

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

“Título de la tesis”

**Purificación y caracterización de la proteína tipo
lunasin de amaranto
(*Amaranthus hypochondriacus L.*)**

Enrique Maldonado Cervantes

Para obtener el grado de

Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2009



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Purificación y caracterización de la proteína tipo lunasin de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus L.*)**" presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Enrique Maldonado Cervantes** y aprobada el **03 de 08 de 2009** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Martha Leticia Santos Martínez

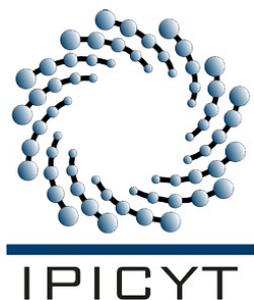
Presidente

Dr. Ana Paulina Barba de la Rosa

Secretario

Dra. María del Carmen González-Castillo

Vocal



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y expresión génica de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 211446.
Y Beca Mixta convocatoria Enero 2008 – Marzo 2009 para realizar la estancia en la Universidad Nacional de Andong (ciudad de Andong, provincia de Gyeongsang del norte, Corea del sur).

Este trabajo fue realizado con el Apoyo de UC-Mexus, Grant No. CN0754



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 066 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 3 días del mes de agosto del año 2009, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Presidenta	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa	Secretaria	IPICYT
Dra. María del Carmen González Castillo	Sinodal externo	UASLP

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Enrique Maldonado Cervantes

sobre la Tesis intitulada:

Purificación y caracterización de la proteína tipo lunasin de amaranto (Amaranthus hypocondriacus L.)

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 17:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 3 días del mes de agosto de 2009.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedico esta tesis a:
Mis seres queridos que me apoyaron en este y todos los proyectos de mi vida.
Gracias Mamá, Papá, Bety, Gus, Julia, Martha, Sil, Vero

Agradecimientos

A la doctora Ana Paulina Barba de la Rosa, por la asesoría, la confianza y paciencia otorgada.

Al profesor Hyung Jin Jeong, por la asesoría y dejarme usar las instalaciones de su laboratorio de Farmacología de plantas, Universidad Nacional de Andong.

A doctores Jin Boo Jeong y Jae Ho Park y a el maestro Se Chul Hong por su apoyo y consejos en la realización de este trabajo.

A la Dra. Fabiola Galván por su apoyo y consejos para la realización de este trabajo.

A los chicos del Laboratorio 2, por sus consejos para la realización del trabajo de tesis, pero sobre todo por su amistad.

A mis revisores de tesis por sus comentarios.

A el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

Al IPICYT.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice general	vii
Índice de tablas	x
Índice de figuras	xi
Lista de abreviaturas	xiii
Resumen	xv
Abstract	xvi
1. Introducción	1
1.1 El amaranto.	1
1.2 El péptido lunasin.	1
1.3 El amaranto y la proteína tipo lunasin.	3
2 Objetivos	5
2.1 Objetivos generales.	5
2.2 Objetivos particulares.	5
3 Materiales y métodos.	6
3.1 Extracciones proteínicas.	6
3.1.1 Extracción de fracciones proteínicas del grano maduro.	6
3.1.2 Extracción de proteínas de hoja.	7
3.1.3 Extracción de proteínas totales de semilla madura y semilla inmadura.	8
3.1.4 Extracción de proteínas totales de tallo.	8
3.1.5 Extracción de proteínas totales de raíz.	9

3.2 Purificación de la proteína lunasin de amaranto.	10
3.3 Cuantificación de proteínas	10
3.4 Electroforesis SDS-PAGE	11
3.4.1 Electroforesis SDS-PAGE 1-D.	11
3.4.2 Electroforesis SDS-PAGE 2-D.	12
3.5 Tinciones de geles SDS-PAGE.	12
3.5.1 Tinción con azul brillante de Coomassie.	12
3.5.2 Tinción con Sypro Rubi.	12
3.5.3 Tinción para fosfoproteínas.	13
3.6 Western blot.	13
3.7 Cultivos celulares.	13
3.7.1 Reducción de la formación de colonias.	14
3.7.2 Reducción de la fosforilación de la proteína Retinoblastoma (Rb).	14
3.7.3 Ensayo de internalización.	16
3.8 Ensayo de acetilación de histonas.	16
3.8.1 Obtención de extracto nuclear.	17
3.9 Análisis estadístico	18
4 Resultados	19
4.1 Identificación de la proteína tipo lunasin en grano maduro	19
4.2 Identificación de la proteína tipo lunasin en otros tejidos de planta de amaranto	22
4.3 Ensayo de internalización de lunasin en células NIH 3T3.	22

4.4 Purificación de la proteína tipo lunasin de amaranto.	25
4.5 Ensayo de la reducción de la acetilación de histonas H ₃ y H ₄ .	25
4.6 Reducción de la fosforilación de la proteína del Retinoblastoma.	28
4.7 Reducción de la formación de colonias transformadas con 3-MCA.	29
5 Discusión	33
6 Conclusiones	36
7 Referencias	37
ANEXO	40

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Preparación de la curva de calibración para la cuantificación de proteínas.	11
Tabla 2	Preparación de geles de acrilamida.	12
Tabla 3.	Análisis por densidad óptica de las bandas de la proteína Rb.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo de acción del péptido lunasin	2
Figura 2. Diagrama de flujo de la extracción de las fracciones proteínicas.	7
Figura 3. Diseño del cultivo celular para los experimentos de inhibición de la formación de colonias y fosforilación de la proteína Rb.	15
Figura 4. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie y Western blot de las fracciones proteínicas del grano de amaranto.	19
Figura 5. Gel 2-D SDS-PAGE y Western Blot de las globulinas 11S de amaranto.	21
Figura 6. Western blot de las proteínas totales de tejidos de la planta de amaranto	22
Figura 7.- Ensayo de internalización del lunasin de amaranto.	24
Figura 8. Western blot y gel de acrilamida (SDS-PAGE) de la proteína tipo lunasin de amaranto purificada.	25
Figura 9. Ensayo de inhibición de la acetilación de histonas.	27
Figura 10. Fosforilación de la proteína Rb.	29

Figura 11. Disminución de la formación de colonias.	30
Figura 12. Disminución de la formación de colonias en la línea celular NIH3T3.	32

LISTA DE ABREVIATURAS

1-D	Primera dimensión.
2-D	Segunda dimensión.
3-MCA	3-Metilcolantreno.
ADN	Acido desoxirribonucleico.
AP	Fosfatasa Alcalina.
BCIP	Fosfato de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil.
β -ME	2-mercaptoetanol.
BSA	Albúmina de suero Bovino.
$^{\circ}$ C	Grados centígrados.
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilammonio]-1-propanesulfonato.
cm	Centímetros.
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol.
DMEM	Medio Modificado de Earle's Dulbecco's.
DTT	Diotiotreitol.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
FITC	Fluoreceína de Isotiocianato.
h	Hora.
HAT	Histona Acetiltransferasa.
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico.
HPR	Peroxidasa de rábano picante.
kDa	Kilodaltones.
LDL	lipoproteínas de baja densidad.
M	Molar.
min	Minuto.
NBT	Nitro Azul de Tetrazolio.
NL	No lineal.
nM	Nanomolar.
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos.
pI	Punto isoeléctrico.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
PSA	Persulfato de amonio.
PVDF	Fluoruro de polivinilideno.
PVPP	Polivinilpolipirrolidona.
Qro.	Querétaro.
Rb	Retinoblastoma.
Rpm	Revoluciones por minuto.
S (11S, 2S)	Coeficiente de sedimentación (Svedbergs).
SDS	Dodecil-Sulfato de Sodio.
SDS-PAGE	Electroforesis Gel en Poli-Acrilamida con SDS
SFB	Suero Bovino Fetal.
TBS	Amortiguador Salino de Tris
TCA	Ácido Tricloroacetico.

TEMED
TMB
V

tetrametiletilendiamino.
3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.
Volts.

RESUMEN

El lunasin es un péptido que fue identificado por primera vez en soya y posteriormente en granos de plantas como trigo, cebada, pimienta, *Solanum nigrum* L. y el amaranto. La importancia del péptido lunasin radica en sus propiedades cáncer-preventivas. El objetivo del presente trabajo se enfocó en la purificación y la caracterización bioquímica y biológica del péptido lunasin de amaranto. Los extractos totales de proteína total de hojas, tallo, raíz, proteína madura e inmadura fueron analizados mediante Western-blot, utilizando anticuerpos anti-lunasin y se identificó una proteína de 60 kDa, mientras que el análisis Western blot de las diferentes fracciones proteínicas de la semilla de amaranto reveló una proteína de 20 kDa. Analizando la fracción globulinas 11S por medio de geles en dos dimensiones, se encontró una sola mancha de proteína con peso molecular de 20 kDa y un punto isoeléctrico de 9, esta proteína fue purificada y su bioactividad fue determinada utilizando modelos *in vitro*. Se trataron células fibroblásticas de ratón de la línea celular NIH 3T3, con un extracto de amaranto y se determinó que la proteína tipo lunasin de amaranto se dirige al núcleo celular en un tiempo de 12 horas, tiempo mucho menor a lo reportado para el lunasin de soya. Se determinó que 50 µg de extracto proteínico de las globulinas 11S del grano de amaranto reducen la acetilación de Histonas H₃ y H₄ en un 55.55 y 40%, respectivamente, mientras que una concentración de 1 µM de la lunasin purificada es capaz de reducir la acetilación de las Histonas H₃ y H₄, fue en un 77 y 70%, respectivamente.

Determinamos que células de la línea celular NIH 3T3 tratadas con 10 nM de lunasin de amaranto inhibió la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb), lo que sugiere que este lunasin actúa como protector durante la represión de la mitosis.

Se diseñó un experimento para observar la inhibición de la formación de colonias en las células tratadas con el agente carcinogénico 3-MCA. Los cultivos celulares fueron tratados con diferentes concentraciones del lunasin; y se observó que a mayor concentración disminuye la densidad y número de colonias, tratados con 3-MCA, y en los cultivos control tratados con una concentración de 1 μ M de la proteína tipo lunasin, en ausencia de 3-MCA. Lo que nos indica que el lunasin induce un arresto celular en las células recién transformadas con el químico 3-MCA y que a altas concentraciones de lunasin de amaranto (1 μ M) es capaz de provocar una disminución en la mitosis.

ABSTRACT

Lunasin is a peptide found in soy which have been reported with cancer-preventive properties and has been found in various grains including amaranth grain. In this thesis work we focused on the identification of amaranth lunasin-type protein, in addition to the purification and characterization of its bioactivity in “*in vitro*” models. Through two-dimensional gels it was determined that the amaranth lunasin-type protein has a molecular weight of 20 kDa and an isoelectric point of 9. In leaf, stem, root, immature and mature seed were identified a protein with 60 kDa that cross-reacts with antibodies anti-lunasin by a Western blot. An important aspect of the proposed mechanism for peptide lunasin is its interaction with proteins of the chromatin: the histones H3 and H4. For this purpose, it is necessary that the protein crosses the plasma membrane and translocates to the cell nucleus. The cell line NIH 3T3 was treated with amaranth extract and found that the amaranth lunasin-type protein addresses the cell nucleus in a time of 12 hours. In this work it was determined whether the amaranth lunasin-type protein inhibits the acetylation of histones H₃ and H₄, and it was estimated that 50 µg protein extracts from 11S globulins grain amaranth reduces acetylation of histones in a 55.55 and 40 % in H3 and H4 respectively, and a concentration of 1 µM of purified protein lunasin rate reduces the acetylation of histones by 77 and 70% in histone H3 and H4 respectively.

One theory proposed to understand the mechanism of action of the amaranth lunasin-type protein is that these proteins confer protection as repressor of mitosis,

such as retinoblastoma protein (Rb). In the present study we found that cells treated with the amaranth lunasin-type protein inhibits the Rb protein and is phosphorylated even at a concentration of 10 nM (lowest concentration tested).

