of sequence and structure homology and block transcription of HIV-1 LTR promoter. *PloS one*, 8(8), e69623.

Sachdeva, R., N. Darbinian, K. Khalili, S. Amini, D. Gonzalez, A. Djeghader & M. Simm (2013). DING proteins from phylogenetically different species share high degrees

of sequence and structure homology and block transcription of HIV-1 LTR promoter. PloS One, 8(8), e69623.

Sanatombi, K., & Sharma, G. J. (2008). In vitro propagation of *Capsicum chinense* Jacq. *Biologia Plantarum*, 52(3), 517-520.

Santoyo, J. J. A., & A. C. O. Martínez, (2012). Tecnología de producción de chile habanero en casa sombra en el sur de Sinaloa. SAGARPA. Fundación Produce Sinaloa. Gobierno del Estado de Sinaloa. Sinaloa, México. Vol. 8 Issue 4, p73-78. 6p

Scott, K., & L. Wu (2005). Functional properties of a recombinant bacterial DING protein: comparison with a homologous human protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1744(2), 234-244.

Secretaria de salud, en su pagina en línea: <http://www.gob.mx/salud>

Shah, M., A. Zaborin, J. C. Alverdy, K. Scott, & O. Zaborina (2014). Localization of DING proteins on PstS-containing outer-surface appendages of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters*, 352(1), 54-61.

Suh, A., V. Le Douce, O. Rohr, C. Schwartz & K. Scott (2013). Pseudomonas DING proteins as human transcriptional regulators and HIV-1 antagonists. *Virology Journal* 10: 234-242.

Suzuki, T., K. Kitajima, S. Inoue & Y. Inoue (1995). N-glycosylation/deglycosylation as a mechanism for the post-translational modification/remodification of proteins. *Glycoconjugate Journal*, 12(3), 183-193.

Lim.T.K. (2013) edible medicinal and Non-medicinal plants (ed) springer (pp. 682-689). Springer Netherlands

Tucuch-haas, C.J., G. Alcántar-Gonzales, V. M. Ordaz-chaparro, J. A. Santizo-Rincón, A. Iarqué-saavedra (2012). Producción y calidad de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con diferentes relaciones NH₄⁺/NO₃⁻ – y tamaño de partículas de sustratos. *Terra Latinoamericana*, 30(1), 9-15.

Vara Moreno, J. C. (2012). Crecimiento y desarrollo del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) y chile comapeñón (*Capsicum annuum* L.) en tres diferentes sustratos, bajo

condiciones de agricultura protegida. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias agrícolas, p 53.

Vázquez-Casarrubias, G., J. A. S. Escalante-Estrada, M. Rodríguez-González, C. Ramírez-Ayala & L. E. Escalante-Estrada (2011). Edad al trasplante y su efecto en el crecimiento y rendimiento de chile apaxtleco. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17(1), 61-65.

Waizel-Bucay, J., & R. C. Morfín (2011). El género *Capsicum* sp. ("chile"). Una versión panorámica. Editorial. ¿Cuánto cuesta la ciencia?, pp 67.

Wang, S., J. Wu, L. Savas, N. Patwardhan, & A. Khan (1998). The role of cell cycle regulatory proteins, cyclin D1, cyclin E, and p27 in thyroid carcinogenesis. *Human Pathology*, 29(11), 1304-1309.

Weigelt, B., Peterse, J. L., & Van't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews cancer*, 5(8), 591-602.

Xu, Q., H. W. Cheng, H. Q. He, Z. R. Liu, M. He, H. T. Yang, Z.L. Zhou & Y. H. Ji (2008). Deglycosylation altered the gating properties of rNav1. 3: glycosylation/deglycosylation homeostasis probably complicates the functional regulation of voltage-gated sodium channel. *Neuroscience Bulletin*, 24(5), 283-287.

Zhang, X. X., K. Scott, R. Meffin, & P. B. Rainey (2007). Genetic characterization of psp encoding the DING protein in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *BMC Microbiol.* 2007, 7,114.