An experiment was designed to observe the inhibition of colony formation in cells treated with the carcinogen 3-MCA. The cultures were treated at different concentrations of the amaranth lunasin-type protein and found that a higher concentration (1 μ M) lowers the density and number of colonies treated with 3-MCA, and on crops treated with a concentration of 1 μ M protein type lunasin and without the chemical 3-MCA. This data suggest that the amaranth lunasin-type protein induces an arrest in newly transformed cells with the chemical 3-MCA, and that high concentration of amaranth lunasin-type protein (1 μ M) can cause mitosis inhibition.

I INTRODUCCIÓN

1.1 El amaranto

El amaranto es una planta tradicional mexicana que posee granos con alto valor nutricional, contiene proteínas de buena calidad, vitaminas, minerales y varios compuestos fenólicos y flavonoides (Yanes y cols. 1986; Barba de la Rosa y col. 2009). Se han reportado propiedades benéficas para la salud relacionadas con el consumo del amaranto como: disminución de los niveles de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (LDL); así como también propiedades antitumorales y antioxidantes (Kim y cols. 2006a, Kim y cols. 2006b). En un estudio reciente por nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado que los dípticos trípticos de las fracciones globulinas y glutelinas del grano de amaranto contienen péptidos: anticarcinogénicos, antihipertensivos, antitrombóticos, inmunomoduladores, antioxidativos, entre otros (Silva Sánchez y cols. 2008).

1.2 El péptido lunasin

Lunasin es un péptido de 43 aminoácidos cuya secuencia es la siguiente:

SKWQHQQDSCRKQKQGVNLTPCEKHIMEKIQQ-RGD-**DDDDDDDD**

Este péptido contiene 8 residuos de aspartato (D) en su extremo carboxilo terminal; precedido de un motivo de adhesión celular Arg-Gly-Asp (RGD) y una hélice predicha (secuencia subrayada) con una homología estructural a una región conservada en proteínas de unión a cromatina (Gálvez 2001). Se descubrió

originalmente como un péptido procesado de una proteína soluble en agua del grano de soya, la albúmina 2S, este péptido llamó la atención ya que al tratar de expresarlo en *E. coli* se observó una tasa de división celular baja y que algunas bacterias dividían su material genético pero sin citocinesis (Gálvez y de Lumen 1999). El péptido lunasin inhibe la transformación celular inducida por agentes químicos cancerígenos y oncogenes, estudios realizados en animales inhibe la incidencia de tumores y retrasa su aparición (Gálvez y cols. 2001); el posible mecanismo de acción implica la inhibición de acetilación de histonas que son expuestas al ocurrir el fenómeno de transformación celular; esta desregulación en la dinámica de acetilación/desacetilación de histonas conduce a una muerte celular programada (apoptosis) a las células que han sufrido un fenómeno de transformación a células cancerosas (Gálvez y de Lumen 1999).

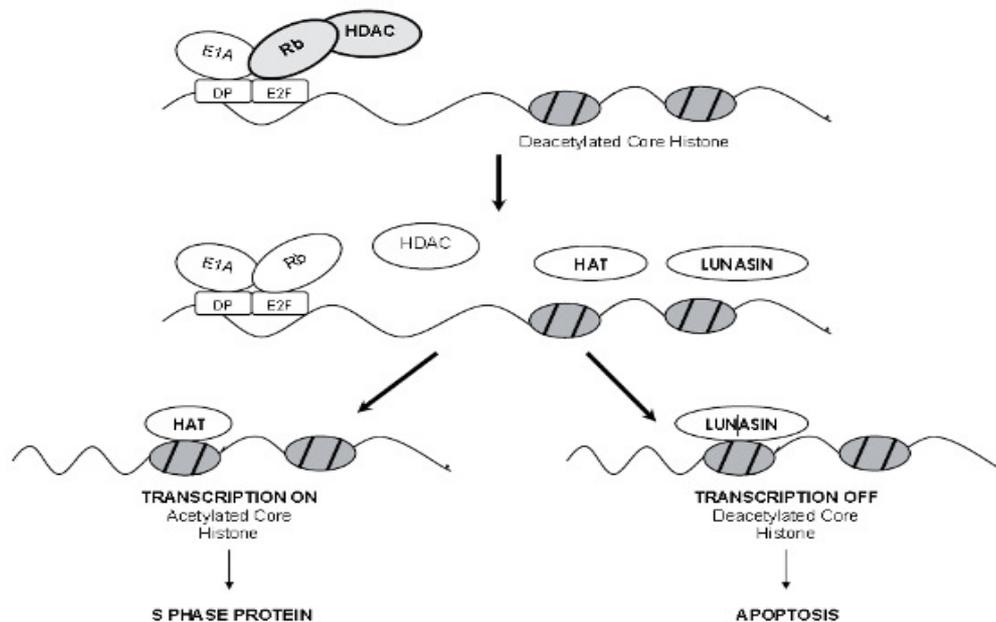


Figura 1. Mecanismo de acción del péptido lunasin (Imagen tomada de Hernández-Ledesma y de Lumen 2008).

La formación de la semilla en angiospermas consta de tres etapas; la primera se caracteriza por una rápida división y diferenciación de sus células; en la segunda etapa, las células cesan su división, aumenta su volumen citoplasmático, se inicia la síntesis de macromoléculas de almacenaje como: proteínas, lípidos y carbohidratos; durante esta etapa el material genético aumenta debido al fenómeno de endoreduplicación (Bewley 1997); es en esta etapa que aparecen las proteínas de reserva como las albúminas 2S y el péptido lunasin, lo que generó la teoría de que este péptido juega un papel importante en el arresto celular observado en las células del grano. Por lo que se espera encontrar el péptido lunasin o alguna proteína tipo lunasin que cumpla las mismas funciones en todos los granos de las angiospermas (Gálvez y de Lumen, 1999). Hasta el momento el péptido lunasin se ha encontrado en cebada, trigo, tabaco cimarrón, arroz y recientemente en el amaranto (Hernández-Ledesma y de Lumen 2008; De Mejía y cols. 2004; Silva-Sánchez y cols. 2009).

1.3 Amaranto y la proteína tipo lunasin

Evidencias recientes, obtenidas por nuestro grupo de trabajo, ha reportado que los digeridos trípticos de la fracción proteínica de glutelinas de *Amaranthus hypochondriacus* L. inducen apoptosis en células HeLa (Silva-Sánchez y cols. 2008). Esta evidencia supone la existencia de un péptido o proteína que modula la respuesta antiproliferativa celular. En este mismo estudio, se reportó una proteína que era identificada por los anticuerpos contra lunasin de soya. Dadas estas dos evidencias, se sugiere que una proteína tipo lunasin presente en amaranto pudiera

estar cumpliendo con las funciones tanto en el grano como en las células del estudio, similares a las reportadas para el péptido lunasin de soya.

La identificación y caracterización de una proteína tipo lunasin en amaranto, que posea una bioactividad comparable a otras proteínas de esta clase, nos ayudara a comprender y ampliar el conocimiento de su función endógena y sus posibles aplicaciones para el beneficio del ser humano.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

Caracterizar la proteína tipo lunasin de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) y analizar su bioactividad cáncer-preventiva en modelos *in vitro*.

2.2 Objetivos particulares

1. Obtener extractos proteínicos del grano y proteínas totales de tejidos de la planta de amaranto.
2. Identificar la proteína tipo lunasin mediante análisis Western Blot.
3. Analizar la capacidad de internalización hacia el núcleo de células fibroblásticas de ratón NIH 3T3 del lunasin de amaranto para la.
4. Analizar si el lunasin de amaranto inhibe la acetilación de las Histonas H₃ y H₄.
5. Comprobar si la proteína tipo lunasin de amaranto ejerce una acción quimioprotectora en la línea celular NIH 3T3 contra el agente cancerígeno 3-metilcolantreno (3-MCA).

III. MATERIAL Y METODOS

3.1. Extracciones proteínicas

3.1.1. Extracción de fracciones proteínicas del grano maduro

El método de extracción se llevó a cabo según el método de Barba de la Rosa y cols. (Barba de la Rosa y cols. 1994) Se utilizaron semillas maduras de *Amaranthus hypochondriacus* L. cv Nutrisol para el desarrollo de este trabajo. El grano de amaranto se molió hasta que se obtuvo una harina uniforme. Se formó una suspensión de la harina: amortiguador de extracción. La Figura 2 muestra el diagrama de la extracción de proteínas de reserva de amaranto. Cada extracción duró 90 min, con intervalos de agitación y sonicación de 10 min. Después de la extracción la suspensión se centrifugó por 10 min a 13000 rpm a 4°C. La pastilla fue utilizada para la extracción de la siguiente fracción proteínica. La fracción de albúminas fue extraída con agua, las globulinas con soluciones salinas al 0.1 y 0.8 M NaCl, la fracción prolaminas con etanol al 70% la fracción glutelinas con 0.1 M NaOH (ver anexo). Las muestras obtenidas fueron almacenadas a -80°C hasta su uso posterior.

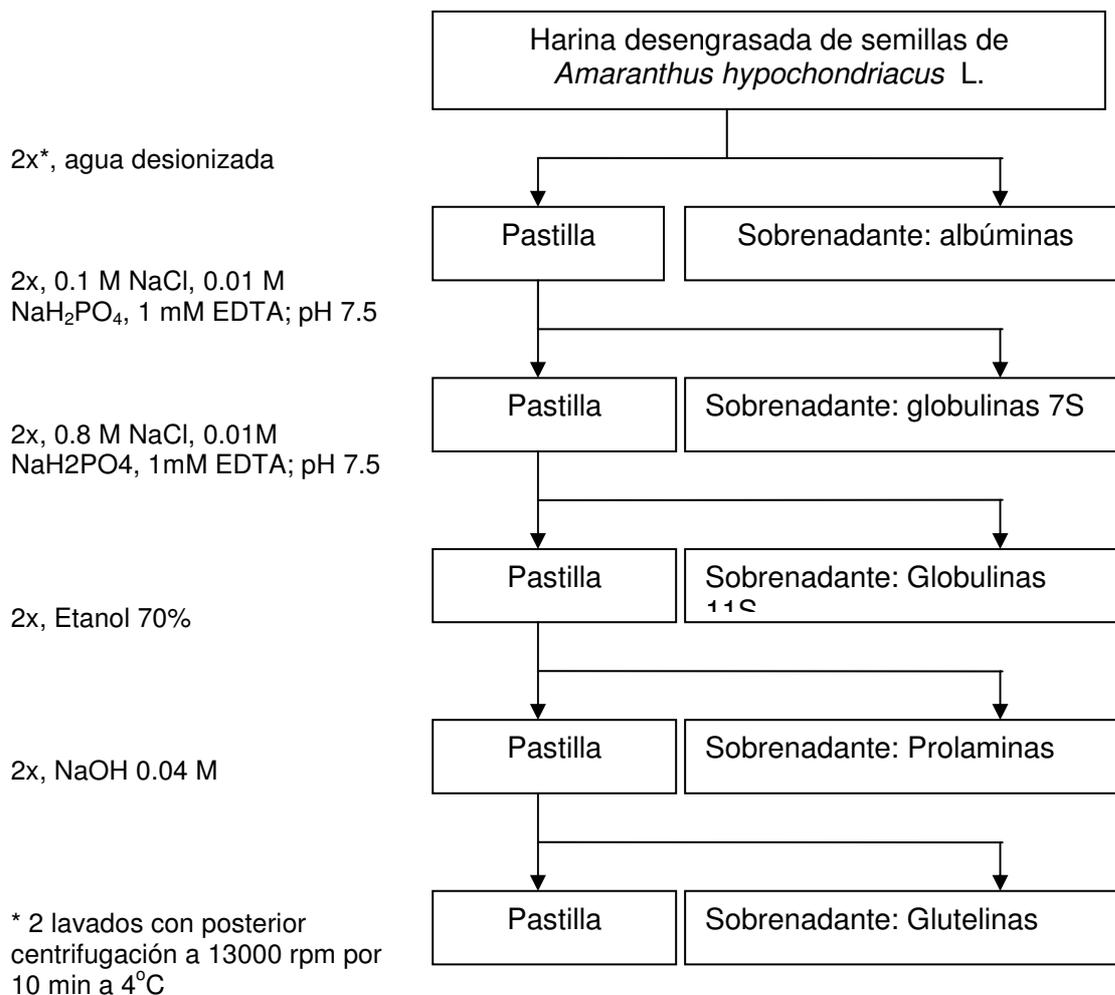


Figura 2. Diagrama de flujo de la extracción de las fracciones proteínicas de semilla de amaranto (Barba de la Rosa y cols 1994).

3.1.

2. Extracción de proteínas de hoja.

La extracción de proteínas totales de hoja se realizó siguiendo el método modificado de Saravanan y Rose (2004). Las hojas de amaranto se pulverizaron en nitrógeno líquido con la ayuda de un molino para granos; el polvo se homogenizó con solución de extracción con sonicación por 15 min en hielo (Ultrasonic Processor). Por cada 0,3 g de muestra fresca se utilizó 1 ml de solución de extracción (ver anexo). La suspensión se centrifugó 1 min a 3000 rpm

a 4°C. El sobrenadante se colectó y se dejó precipitar por toda la noche a -20°C y se centrifugó nuevamente por 10 min a 13000 rpm a 4°C. La pastilla de proteínas se lavó con la solución A (ver anexo), el siguiente lavado fue con metanol frío y varios lavados con acetona fría, cada lavado consistió de mezclado con agitación en vortex y centrifugación por 10 min a 13000 rpm a 4°C. La pastilla resultante se almacenó a -80°C hasta su uso posterior.

3.1.3. Extracción de proteínas totales de semilla madura e inmadura

Para la extracción de proteínas totales de semillas maduras e inmaduras se utilizó el método de extracción de proteínas de hoja descrito en la sección anterior, con la diferencia en la relación de muestra/solución de extracción, en este caso se empleó una relación de 1:10 (muestra: solución de extracción). Las pastillas fueron guardadas a -80°C hasta su uso posterior.

3.1.4. Extracción de proteínas totales de tallo.

La extracción de las proteínas totales del tallo de la planta de amaranto se realizó con el método de Hurkman y Tanaka (1986); las muestras fueron pulverizadas con nitrógeno líquido con la ayuda de un molino para granos. Por cada gramo de muestra pulverizada se agregaron 3 ml de buffer de extracción (ver apéndice), la suspensión se incubó a 4°C por 10 min con agitación; se agregó un volumen igual de fenol amortiguado con Tris y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 min a 6750 rpm a 4°C. La fase fenólica (parte superior) fue recuperada y se colocó dentro de un tubo nuevo. Se agregaron 3 ml de buffer de extracción (ver anexo) y se incubó por 3 min a temperatura ambiente, se

centrifugó 10 min a 6750 rpm a 4°C; nuevamente se recuperó la fase fenólica y se colocó en un tubo nuevo, se agregaron 4 volúmenes de solución de precipitación (ver anexo) y se dejó precipitando toda la noche a -20°C. Se centrifugó 10 min a 6750 rpm a 4°C, la pastilla de proteínas se lavó tres veces con la solución de precipitación (ver anexo) y 2 veces con acetona fría; cada paso de lavado consiste en mezclado con vortex y centrifugaciones de 5 min 6750 rpm a 4°C. La pastilla se guardó a -80°C hasta su uso posterior.

3.1.5 Extracción de proteínas totales de raíz.

Para la extracción de proteínas totales de raíz se utilizó un método modificado de la extracción acetona-TCA desarrollado por Huerta-Ocampo y cols. (2009). La muestra fue pulverizada con nitrógeno líquido con ayuda de un molino de grano, por cada gramo de muestra se utilizaron 3 ml de solución de extracción. La suspensión se homogenizó con ayuda de un sonicador de punta (Ultrasonic Processor) por 20 min en hielo, se centrifugó 10 min a 13000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y se le agregaron 4 volúmenes de solución TCA-T (ver anexo) y se dejó precipitar a -20°C por toda la noche. Se centrifugó 10 min 13000 rpm a 4°C, la pastilla de proteínas se lavó de la misma manera que la muestra de hoja con el método de acetona-TCA. La pastilla se guardó a -80°C hasta su uso posterior.

3.2. Purificación de la proteína lunasin de amaranto

La proteína lunasin fue purificada utilizando el método de elución de gel de acrilamida (Pierce Biotechnology, 2004). La fracción globulinas 11S se separó

electroforéticamente en un gel de acrilamida al 12% (SDS-PAGE). La proteína se cortó del gel y se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se añadieron 500 μ l de solución de elusión (ver anexo), se aplastó con un pistilo y se incubó con agitación rotatoria toda la noche a 30°C. Las muestras se centrifugaron por 10 min a 13000 rpm a 4°C y el sobrenadante fue recuperado. La muestra obtenida se volvió a correr nuevamente en un gel al 12% y se hizo un Western blot para confirmar que la banda recuperada correspondía a la proteína de interés. La muestra restante se almacenó a -80°C hasta su uso posterior.

3.3. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la concentración de las proteínas se realizó usando el reactivo Protein Assay Dye Reagent Concentrate de BioRad. Para las curvas de calibración se preparó un stock de de BSA a una concentración de 1.4 mg/ml y se realizó una curva estándar como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Preparación de la curva de calibración para la cuantificación de proteínas

Estándar	Conc. Proteína [mg/ml]	1.4 mg/ml BSA [μl]	Agua [μl]
1	0.0	0	200
2	0.2	29	171
3	0.4	57	143
4	0.6	86	114
5	0.8	114	86
6	1.0	143	57
7	1.2	171	29
8	1.4	200	0

Para realizar la curva se preparó 1ml de una mezcla de 200 μ l de reactivo concentrado y 800 μ l de agua MiliQ, y se añadieron 20 μ l de cada estándar; se incubó a temperatura ambiente por al menos 5 min y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm dentro de los 30 min de estabilidad del compuesto.

3.4. Electroforesis SDS-PAGE

3.4.1. Electroforesis SDS-PAGE 1-D

Los geles de acrilamida SDS-PAGE se prepararon con gel concentrador al 4% y el gel separador en gradiente del 8-15%. Los geles se prepararon de acuerdo a la Tabla 2.

Tabla 2. Preparación de geles de acrilamida

Reactivo	4%(μ l)	8% (μ l)	12%(μ l)	15%(μ l)
Acrilamida	198	1056	1584	1980
Agua MiliQ	900	1884	1356	960
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	378	1000	1000	1000
10% SDS	15	40	40	40
10% PSA	7.5	20	20	20
TEMED	1.5	2	2	2
Volumen final	1500	4000	4000	4000

Las corridas electroforéticas se realizaron a un amperaje de 10 mA durante el paso del azul de bromofenol en el gel concentrador y de 20 mA al entrar a la parte del gel separador.

3.4.2. Electroforesis SDS-PAGE 2-D

Para el análisis en geles bidimensionales se utilizaron tiras de 11 cm de largo (ReadyStrip IPG Strips) con rangos de pH de 3-10 NL (no lineal) y de 7-10. La primera dimensión fue corrida en sistema IPGphor (Amersham) y la segunda dimensión en la cámara Criterion (Biorad). Las muestras fueron procesadas acorde al manual de procedimiento del fabricante (Ver anexo).

3.5. Tinciones de geles SDS-PAGE

Los geles se escanearon con el equipo Gel Logic 100 Imaging System (Kodak) y se analizaron con el programa Molecular Imaging (Kodak).

3.5.1. Tinción con azul brillante de Coomassie

Los geles se tiñeron por lo menos 2 horas con azul de Coomassie R-250 al 0.025% (ver anexo) a tem ambiente y se destiñeron con la solución de desteñido (ver anexo) hasta eliminar el fondo formado por la tinción, los geles se lavaron con agua destilada hasta que el gel quedó completamente libre de metanol.

3.5.2. Tinción con Sypro Rubi

Para fijar los geles se utilizó la solución de fijado (ver anexo), durante 30 min y después se tiñeron con el colorante Sypro ruby (Molecular Probes). Los geles se destiñeron con solución de desteñido (ver anexo) por 15 min.

3.5.3. Tinción para fosfoproteínas

Para fijar los geles se utilizó la solución de fijado (ver anexo), durante 30 min y después se tiñeron con el colorante Pro-Q-Diamond (Molecular Probes). El gel fue desteñado con la solución de desteñado (ver anexo) por 15 min.

3.6. Western blot

Las proteínas separadas en geles de acrilamida fueron transferidas a membranas PVDF (Sequi-Blot PVDF, Bio-Rad). Las membranas se hidrataron con metanol al 80% y lavadas con agua MiliQ. La transferencia se llevó a cabo en la cámara de transferencia semi-seca (Trans-Blot SD, Biorad ®) para minigeles (11x7 cm) 45 min a 15 V, para geles de 13.3 x 8.5 cm de 1 h a 15V.

La membrana se bloqueó por 90 min con la solución Blotto A (ver anexo), y se lavó con solución 1% TBS-T (ver anexo). Después de lavado, se incubó por 1 h con el anticuerpo primario anti-lunasin a una dilución 1:1000 en la solución blotto B (ver anexo); se lavó con la solución 1% TBS-T y se incubó por otra hora con el anticuerpo secundario a una dilución de 1:3000 en la solución blotto B, después se lavó con la solución 1% TBS-T, seguida de lavado con la solución AP (ver anexo) y finalmente se reveló con el reactivo BCIP/NBT (Boehringer Mannheim), la reacción se detuvo con agua destilada. La membrana revelada se escaneó con el equipo ScanJet 3660, HP.

3.7. Cultivos celulares

La línea de fibroblastos de ratón NIH 3T3 fue donada por el Instituto de Neurobiología, Juriquilla Qro. y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de

estreptomycin y penicilina, realizando cambios de medio cada tercer día en una atmósfera de 5% de CO₂.

3.7.1. Reducción de la formación de colonias

La cantidad de células fueron cuantificadas con azul de tripano y se cultivaron en placas de 6 pozos inoculando 5×10^3 células en cada pozo, se dejaron adherir por 24 h, después se realizó cambio de medio, con lavados de PBS 1X, y al nuevo medio se le adicionó el lunasin de amaranto purificado a las siguientes concentraciones: 0, 10, 100, 500 y 1000 nM. Los cultivos se incubaron por 4h y se añadió 3-MCA (3-metilcloantreno) a 5 µg/ml, adicionando acetona pura como control negativo (Figura 3). Se cambió el medio de cultivo a las 24 h de incubación el cual contenía los tratamientos de lunasin antes mencionados. Se realizó cambio de medio de cultivo que contenía los tratamientos con lunasin cada semana por un periodo de 2 semanas. Se removió el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS, se fijaron con metanol absoluto y se tiñeron con el colorante Giemsa. Las células se observaron en un microscopio óptico.

El conteo de colonias se realizó usando el programa Quantity One

3.7.2. Reducción de la fosforilación de la proteína Retinoblastoma (pRb).

Las células fueron cuantificadas con azul de tripano y se cultivaron en placas de 6 pozos y se inocularon 5×10^3 células en cada uno, el medio de cultivo no contenía suero bovino fetal; se dejaron adherir por 24 h, después se realizó cambio de medio, con lavados de PBS 1X, y al nuevo medio se le adicionó el tratamiento con lunasin a las siguientes concentraciones: 0, 10, 100, 500 y 1000 nM. Los cultivos

se incubaron por 4h y se añadió 3-MCA a 5 µg/ml, adicionando acetona pura como control negativo (Figura 3). Se cambió el medio de cultivo a las 24 h de incubación el cual contenía los tratamientos de lunasin antes mencionados. Se realizó cambio de medio de cultivo que contenía los tratamientos con lunasin cada semana por un periodo de 2 semanas. Finalmente se retiró el medio de cultivo y se lavaron los pozos con PBS, se agregó 1ml de buffer de lisis; se despegaron las células manualmente con un levantador de células, la suspensión se sonicó por 2 min en un sonicador de punta (Ultrasonic Processor) a una amplitud de 25%. Las muestras se centrifugaron por 5 min a 13000 rpm a 4°C, el sobrenadante se precipitó con acetona fría a -20°C por 4 h, la pastilla se lavó con metanol-cloroformo: se agregaron 600 µl de metanol, se mezcló con vortex, se agregaron 150 µl de cloroformo y mezcló con vortex, se agregaron 450 µl de agua MiliQ y se centrifugó por 5 min a 13000 rpm a 4°C. La fase superior fue eliminada y se agregaron 450 µl de metanol y se mezcló con vortex, se centrifugó 5 min a 13000 rpm y el sobrenadante se decantó, la pastilla formada se guardó a -80 °C hasta su uso posterior.

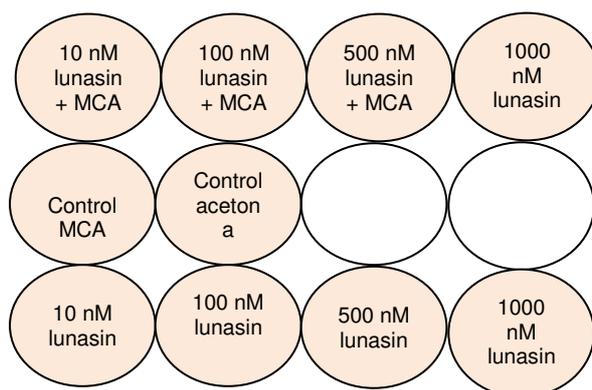


Figura 3. Diseño del cultivo celular para los experimentos de inhibición de la formación de colonias y fosforilación de la proteína Rb.

3.7.3. Ensayo de internalización.

Para este experimento se utilizó la fracción proteínica de albúminas del grano de amaranto. Se esterilizaron vidrios y se colocaron en los pozos de placas de 6 pozos. En cada pozo se trató con 50 μ l de la fracción proteínica, a las 3, 6, 9, 12 y 15 horas de incubación. Las células se fijaron con 2% de formaldehído. Los pozos se lavaron con PBS 1X. Se bloqueó con la solución FBS/PBS (ver anexo). Se incubó con un anticuerpo anti-lunasin a una dilución de 1:1000 en la solución L-A (ver anexo), por una hora y entonces se lavó con PBS.

La placa de cultivo se incubó en la oscuridad por 1 h con el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a fluoresceína (FITC) en una dilución 1:250 en la solución L-A. Las muestras se observaron en un microscopio confocal a 520 nm a una longitud de onda de excitación de 495 nm. El compuesto DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindol) fue utilizado para localizar el núcleo celular durante la incubación del anticuerpo secundario.

3.8. Ensayo de acetilación de histonas

Para el ensayo de acetilación de histonas se utilizó el kit HAT Assay (Millipore), siguiendo el protocolo del fabricante con unas modificaciones. Se incubaron por 1 h 100 ng de péptidos de histonas no acetiladas biotiniladas en los pozos de la placa recubierta con estreptavidina, junto con 25 y 50 μ g en el caso de los extractos de globulinas 11S, y 0, 10, 100, 500 y 1000 nM de lunasin; a temperatura ambiente. Como control de referencia se agregaron en un pozo 50 ng de histona acetilada con 50 ng de histona no acetilada. Se lavaron los pozos con TBS (Upstate, Millipore), se bloqueó 30 min a 30°C con 3% de BSA (Millipore) en

TBS, los pozos se lavaron con TBS. Se incubó 1 h a 30°C con el coctel de reacción HAT (ver anexo), como control negativo no se incubó con el extracto nuclear, se lavó con TBS. Se incubó 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-acetil-lisina (Millipore) a una dilución 1:250 en la solución H-A, se lavó con la solución H-B (ver anexo); se incubó 30 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado (Millipore) con HPR en la solución H-A (ver anexo), se lavó con la solución H-B (ver anexo), y posteriormente con la TBS; se agregó la mezcla del sustrato TMB (ver anexo) y se incubó por 10 min al resguardo de la luz a temperatura ambiente, para detener la reacción se agregó 1M de ácido sulfúrico recién preparado. Las absorbencias fueron determinadas utilizando un lector de placas de ELISA a las longitudes de onda de 450 y 595 nm.

3.8.1. Obtención de extracto nuclear

Las células HeLa fueron recuperadas del medio de cultivo celular por centrifugación, por 10 min a 2000 rpm. La pastilla celular fue resuspendida en 5 volúmenes de PBS 1X a 4°C y colectadas por centrifugación, como se detalla anteriormente; los pasos consecutivos se llevaron a cabo a 4°C. Las células fueron resuspendidas en 5 volúmenes de amortiguador A (ver anexo) y se dejó reposar por 10 min. Las células fueron colectadas por centrifugación como antes se menciona y se resuspendieron en dos volúmenes de pastilla celular de amortiguador A y lisadas con la ayuda de perlas de vidrio. El lisado se centrifugó por 10 min a 2000 rpm para recuperar la pastilla conteniendo los núcleos celulares. El sobrenadante fue cuidadosamente decantado y mezclado con 0.11

volúmenes de buffer B (ver anexo) y centrifugado a 28100 rpm. Para remover el citoplasma residual, la pastilla obtenida se volvió a centrifugar por 20 min a 14450 rpm, a esta pastilla se llamó núcleo crudo. Este núcleo crudo se resuspendió en 3 ml de amortiguador C (ver anexo) por cada 10^9 células y se homogenizó con la ayuda de perlas de vidrio. La suspensión resultante se mezcló suavemente con agitación magnética por 30 min y se centrifugó por 30 min a 14450 rpm el sobrenadante claro obtenido fue dializado contra 50 volúmenes de amortiguador D (ver anexo) por 5 h. La muestra dializada fue centrifugada a 14450 rpm por 20 min y el precipitado resultante fue descartado. El sobrenadante, llamado extracto nuclear, se almacenó en alícuotas a -80°C .

3.9. Análisis de estadístico

Para conocer las diferencias significativas de nuestros análisis se utilizó un análisis de varianza de una vía (one way ANOVA) con un límite de confianza de 95% usando el programa Statplus 2008.

IV. RESULTADOS

4.1. Identificación de la proteína tipo lunasin en grano maduro

De las extracciones proteínicas obtenidas de la harina del grano maduro de amaranto se realizaron Westerns blots y se trabajó con las fracciones de albúminas, globulinas 11S y glutelinas, por ser las que contenían mayor concentración de lunasin. Para el Western blot se utilizó el anticuerpo primario de conejo Anti-Lunasin de soya denominado R1 P4-43, producido contra la secuencia completa del péptido (43 aminoácidos). El Western blot de estas fracciones mostró una banda de aproximadamente 20 kDa (Figura 4b), como control positivo se cargaron 200 ng de lunasin sintético (Figura 4, carril L).

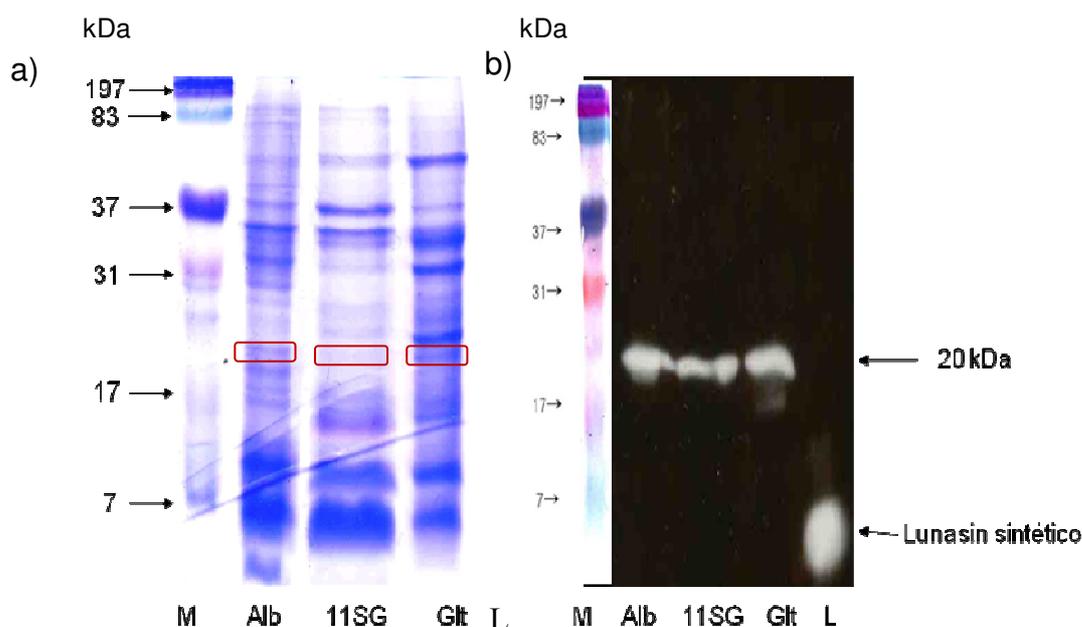


Figura 4. a) Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie y b) Western blot de las fracciones proteínicas del grano de amaranto. M=marcador preteñido, Alb=albúminas; 11SG=globulinas 11S; Glt=glutelinas; L=estándar de lunasin sintético. Para el western blot se utilizaron los anticuerpos R1 P4-43 de conejo y como anticuerpo secundario el anti-IgG de conejo acoplado a un péptido de peroxidasa.

En la fracción de glutelinas se observó una segunda banda de un peso inferior a los 20 kDa, lo que podría indicar que se encuentra otra proteína que sea reconocida por el anticuerpo anti-lunasin o que se deba a una degradación de la proteína original ya que el medio con el cual se extrae esta fracción proteínica genera un medio muy inestable para las proteínas por su pH elevado (pH 13).

Se decidió trabajar con la fracción de globulinas 11S ya que presentaban una buena concentración de lunasin con respecto al de las fracciones y este tipo de proteínas presenta una buena estabilidad en soluciones salinas a pH neutro. Las globulinas 11S fueron separadas en geles en dos dimensiones (2-D), en la primera dimensión se utilizaron tiras de 11 cm. de largo con un rango amplio de pH (3-10 NL). La segunda dimensión se efectuó en geles al 12 % de acrilamida (Figura 5a), los geles resultantes fueron transferidos a membranas de polivinilpolipirrolidona (PVPP). El Western blot mostró una banda de mayor intensidad y varias bandas que dan una señal baja las cuales 2 tienen el mismo peso molecular pero diferente punto isoeléctrico (Figura 5b). Para definir si estas manchas correspondían a uniones inespecíficas o a la detección de otras proteínas con un epítipo de reacción cruzada con el anticuerpo anti-lunasin de soya, se cerró el rango de pH de las tiras de 7-10, con la misma longitud (Figura 5c), ya que las manchas observadas se encontraron dentro de este rango; y se realizó nuevamente un Western blot. En este rango cerrado (pH 7-10) se logró mejorar la separación de las proteínas así como su resolución observándose la presencia de una sola mancha con peso molecular (20 kDa) y punto isoeléctrico (pI) de 9 (Figura 5d).

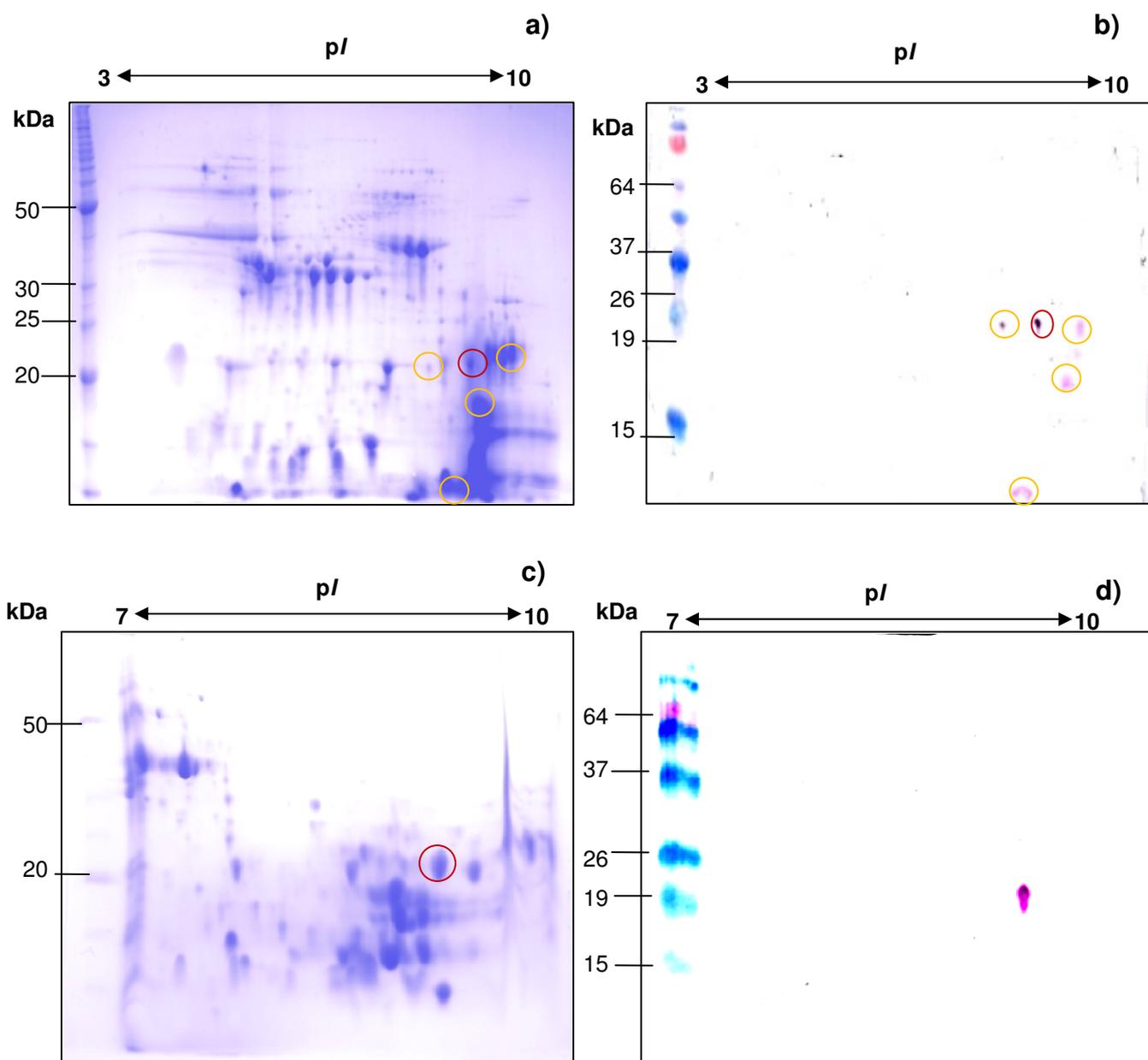


Figura 5. Geles 2-D y Western Blot de las globulinas 11S de amaranto. Las tiras utilizadas fueron de 11cm de longitud con rango de pH de 3-10 (a) y 7-10 (c). El gel fue teñido con azul de Coomassie y para el Western blot se utilizaron los anticuerpos R1 P4-43 y un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina.

4.2. Identificación de la proteína tipo lunasin en otros tejidos de planta

La presencia de la proteína tipo lunasin en hojas, tallo, raíz, semilla inmadura y madura de extractos de proteínas totales se rastreó a través del análisis Western blot. En proteínas totales se encontró el lunasin con un peso molecular de 60 kDa. Se utilizó como estándar las albúminas de soya en donde se encuentra un precursor no procesado de lunasin de 50 kDa, albúmina 2S (Figura 5).

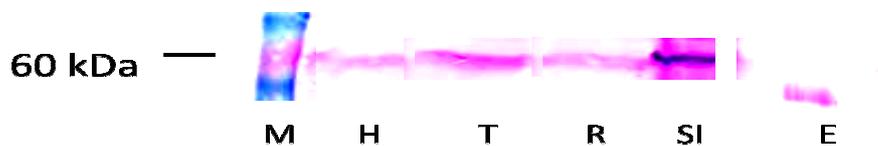


Figura 6. Western blot de las proteínas totales de tejidos de la planta de amaranto. M=marcador preteñido, proteínas totales de: H=hoja, T= tallo, R=raíz, SI=semilla inmadura y E=la fracción de albuminas de soya.

4.3. Ensayo de internalización de la proteína tipo lunasin de amaranto en células NIH 3T3

Para demostrar que la proteína tipo lunasin de amaranto ejerce su acción directamente en el núcleo celular de células vivas se realizó el ensayo de internalización se pudo observar que cuando las células son expuestas durante 3 y 6 h a la proteína tipo lunasin de amaranto esta se encuentra difusa fuera de la célula o en muy pocas cantidades en el citoplasma (Figura 7a, 3 y 6 h), con un exposición de 9 h la proteína se encuentra en una concentración muy elevada en el citoplasma pero como se ve en la Figura 7a, 9h, aun no se encuentra completamente en el núcleo. Con una exposición de 12 h se observó claramente que esta proteína se encuentra casi en su mayoría dentro del núcleo celular

(Figura 7a, 12 h), se logró observar regiones dentro del núcleo que contienen una mayor concentración de lunasin (Figura 7b), lo que indica que la proteína tipo lunasin de amaranto se dirige a regiones específicas de la cromatina como la heterocromatina, donde sus histonas se encuentran hipoacetiladas y puede ejercer su acción protectora, esta teoría se reafirma al hacer una comparación con los núcleos marcados con el compuesto DAPI, ya que estos muestran el mismo patrón de punteo debido a que en la heterocromatina se encuentra una mayor concentración de ADN.

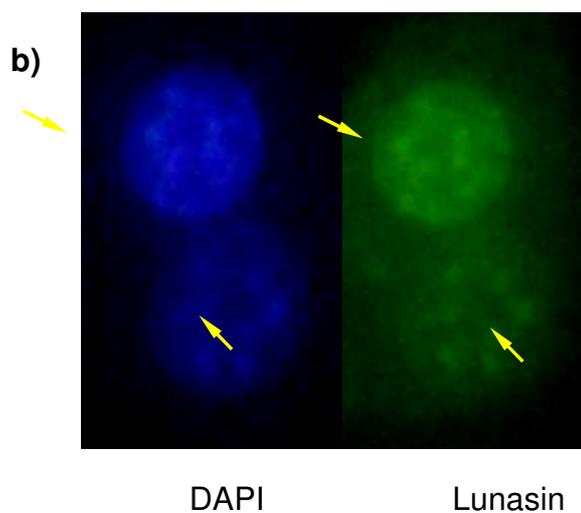
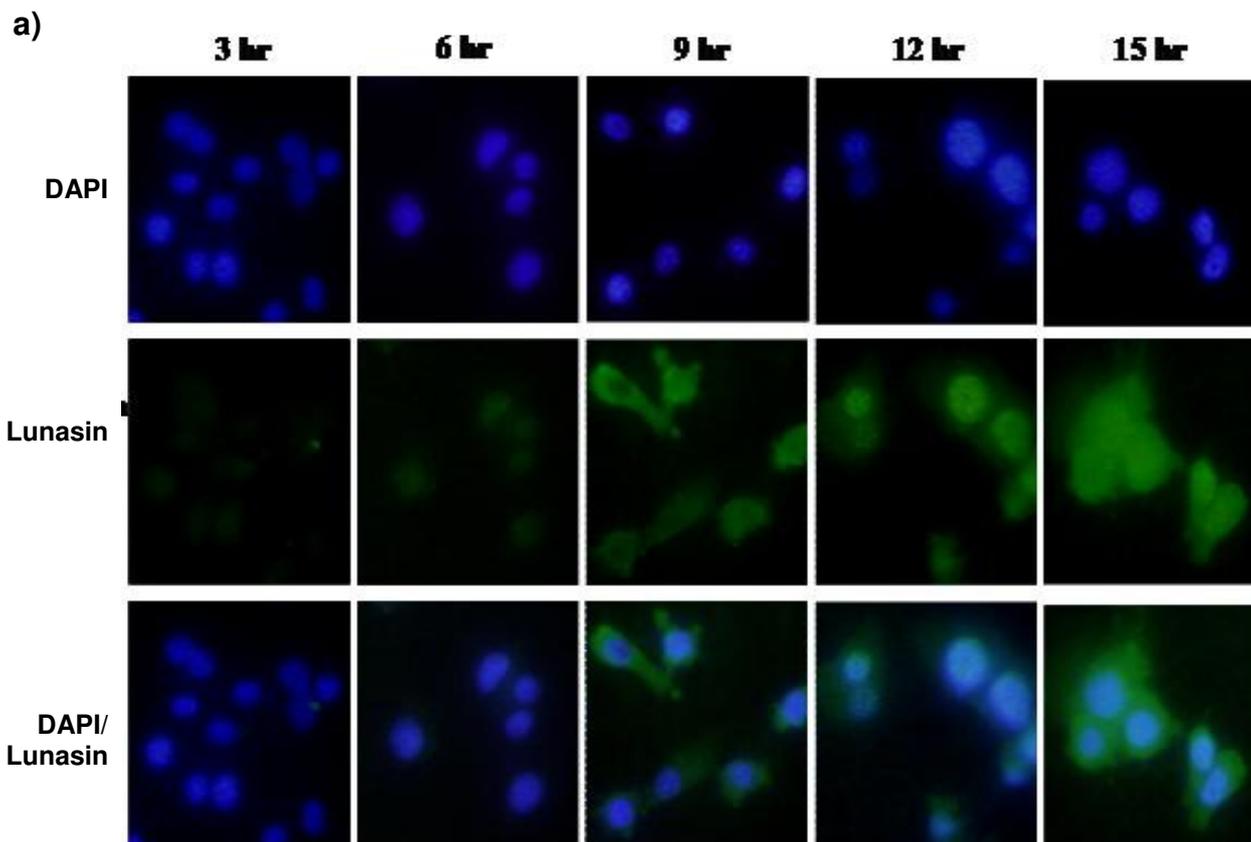


Figura 7. Ensayo de internalización del lunasin de amaranto. Las células NIH 3T3 fueron tratadas bajo diferentes tiempos con las globulinas 11S de amaranto, para marcar los núcleos se utilizó el compuesto DAPI y para marcar el lunasin de amaranto se usaron los anticuerpos R1 P4-43 y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. Se muestran en detalle los núcleos de dos células en donde se marca con flechas amarillas las regiones con mayor emisión de fluorescencia de los compuestos DAPI y FITC.

4.4. Purificación de la proteína tipo lunasin de amaranto

Al purificar la proteína tipo lunasin del grano de amaranto se observó una banda con un peso molecular ligeramente más elevado (22 kDa) al observado en los extractos proteínicos. Para finalizar la identificación de la proteína se realizó un Western blot en el que se observó una banda con peso similar al observado en el gel teñido con azul de Coomassie (Figura 8).

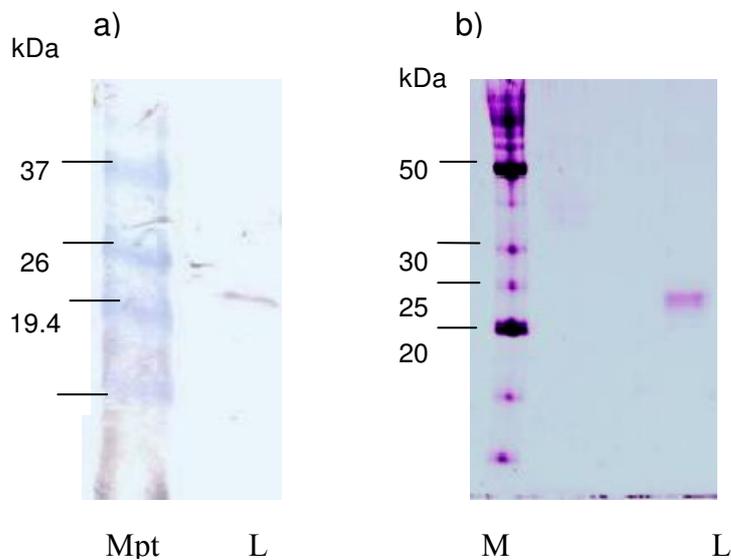


Figura 8. a) Western blot y b) gel de acrilamida (SDS-PAGE) de la proteína tipo lunasin de amaranto purificada. L=Lunasin purificado, Mpt=marcadores de peso molecular preteñido y M=marcador Bench Mark.

4.5. Ensayo de la reducción de la acetilación de Histonas H₃ y H₄

Para corroborar que la proteína tipo lunasin de amaranto ejerce una acción protectora sobre la acetilación de las histonas hipoacetiladas y así ejercer su acción quimioprotectora se realizó un ensayo de inhibición de la acetilación de Histonas se utilizó la fracción de globulinas 11S, en las que los péptidos de histonas fueron tratados con las concentraciones de 25 y 50 μg del extracto

proteínico y se usó como control el péptido sintético de lunasin de soya. La reducción de la acetilación de Histonas H₄, con el tratamiento de extracto proteínico, respecto al control positivo fue de 20 y 40% con 25 y 50 µg, respectivamente (Figura 9a y 9b). Para el caso de reducción de la acetilación de Histonas H₃ se observó una reducción del 27.16 y 55.55% para 25 y 50 µg de tratamiento con el extracto. Lo que nos indicó que podría estar presente una proteína o proteínas que inhibe la acetilación de estas histonas. Así que una vez purificado la proteína tipo lunasin se realizó el mismo experimento ahora utilizando diferentes concentraciones de lunasin (Figura 9c y 9d), en el que se observó una tendencia a la disminución en la acetilación de las histonas directamente con el aumento de la concentración de proteína. A una concentración de 1µM, se redujo la acetilación hasta un 77% y un 70% en las histonas H₃ y H₄, respectivamente, superando la inhibición de la acetilación de histonas observado en el extracto proteínico de las globulinas 11S, esto debido a la concentración de la proteína lunasin responsable de la actividad. Lo que indicó que el mecanismo de acción de esta proteína está relacionado a ciertas regiones de la heterocromatina (histonas hipoacetiladas) donde se encuentran silenciados genes activadores de la mitosis. ya que evita que genes participantes de la fase S (duplicación del DNA en la mitosis) sean transcritos, como por ejemplo los regulados por el promotor E2F, ya que en un estado normal la célula éstos se transcriben a tasas muy bajas; y al ocurrir un evento de transformación cancerosa en una célula los mecanismos de acetilación/desacetilación se encuentran desregulados y las histonas hipoacetiladas presentes en regiones compactadas el DNA (heterocromatina) son

acetiladas neutralizando su carga (positiva) esto a su vez hace que pierdan su afinidad por el DNA (negativa) relajándose exponiendo algunos genes, como los antes mencionados (Struhl 1998).

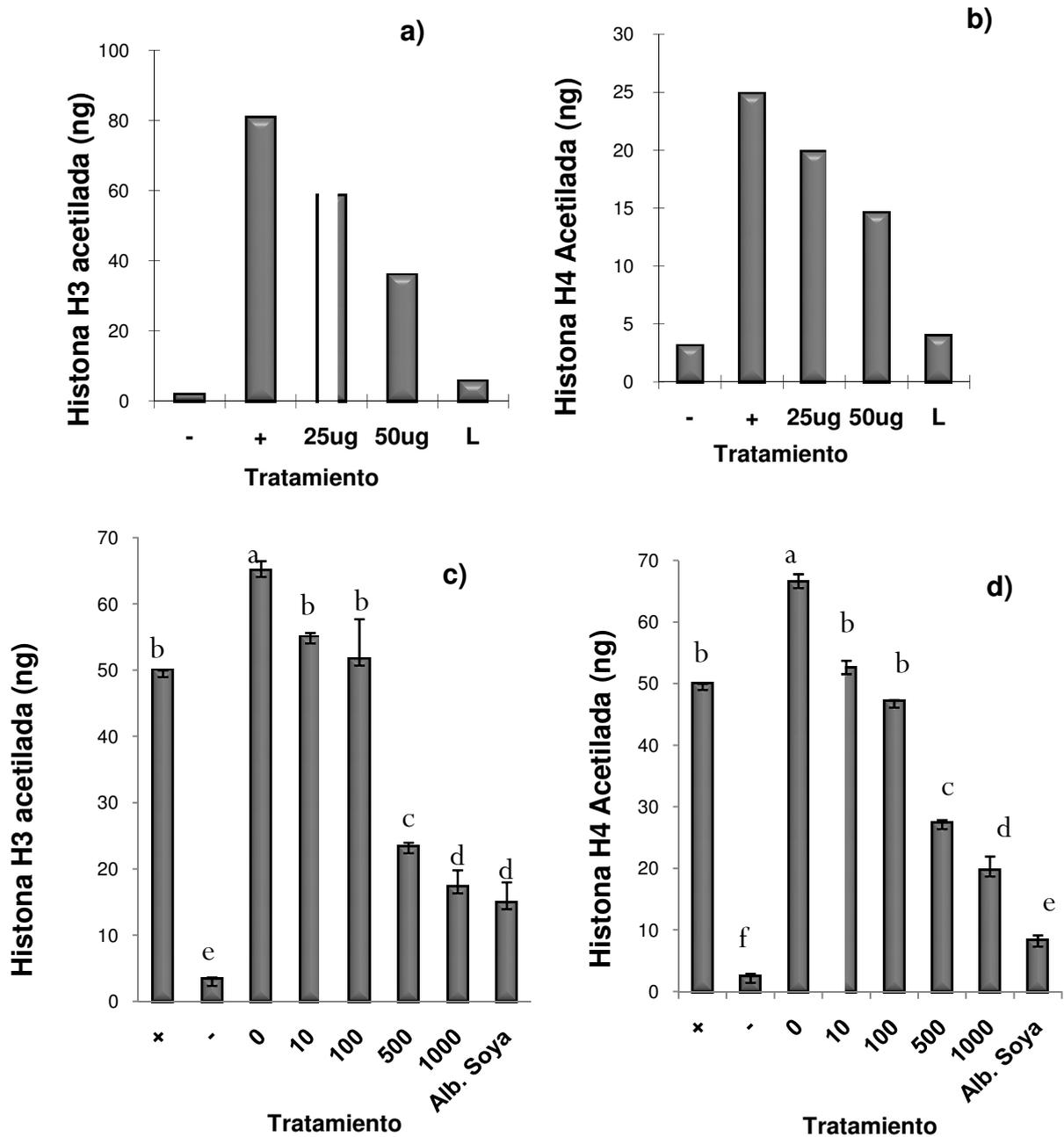


Figura 9. Ensayo de inhibición de la acetilación de histonas. Para este ensayo se utilizaron histonas H3 (a y c) y H4 (b y d) desacetiladas. Para los tratamientos con el extracto de globulinas 11S se probaron 25 y 50 μ g de proteína y se usó como tratamiento

de referencia el péptido lunasin sintético. En el tratamiento con la proteína tipo lunasin de amaranto se usaron diferentes concentraciones (0, 10, 100, 500 y 1000 nM) señaladas en la grafica con los valores absolutos y se uso como tratamiento de referencia extracto de albuminas de soya. Para ambos tipos de tratamiento se usaron como control positivo histonas acetiladas a concentraciones conocidas y como control negativo las histonas desacetiladas sin la incubación con la enzima correspondiente. Las barras indican la desviación estándar de los triplicados y las letras indican las diferencias significativas determinadas por una prueba ANOVA un paso ($p < 0.5$).

4.6. Reducción de la fosforilación de la proteína del Retinoblastoma

En el ensayo de la inhibición de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma se observó que las células en el tratadas con el químico 3-MCA la proteína Rb (110 kDa) que la banda correspondiente a la proteína Rb presentaba una mayor señal al teñir el gel con la tinción especial para fosfoproteínas, que el resto de los tratamientos, posteriormente el gel fue lavado y vuelto a teñir con Sypro para la tinción de proteínas totales (Figura 10). En el análisis por densitometría óptica (Tabla 3); muestra más claramente como al incrementar la concentración de lunasin reduce la fosforilación o intensidad de las bandas, a una concentración de 100 nM. Esto nos indica que el lunasin de amaranto ejerce una acción inhibitoria en la fosforilación de Rb. Esta evidencia es importante para ampliar la comprensión del mecanismo de acción de la proteína tipo lunasin de amaranto y en general de este tipo de proteínas ya que nos indica que su acción quimioprotectora no se debe únicamente a la interacción inespecífica a las Histonas hipoacetiladas de la cromatina (Wilson y cols. 1990) sino que interviene en otras proteínas nucleares como podría ser la proteína Rb o las cinasas que la fosforilan.

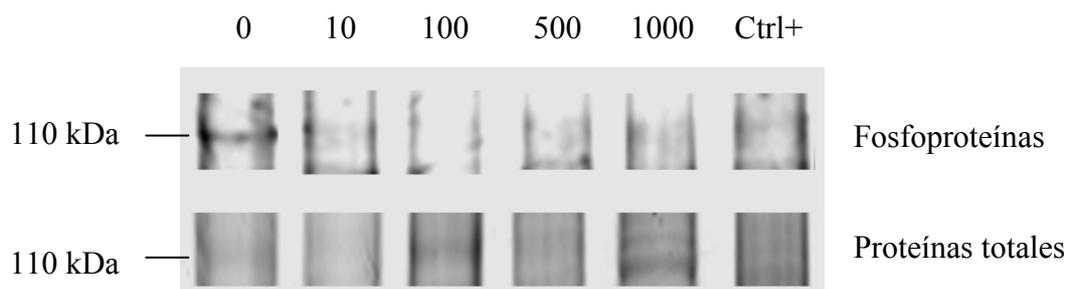


Figura 10. Fosforilación de la proteína Rb. Gel SDS-PAGE de proteínas totales de los cultivos celulares NIH 3T3 teñido con Sypro Rubi para proteínas totales y con la tinción Pro-Q-Diamond para fosfoproteínas. M=marcador, los números indicados corresponden a la concentración de lunasin en el tratamiento de 0 a 1000 nM. Control positivo (Ctrl +) células sin tratamiento.

Tabla 3. Análisis por densidad óptica de las bandas de la proteína Rb.

Tratamiento (nM)	Pro-Q-Diamond. Intensidad de banda (pix)	Sypro Rubi. Intensidad de banda (pix)
0	157	192
10	110	192
100	87	192
500	89	192
1000	82	192
Acetona	101	192

4.7. Disminución de la formación de colonias transformadas con 3-MCA

Con la finalidad de comprobar la acción cáncer-preventiva de la proteína tipo lunasin de amaranto se diseñó un experimento tentativo para analizar la disminución de la formación de colonias en donde se observó una disminución en el número de colonias a las concentraciones de 500 y 1000 nM en los pozos de cultivo en las células NIH 3T3 tratadas con 3-MCA y con el tratamiento de 1 μ M de

lunasin sin el agente químico 3-MCA, con respecto las células con tratamiento, control positivo (Figura 11). Lo que nos indica que la proteína tipo lunasin induce una disminución en la tasa de división celular en las células NIH 3T3 recién transformadas con el químico 3-MCA y que a altas concentraciones de lunasin de amaranto (1 μ M) este puede provocar una disminución en la mitosis celular en fibroblastos de ratón (NIH 3T3).

Estos resultados indican que la proteína tiene un mecanismo de acción, similar al reportado el lunasin de diversos granos como soya, trigo, cebada, etc. (Hernández y de Lumen 2008), y que induce una apoptosis en las células recién transformadas al provocar una desregulación en la dinámica de acetilación-desacetilación en este tipo de células.

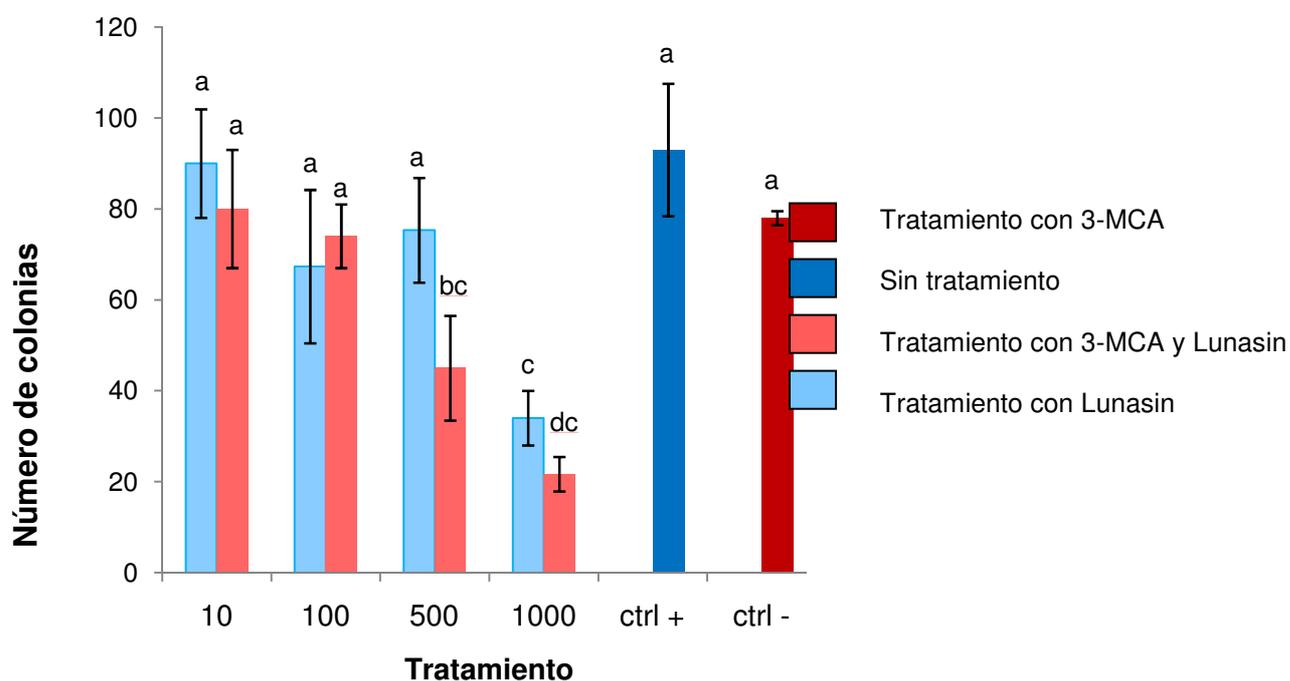


Figura 11. Disminución de la formación de colonias. Grafica de los tratamientos de de lunasin de amaranto con (barras rojas) o sin (barras azules) 3-MCA. Los números

representan la concentración del tratamiento a 10, 100, 500 y 1000 nM (d). El positivo (Ctrl +) son células sin tratamiento y el control negativo (Ctrl -) son células tratadas con 3-MCA sin lunasin. Las barras indican la desviación estándar de los triplicados y las letras indican las diferencias significativas determinadas por una prueba ANOVA un paso ($p < 0.5$).

Otro dato interesante es que al observar al microscopio las células teñidas con giemsa se observó que en los cultivos que fueron tratados con la concentración de 1 μ M lunasin de amaranto, control con acetona y control con el amortiguador, el crecimiento de las colonias fue regular y las células tenían una uniformidad de tamaño y forma; en el cultivo tratado con 3-MCA y se observaron células con núcleos agrandados así como un mayor volumen de su citoplasma e irregularidad en la distribución de las células, incidencia de este tipo de células disminuía conforme aumentaba la concentración de lunasin de amaranto en el tratamiento. Lo que nos indica que las células sufrieron anomalías morfológicas debido a la transformación generada por el 3-MCA; al mismo tiempo nos indica que la proteína tipo lunasin de amaranto protege a los fibroblastos y genera apoptosis en células recientemente transformadas (Figura 12).

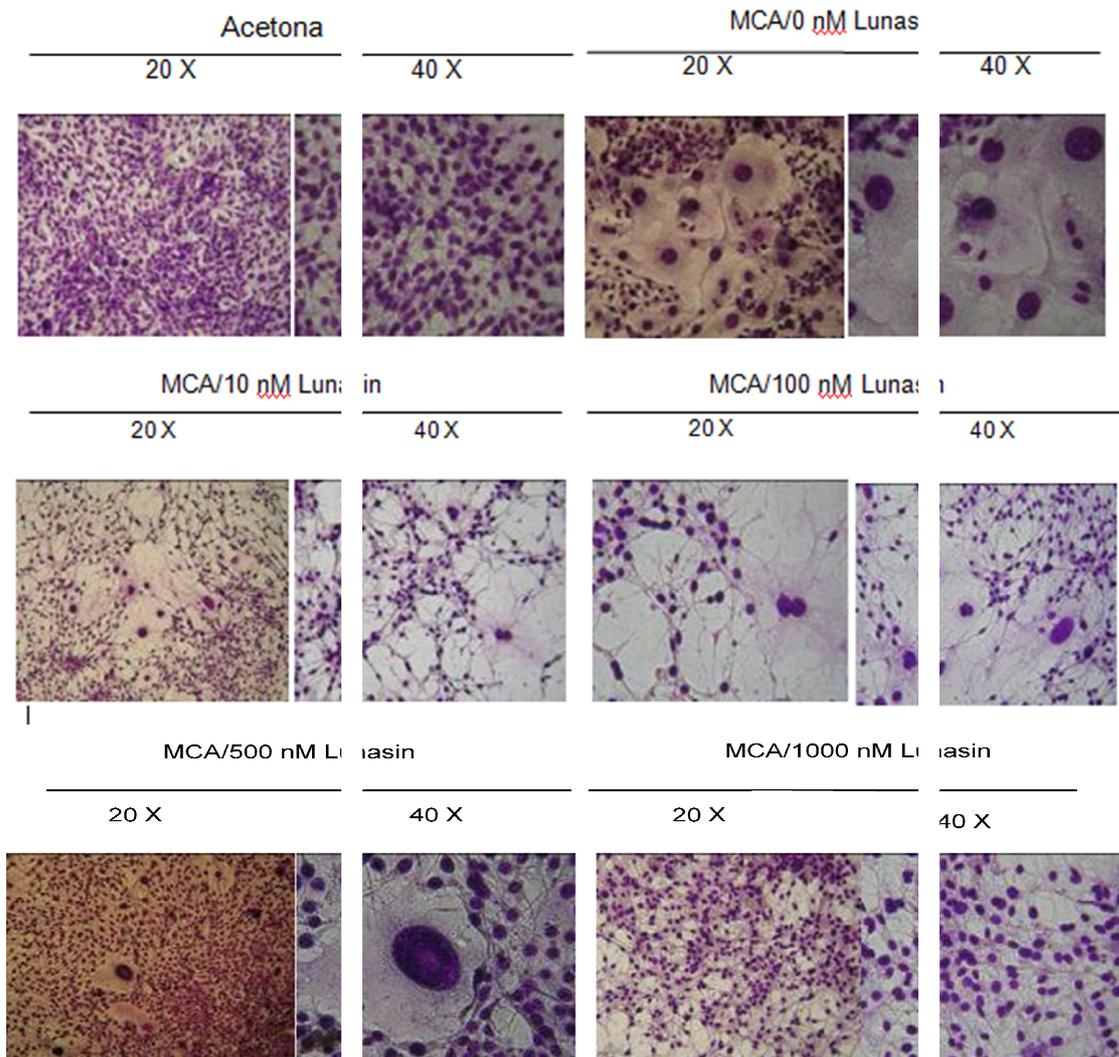


Figura 12. Disminución de la formación de colonias en la línea celular NIH3T3. Imágenes de los cultivos que muestran los tratamientos con acetona (a y b), MCA sin tratamiento con lunasin (c y d); tratamientos con lunasin de amaranto a concentraciones de 10 (e y f), 100 (g y h), 500 (i y j) y 1000 nM (k y l). Las células fueron fijadas con metanol y teñidas con giemsa al 0.25% y tomadas con una cámara digital acoplada a un microscopio óptico.

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo caracterizamos la bioactividad de una proteína que comparte propiedades tanto funcionales como de secuencia con el péptido lunasin encontrado en otros granos como soya, trigo, plantas de la familia *Solanum*, pimienta, cebada (Hernández - Ledesma y de Lumen 2008). Sin embargo, la principal diferencia entre la proteína tipo lunasin de amaranto y el resto de las proteínas lunasin reportadas es su tamaño, la proteína tipo lunasin en amaranto tiene un peso de 20 kDa, mientras que en las otras semillas se ha encontrado en un peso de alrededor de 5 kDa (Jeong y cols. 2002, Jeong y cols. 2007b, Jeong y col. 2007, Kwon y cols. 2005). La evidencia hasta ahora recabada de la proteína lunasin de amaranto nos indica que ésta tiene posiblemente funciones y actividades similares a las reportadas en los demás casos de las caracterizaciones del péptido lunasin; ya que el lunasin de amaranto se observó que se internaliza en fibroblastos de ratón de la misma manera que el lunasin de soya, con la diferencia de que el lunasin de amaranto se localiza completamente en el núcleo celular a las 12 h de exposición en comparación con las 20 h reportadas para soya, tabaco cimarrón, y trigo (Gálvez y de Lumen 1999, Jeong y col. 2007, Jeong y cols. 2007b). Esta rapidez en la internalización aún no ha sido explicada en los trabajos hasta ahora reportados. Sin embargo queda por estudiar él como una proteína de 20 kDa logra internalizarse en la célula y dirigirse preferencialmente al núcleo y si esta acción es célula o tejido específico. Por otro lado, con la finalidad de investigar los posibles mecanismos de acción del lunasin analizamos, si la proteína ejercía un efectos sobre la acetilación de las Histonas H₃ y H₄, y

mostramos que la proteína tipo lunasin de amaranto reduce hasta un 70% y 77% de las Histonas H₃ y H₄, estos datos son equiparables a los reportados en soya: 75% de reducción en ambas histonas (Jeong y cols. 2007a), cebada: 78% en histonas H₃ y 73 % en Histonas H₄ (Jeong y cols. 2002) y en el caso de trigo este reduce la acetilación de histonas en un 49.6% para H₃ y en un 50.8% para H₄ (Jeong y cols. 2007b). Para dilucidar el papel clave que podría jugar la proteína tipo lunasin de amaranto como agente anticancerígeno de origen natural investigamos si ésta proteína modifica el estado de fosforilación de la proteína del retinoblastoma ya que ésta regula el estado proliferativo de células. Se ha reportado que los péptidos lunasin de soya (De Lumen 2005) y en tabaco cimarrón (Jeong y cols. 2007) inhiben la fosforilación de la proteína Rb, la cual juega un papel crucial en la regulación del ciclo celular, funcionando como un “freno” en la proliferación, y esta es afectada principalmente cuando ocurre un evento de transformación celular, ya que oncogenes como el E1A generan una fosforilación de la proteína Rb y desregulan el ciclo celular generando células cancerosas (Riley y cols. 1994, Weinberg y cols. 1995); para este fin descubrimos que el tratamiento con la proteína tipo lunasin de amaranto inhibe que la proteína Rb sea fosforilada aún en la concentración de 10 nM (concentración mínima probada), lo que amplía la hipótesis que explica que la acción cáncer-preventiva del péptido lunasin se debe a la interacción con las histonas hipoacetiladas evitando la exposición a la transcripción de protooncogenes (Struhl 1998); sino que también evita la inactivación de un regulador crucial en la maquinaria de la mitosis. Aun falta por dilucidar el nivel celular en el cual estas proteínas ejercen esta acción: ya sea interactuando con las cinasas, inactivándolas en su actividad o, protegiendo

de la fosforilación al interactuar directamente con la proteína Rb. Finalmente se probó el efecto de la proteína lunasin sobre células que habían sido expuestas a un químico cancerígeno como es el caso del 3-MCA y se observó que esta proteína ejerce un retraso en el crecimiento de las células que habían sido expuestas al 3-MCA y a altas concentraciones de lunasin de amaranto (1000 nM); lo que concuerda con los reportes que mencionan que el péptido lunasin de soya disminuye la formación de colonias de células transformadas con oncogenes de virus, E1A (Gálvez y cols. 2001).

VI. CONCLUSIONES

La evidencia hasta ahora reportada del péptido lunasin nos indica que este ejerce un papel crucial en el desarrollo de las semillas al provocar un arresto celular en una de las fases de formación del grano y que este mecanismo posiblemente es el que le confiere su capacidad de protección antiproliferativa en células transformadas de mamífero; y surge la hipótesis que este péptido o proteínas con la misma acción deben estar presentes en todas las plantas con semilla. La información recabada en el presente trabajo nos indica que la proteína tipo lunasin identificada originalmente por Silva-Sánchez y cols. (2008) es la proteína tipo lunasin que ejerce la misma acción en el grano de amaranto. El amaranto es un grano con un excelente potencial para su explotación debido a su alto valor nutricional y sus propiedades nutraceuticas. Un punto importante en el estudio de estas proteínas es que representan una fuente natural de agentes cáncer-preventivos, que subsecuentemente podrían llegar a ser fármacos utilizados en la lucha contra el cáncer. Para estos fines habrá que indagar más a detalle en los mecanismos moleculares con los que estas proteínas provocan su acción antiproliferativa, tanto endógenamente en el grano como en las células de mamífero expuestas a su presencia.

VII REFERENCIAS

- Bewley J. D. "Seed Germination and Dormancy" *The Plant Cell*. **1997**, 9: 1055-1066.
- De Lumen B. O., "Lunasin: A Cancer-Preventive Soy Peptide", *Nutrition Reviews*, **2005**, 63: 16-21.
- Galvez A. F., Chen N., Macasieb J., De Lumen B. O., "Chemopreventive Property of a Soybean Peptide (Lunasin) That Binds to Deacetylated Histones and Inhibits Acetylation" *Cancer Research*, **2001**,61: 7473–7478.
- Gálvez A. F., De Lumen B. O. "A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells" *Nature biotech*, **1999**, 17 (5): 495-500.
- Gonzalez de Mejia E., Vásconez M., De Lumen B. O., Nelson R., "Lunasin Concentration in Different Soybean Genotypes, commercial Soy Protein and Isoflavone Products" *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 5882-5887.
- Hernández-Ledesma B., De Lumen B. O. "Lunasin: A Novel Cancer Preventive Seed Peptide" *Perspectives in Medicinal Chemistry* **2008**, 2: 75–80.
- Hurkman W. J., Tanaka C. K, "Solubilisation of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis" *Plant Physiol*, **1986**, 81: 802-806.
- Jeong H. J., Lam Y, De Lumen B. O., "Barley lunasin suppresses *ras*-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells" *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 5903-5908.
- Jeong H. J., Jeong J. B., Kim D. S.,De Lumen B. O. "Inhibition of core histone acetylation by the cancer preventive peptide lunasin" *J. Agric. Food Chem.* **2007a**, 55, 632-637.
- Jeong H. J., Jeong J. B., Kim D. S., Park J. H., Lee J. B., Kweon D. H., Chung G. Y., Seo E. W., De Lumen B. O., "The cancer preventive

peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation" *Cancer Letters*. **2007b**, 255 42–48.

- Jeong J. B, Jeong H. J., Park J. H., Lee S. H., Lee J. R., Lee H. K., Chung G. Y., Doo Choi J. D., De Lumen B. O. "Cancer-Preventive Peptide Lunasin from *Solanum nigrum* L. Inhibits Acetylation of Core Histones H3 and H4 and Phosphorylation of Retinoblastoma Protein (Rb)" *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55 (26)
- Kim, H. K., Kim, M. J., Cho, H.Y., Kim, E.-U., Shin, D.-H. "Antioxidative and anti-diabetic effects of amaranth (*Amaranthus esculantus*) in streptozotocin-induced diabetic rats". *Cell Biochemistry and Function*, **2006b**, 24: 195 – 199.
- Kim, H. K., Kim, M. J., Shin, D. H. Improvement of lipid profile by Amaranth (*Amaranthus esculantus*) supplementation in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Ann. Nutr. Metab.* **2006a**. 50: 277-281.
- Kwon K. S., Park J. H., Kim D. S, Jeong J. B., Sim Y. E., Kim M. S., Lee H. K. , Chung G. Y., Jeong H. J. "Antioxidant Activity and Identification of Lunasin Peptide as an Anticancer Peptide on Growing Period and Parts in Pepper" *Korean journal of life science*, **2005**, 15 (4): 528-535.
- Pierce Biotechnology, Inc, "Purify proteins from polyacrylamide gels" *TECHNICAL RESOURCE*, **2004**, 9: 1-2.
- Riley, D. J., Lee, E. Y., Lee, W. H., "The retinoblastoma protein: More than a tumor suppressor". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1994**, 10, 1–29.
- Silva-Sánchez C., A. P. Barba de la rosa, M. F. León-Galván, B. O. De lumen, A. De León-Rodríguez, E. González de Mejía, "Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed" *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 1233–1240.
- Struhl K., "Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms" *genes & development*, **1998**, 12:599–606.
- Yanes G. A., Messinger J. K., Walker C. E., Rupnow J. H. "Amaranthus Hypochondriacus: Starch isolation and partial characterization". **1986**, 63(3): 273-276.

- Weinberg, R. A. "The retinoblastoma protein and cell cycle control". *Cell* **1995**, *81*, 323–330.
- Wilson W. D., Tanious F. A., Barton H. J., Jones R. L., Fox K., Wydra R. L., Strekowskit L."DNA Sequence Dependent Binding Modes of 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)" *Biochemistry* **1990**, *29*, 8452-8461.

ANEXO

A. Extracción de fracciones proteínicas del grano de amaranto maduro

- **Tabla 4. Soluciones para la extracción de las fracciones proteínicas.**

Fracción proteínica	Solución de extracción
Albuminas	Agua
Globulinas 7S	0.1 M NaCl, 10 mM K ₂ PO ₄ , 1 mM EDTA pH 7.5
Globulinas 11S	0.8 M NaCl, 10 mM K ₂ PO ₄ , 1 mM EDTA pH 7.5
Prolaminas	70% etanol
Glutaminas	0.1 M NaOH

B. Extracción de proteínas de hoja.

- Solución TCA-A: 10% de TCA, 2% de β -ME y 1% de PVPP
- Solución A: 0.007% de β -ME en acetona

C. Extracción de proteínas de tallo.

- Buffer de extracción: 500 mM tris-HCl, 50 mM EDTA, 700 mM sacarosa, 100 mM KCl y ajustado a pH 8.0 con HCl
- Solución de precipitación: 0,1 M de acetato de amonio disuelto en metanol frío

D. Extracción de proteínas de raíz.

- Solución de extracción: 40 mM tris, 1% PVPP, 10 mM EDTA, 1mM PMSF.
- Solución TCA-T: 10% TCA, 2% β -ME en acetona fría.

E. Purificación de la proteína lunasin de amaranto

- Solución de elusión: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA; pH 7.5.

F. Electroforesis SDS-PAGE 2-D

- Solución de rehidratación: 8 M urea, 2% CHAPS, 1% azul de bromofenol, 50 mM ditioneitol (DTT), 0.5% anfolitos (pH 3-10 ó 6-11 en el caso de las tiras de rango de pH 7-10). Las tiras (11 cm) se rehidratan con 250 µL de muestra a concentraciones de 1-2 mg/ml, toda la noche a temperatura ambiente.

Tabla. Programación del equipo Ettan IPGphor

Paso	Modo de voltaje	de Voltaje máximo	Voltz-Hora (kVh)	
			pH 3-10 NL	pH 7-10
1	Gradiente	500	0.01	0.01
2	Gradiente	4000	3.4	3.4
3	Gradiente	8000	13.5	8.5

Después de haber corrido las muestras estas se corrieron en la segunda dimisión o se almacenaron a -20 °C

- Solución de equilibrio SDS: 6 M urea, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 2% SDS, 30% glicerol, 0.002% azul de bromofenol, 2% (w/v) DTT. Las tiras se equilibraron con la solución de equilibrio SDS por 15 min. en agitación constante.

G. Tinción con azul brillante de Coomassie

- Colorante azul de coomassie: 45% metanol, 10% ácido acético y 0.25% azul de coomassie R-250.

H. Tinción con Sypro Rubi

- Solución de fijado: 50% metanol, 10 % ácido acético.
- Solución de desteñido: 10% metanol, 7% ácido acético.

I. Tinción con pro Diamond para fosfoproteínas

- Solución de fijado: 50% metanol, 10% ácido acético.
- Solución de desteñido: 20% acetonitrilo, 50 mM acetato de sodio pH.

J. Western blot

- Buffer de transferencia Towin: 25 mM tris, 192 mM glicina, 20% metanol.

- Solución 1% TBS-T: 1% tween-20, 500mM NaCl, 20 mM tris.
- Solución blotto A: 5% leche desengrasada en 1% TBS-T.
- Solución blotto B: 1% leche desengrasada en 1% TBS-T.
- Solución AP: 100 mM tris, 100 mM NaCl pH 9.5 y agregar al momento 50 mM MgCl₂.

K. Cultivos celulares

- PBS 1X: 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄ agregar 800 ml de agua miliQ, ajustar a pH 7.4 y ajustar volumen a 1L.

L. Formación de focos transformantes

- 3-MCA: disuelto en acetona, resguardar a la luz.
- Colorante Giemsa: 6% azul II-eosina, 1.6% azul II, 1:1 glicerina/alcohol metílico.

M. Inhibición de la fosforiación de la proteína Retinoblastoma (Rb).

- Buffer de lisis: 25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% triton x-100, 0.2 mM EDTA.

N. Ensayo de internalización.

- Solución FBS/PBS: 10% de Suero Bovino Fetal en PBS 1X.
- Solución L-A: 0.1% de saponina en PBS/FBS.

O. Ensayo de acetilación de histonas

- Cocktail de reacción HAT: para cada pozo, 10 µL 5X HAT assay buffer (upstate, millipore®), 10 µL 500 µM Acetyl-CoA (upstate, millipore®), 30 µL extracto nuclear.
- Solución H-A: 0.1% BSA, 0.05% tween-20 en TBS.
- Solución H-B: 0.05% tween-20 en TBS.
- Mezcla del sustrato TMB: mezcla 1:1 de reactivos A y B (upstate, millipore®).

P. Obtención de extracto nuclear

- Buffer A: 10m M HEPES pH 7.9 4°C, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DDT.
- Buffer B: 0.3 M HEPES pH 7.9, 1.4 KCl, 0.03 M MgCl₂.

- Buffer C: 20 mM HEPES pH 7.9, 25% glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT.
- Buffer D: 20 mM HEPES pH 7.9, 20% glycerol, 0.1 M KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT.