

**IPICYT**

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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

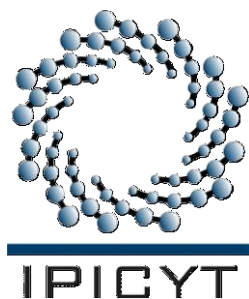
**Enfoque proteómico del análisis del efecto  
protector de la rutina y el lunasin de amaranto en  
células NIH3T3 químicamente transformadas**

Tesis que presenta  
**Jorge Luis Mazorra Carrillo**

Para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias en Biología Molecular**

Codirectores de la Tesis:  
**Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**  
**Dr. Antonio de León Rodríguez**

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2011



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Enfoque proteómico del análisis del efecto protector de la rutina y el lunasin de amaranto en células NIH3T3 químicamente transformadas**” presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Jorge Luis Mazorra Carrillo** y aprobada el **seis de Julio de 2011** 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. Ana Paulina Barba de la Rosa**  
Codirectora de la Tesis

---

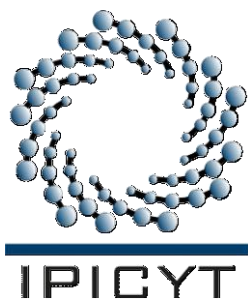
**Dr. Antonio de León Rodríguez**  
Codirector de la Tesis

---

**Dra. Martha Leticia Santos Martínez**  
Miembro del Comité Tutorial

---

**Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular y el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa y el Dr. Antonio de León Rodríguez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 090351.



# 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 086 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 2011, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado</b>	<b>Presidente</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. Antonio De León Rodríguez</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Jorge Luis Mazorra Carrillo**

sobre la Tesis intitulada:

*Enfoque proteómico del análisis del efecto protector de la rutina y el lunasin de amaranto en células NIH3T3 químicamente transformadas*

que se desarrolló bajo la dirección de

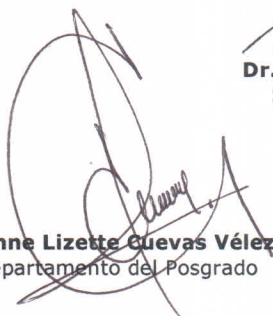
**Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**  
**Dr. Antonio De León Rodríguez**

El Jurado, después de deliberar, determinó

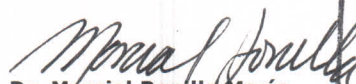
**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 13:30 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 días del mes de agosto de 2011.



**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado



**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



# Dedicatorias

A la vida, a mis padres, a mi familia...

## **Agradecimientos**

### **Enfoque proteómico del análisis del efecto protector de la rutina y el lunasin de amaranto en células NIH3T3 químicamente transformadas**

A mis directores de tesis, la Dra. Ana Paulina Barba y el Dr. Antonio de León, por compartir sus conocimientos, su disponibilidad, compromiso, apoyo y por asesorarme en este trabajo

A la Dra. Leticia Santos, la Dra. Teresita Paz y la Dra. Carmen González, por su valioso tiempo y comentarios para mejorar el escrito

A Alberto Barrera Pacheco por su apoyo técnico, su disponibilidad y su colaboración crucial en el análisis de espectrometría de masas

A Leandro Gabriel Ordoñez por su apoyo técnico y facilidades otorgadas

Al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera del INB-UNAM por la donación de las células NIH3T3

A mis amigos Arlette, Mabel, Luis, Berenice, Beatriz, Gema y mis demás compañeros de maestría generación 2009-2011-1

A todos los profesores de la división de Biología Molecular por su enseñanza

A mis compañeros del Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular y del Laboratorio de Biotecnología Molecular

A las muchachas del departamento escolar, Ivonne y Edith, por su disponibilidad y su amable atención en todo momento

A la Sra. Sonia por su apoyo brindado con el material del laboratorio

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada 090351 y al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnología, A.C.

Y finalmente, a todas las personas que se cruzaron en mi camino en mi estancia en San Luis Potosí, que me apoyaron en ciertos momentos, me brindaron alegrías y palabras de aliento... gracias

# Contenido

## Análisis proteómico del efecto protector de la rutina y el lunasin de amaranto en células NIH3T3 químicamente transformadas

	<b>Página</b>
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xii
1. Introducción	1
2. Materiales y métodos	3
2.1 Reactivos y células	3
2.2. Purificación de lunasin de amaranto	3
2.3. Identificación de lunasin de amaranto	3
2.4. Cultivo celular y tratamientos	4
2.5. Extracción de proteínas totales	5
2.6. Electroforesis bidimensional y análisis de imágenes 2-DE	5
2.7. Digestión en gel	6
2.8. Análisis de péptidos mediante espectrometría de masas	6
2.9. Identificación de proteínas	7
3. Resultados	8
3.1. Purificación de lunasin de semillas de amaranto	8
3.2. Supresión de la transformación inducida por 3-MCA en células NIH3T3 por la rutina y el lunasin de amaranto	8
3.3. Separación de las proteínas mediante 2-DE e identificación de manchas diferenciales	8
3.4. Efecto de la rutina y el lunasin sobre la expresión de proteínas en células NIH3T3 en contacto con 3-MCA	14
3.5 El tratamiento simultaneo de la rutina y el lunasin tiene un efecto sobre la expresión de proteínas distinto al mostrado cuando se emplean de manera individual	14
3.6. El 3-MCA modifica la expresión de proteínas cuando es puesto en contacto con células NIH3T3	14

4. Discusión	15
4.1. Proteínas nucleares	15
4.2. Proteínas co-localizadas en el núcleo y otros organelos	16
4.3. Proteínas del citoplasma	16
4.4. Proteínas co-localizadas en el citoplasma y otros organelos	17
4.5. Proteínas mitocondriales	18
4.6. Proteínas co-localizadas en el mitocondria y otros organelos	18
5. Conclusiones	19
6. Bibliografía	20
7. Material suplementario	24



## Lista de Tablas

	<b>Página</b>
Tabla 1. Tratamientos empleados en los cultivos de NIH3T3	4
Tabla S1. Proteínas identificadas en células NIH3T3 en respuesta al tratamiento con rutina	24
Tabla S2. Proteínas identificadas en células NIH3T3 en respuesta al tratamiento con rutina+3-MCA	24
Tabla S3. Proteínas identificadas en células NIH3T3 en respuesta al tratamiento con lunasin	25
Tabla S4. Proteínas identificadas en células NIH3T3 en respuesta al tratamiento con lunasin+3-MCA	25
Tabla S5. Proteínas identificadas en células NIH3T3 en respuesta al 3-MCA	26
Tabla S6. Proteínas identificadas en células NIH3T3 en respuesta al tratamiento con lunasin+rutina+3-MCA	27
Tabla S7. Proteínas identificadas en células NIH3T3 afectadas por cualquier tratamiento	28

## Lista de Figuras

	<b>Página</b>
Figura 1. Geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie R-350 y detección de lunasin por Western blot	9
Figura 2. Efecto de la rutina y el lunasin de amaranto en la transformación de fibroblastos NIH3T3 por el agente carcinogénico 3-MCA	10
Figura 3. Decremento en el número de células inducidas por el agente carcinogénico 3-MCA	11
Figura 4. Gel 2-DE representativo de células NIH3T3 teñido con Coomassie R-350	12
Figura 5. Ubicación celular de las 29 proteínas identificadas por MS	13

## Resumen

### **Análisis proteómico del efecto protector de la rutina y el lunasin de amaranto en células NIH3T3 químicamente transformadas**

La nutrigenómica es un área de investigación novedosa enfocada al estudio de la interacción de los compuestos bioactivos de los alimentos con las células del organismo. El amaranto es un alimento funcional que contiene flavonoides y biopéptidos con propiedades benéficas para la salud de los consumidores. La rutina es un flavonol descrito como el fitoquímico de mayor poder antioxidante, además tiene la capacidad de inhibir el desarrollo de cáncer. El lunasin de amaranto es capaz de inhibir la formación de focos cancerosos en células NIH3T3 cuando son químicamente transformadas con el agente carcinogénico 3-metilcolantreno (3-MCA). Sin embargo, las respuestas celulares del 3-MCA y la acción de los compuestos bioactivos son muy poco conocidas. La transformación maligna de fibroblastos NIH3T3 y el efecto de tratamientos con rutina, lunasin y rutina/lunasin fueron analizados empleando las herramientas de la proteómica comparativa. Las proteínas celulares fueron separadas en geles de dos dimensiones, los patrones 2-DE fueron comparados y las proteínas diferenciales fueron caracterizadas por espectrometría de masas. Se identificaron 29 proteínas diferencialmente expresadas. El tratamiento con rutina afectó mayormente a proteínas citoplásmicas como por ejemplo se observó un aumento de la expresión del inhibidor Rho de disociación GDP2 y la disminución de la expresión de la proteína 1 del complejo T. La acción de lunasin se vio reflejada en cambios en proteínas nucleares. Entre las proteínas que incrementaron su expresión se identificó la Histona H1.2 y la prelamina A/C isoforma A. Además, se encontró que proteínas como la citoqueratina 10 y la ribonucleoproteína heterogénea nuclear Q incrementaron su expresión por el efecto del 3-MCA, sin embargo, su expresión fue regulada con los tratamientos de rutina y lunasin. El empleo de técnicas como la electroforesis bidimensional y la espectrometría de masas permitieron analizar los efectos de compuestos bioactivos sobre un modelo de cultivo celular transformado químicamente. Esto permitió identificar posibles nuevos blancos moleculares para los tratamientos dirigidos contra el cáncer.

**PALABRAS CLAVE:** bioactivos, nutrigenómica, NIH3T3, electroforesis bidimensional, espectrometría de masas

## **Abstract**

### **Proteomics analysis of the protective effect of rutin and amaranth lunasin in chemically transformed NIH3T3 cells**

Nutrigenomics is a novel research area focused on the study of the interaction of bioactive food with the cells of the body. Amaranth is a functional food rich in flavonoids and biopeptides that provide benefits to the health of the consumers. Rutin is a flavonol describe as the phytochemical with the most powerful antioxidant properties, also has the ability to inhibit cancer development. There are evidences that peptides like- lunasin can inhibit the foci formation on NIH3T3 induced by 3-methylcholanthrene (3-MCA). However, the cellular response of 3-MCA and the protective action of bioactive compounds is poorly known. Malignant transformation of NIH3T3 fibroblast and the effect of the treatment with rutin, lunasin, and rutin/lunasin were analyzed using the tools of comparative proteomics. Cellular proteins were separated on two-dimension gels. 2-DE patterns were compared and differential proteins were characterized by mass spectrometry. We identified 29 differentially expressed proteins. Rutin treatments affects mostly cytoplasmic proteins were the over-expression of Rho GDP-dissociation inhibitor 2 was observed while the T-complex protein 1 was down-regulated. Lunasin action was reflected in changes in nuclear proteins. Among the over-expressed proteins was identified the Histone H1.2 and prelamin A/C isoform A. In addition, it was observed that proteins such as cytokeratin 10 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein were over-expressed by the effect of 3-MCA, however, its expression was controlled by rutin and lunasin's treatments. The use of techniques such as two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry let identified effects of bioactive compounds on a cell culture model of chemically transformed. This will let the identification of potential new molecular targets that could be used as target therapies against cancer.

**KEY WORDS:** bioactives, nutrigenomics, NIH3T3, two-bidimensional electrophoresis, mass spectrometry

## 1. INTRODUCCIÓN

La nutrigenómica estudia la interacción y los efectos de los compuestos bioactivos de los alimentos sobre las células del organismo (Tai *et al*; 2007). Los alimentos funcionales además de nutrir, ofrecen un beneficio adicional a la salud del consumidor (Schwager *et al*; 2008). El amaranto es considerado un alimento funcional con un contenido energético mayor al de muchos cereales. Las semillas poseen alto contenido de proteína (13-17%) y la composición de aminoácidos es cercana al balance óptimo requerido en la dieta humana (Paredes *et al*; 1990). Las hojas contienen también niveles altos de proteína (28-49%) y otros compuestos como grasas insaturadas, fibra y minerales (Segura-Nieto *et al*; 1994). Los trabajos de investigación del amaranto en el campo de alimentación se han enfocado a conocer sus compuestos bio-activos. Se ha encontrado que contiene péptidos funcionales con potencial preventivo en cáncer y como anti-hipertensivos (Silva-Sánchez *et al*; 2008). También se ha evaluado el contenido de fitoquímicos en las hojas (Rodríguez, 2008) y en las semillas (Barba de la Rosa *et al*; 2009).

Dentro de los péptidos encriptados en las proteínas de amaranto que poseen propiedades cáncer-preventivas, destaca el lunasin, péptido de 43 aminoácidos identificado por primera vez en soya (Galvez *et al*; 1997). El lunasin contiene ocho residuos de ácido aspártico (D) en la región carboxilo terminal precedido de un motivo de adhesión celular (RGD) y una región hélice predicha con homología estructural a una región conservada de proteínas de unión a cromatina (Galvez *et al*; 1997). La transfección y expresión del gen del lunasin en células de mamífero da como resultado el arresto mitótico y por consiguiente la muerte celular (Galvez *et al*; 1999). La propiedad quimiopreventiva del lunasin se demostró por la inhibición de focos transformantes cuando se añade a células de mamífero que se han puesto en contacto con sustancias cancerígenas. Sin embargo, en células ausentes libres de agentes cancerígenos como el 3-MCA no se observaron cambios ni en la morfología ni en la proliferación celular (Gálvez *et al*; 2001). A diferencia del lunasin de soya donde solo se ha identificado en la fracción albúminas, la proteína tipo-lunasin de amaranto se ha identificado en las albúminas, las globulinas (7S y 11S) y principalmente en la fracción glutelinas (Silva-Sánchez *et al*; 2008). En amaranto, la proteína tipo lunasin se encuentra en forma no procesada, en un péptido de 22 kDa, sin embargo este péptido fue capaz de internalizar en el núcleo celular en 12 h mientras que se ha reportado que el péptido de soya tarda 20 h. Al igual que el lunasin de soya, la proteína tipo lunasin de amaranto es capaz de inhibir la acetilación de histonas, con la ventaja de que la cantidad necesaria para inhibir la formación de focos cancerosos en células

NIH3T3 inducidas por 3-metilcolantreno (3-MCA) es menor que la cantidad de lunasin de soya (Maldonado-Cervantes *et al*; 2010).

La rutina es el principal flavonoide presente en las hojas de amaranto, su contenido varia de 3441 hasta 9236  $\mu\text{g/g}$ . Dicha concentración depende del color de la hoja y de las condiciones de cultivo (Rodríguez, 2008). La rutina también es el flavonoide mayoritario en la semilla de amaranto (Barba de la Rosa *et al*; 2009). La rutina es de los fitoquímicos con mayor poder antioxidante, suprimiendo los procesos mediados por radicales libres. Se ha encontrado que la rutina forma complejos con metales como Fe (+2) y Cu (+2) y tiene una mayor eficiencia para secuestrar radicales libres (Afanas'eva *et al*; 2001). Se ha propuesto a la rutina como tratamiento del cáncer colorectal y como inhibidor de la oxidación de colesterol HDL (Kwon *et al*; 2005). También se ha demostrado que este flavonol puede inhibir el efecto hemolítico en un 42% y puede proteger en un 23.3% la oxidación de los grupos -SH de las proteínas de la membrana celular de los eritrocitos afectados por radicales libres (Asgary *et al*; 2005). La administración de rutina a ratas diabéticas reduce significativamente los niveles de glucosa y aumenta los niveles de insulina en el plasma (Stanley *et al*; 2006). La rutina también posee propiedades antimicrobianas ya que puede inhibir el crecimiento de bacterias que afectan la salud humana como *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Rodríguez-Vaquero *et al*; 2007). Este fitoquímico también es capaz de inhibir la expresión de genes relacionados con la inflamación en macrófagos humanos activados. En ratas, se ha observado que suprime los signos clínicos de artritis crónica (Kauss *et al*; 2008).

El desarrollo de técnicas novedosas como la electroforesis bidimensional (2-DE) complementada con espectrometría de masas (MS) permiten la identificación de proteínas en mezclas complejas (Aebersold y Mann, 2003). La proteómica se ha aplicado en la investigación biomédica para realizar estudios globales de las proteínas de células, tejidos o bio-fluidos (Tai *et al*; 2007). A pesar de que existen evidencias de que los compuestos bio-activos de los alimentos funcionales alteran la expresión génica, se conoce muy poco sobre los mecanismos mediante los cuales llevan a cabo su acción. Un blanco de estudio de la nutrigenómica consiste en la búsqueda de proteínas específicas relacionadas con enfermedades. La identificación y caracterización de estas proteínas se hace posible con el uso de herramientas de proteómica. El objetivo de este trabajo fue analizar mediante un enfoque proteómico la manera en que la rutina y el lunasin de amaranto ejercen su efecto protector sobre células de mamífero químicamente transformadas por el agente cancerígeno 3-MCA.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Reactivos y células**

Los fibroblastos de ratón NIH3T3 se adquirieron de la ATCC (Manassas, VA, USA). El IMDM fue obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El SFB, la solución de penicilina/estreptomicina y la tripsina-EDTA fueron adquiridos de Gibco BRL (Invitrogen, Carlsbad, USA). El lunasin fue purificado de harina de amaranto mediante elusión pasiva (Maldonado-Cervantes *et al*; 2010). La rutina y el 3-MCA se adquirieron de Sigma-Aldrich.

### **2.2. Purificación de lunasin de amaranto**

La purificación del lunasin se realizó a partir de la fracción de globulinas 11S de las proteínas de reserva de harina amaranto. Las semillas de amaranto (*A. hypochondriacus* L.) se molieron hasta obtener una harina que pasa por malla no. 100. La fracción de albúminas se obtuvo a partir de harina desengrasada empleando como agente de extracción agua grado Milli Q en una relación harina/solvente 1:10. La suspensión se agitó por 1h a 4°C y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -20°C. La pastilla restante se resuspendió en solución NaCl 0.1 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.010 M y EDTA 0.001 M para la extracción de globulinas 7S de acuerdo al método descrito anteriormente. La fracción de globulinas 11S se extrajo con una solución NaCl 0.8 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.010 M y EDTA 0.001 M. El sobrenadante se almacenó a -20°C. La fracción de globulinas 11S fue separada electroforéticamente en un gel SDS-PAGE al 12%. La banda del lunasin, de aproximadamente 22 kDa, se cortó, se maceró y se resuspendió en solución Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM y EDTA 0.1 mM. La elución pasiva se siguió por 12 h a 30°C en agitación constante. El péptido purificado fue sometido a electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12% y visualizado mediante tinción con Coomassie R-350.

### **2.3. Identificación de lunasin de amaranto**

La presencia del péptido se confirmó por Western blot siguiendo un método ya descrito (Maldonado-Cervantes *et al*; 2010). Las muestras purificadas por elución pasiva (15 µg) fueron separadas electroforéticamente en un gel SDS-PAGE al 12%. Las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF usando un sistema Trans-Blot SD Semy-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, CA, USA). La membrana fue

bloqueada durante 1 h con solución Blotto A (Tris 20 mM, pH 7, NaCl 0.5 M, 1% de Tween 20 (TBS-T) con 5% de leche sin grasa) y se lavó con solución TBS-T. Se adicionó anticuerpo primario anti-lunasin R2 P4-43 (Zymed lab, CA, USA) disuelto 1:2000 en solución Blotto B (3% de leche descremada en TBS-T) y se incubó durante 2 h. El anticuerpo primario anti-lunasin fue producido contra las secuencias de los residuos 4-43 del lunasin de soya. La membrana se lavó con solución TBS-T y se adicionó el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina disuelto 1:3000 en solución Blotto B y se incubó durante 1 h. La membrana se lavó de nuevo con solución TBS-T y se incubó en solución de fosfatasa alcalina (Tris 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 9.5) durante 20 min. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. La membrana se reveló con cloruro de tetrazolio nitroazul/fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil, sal de toluidina (NBT/BCIP) disuelto en solución de fosfatasa alcalina. La membrana se digitalizó con una cámara Kodak 1440 CF (Kodak Image Station).

## 2.4. Cultivo celular y tratamientos

Los fibroblastos de ratón NIH3T3 se cultivaron en medio basal (IMDM con 10% SFB) con atmosfera húmeda a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Cuando las células alcanzaron un 90% de confluencia se sembraron nuevas placas con una concentración inicial de 1.5 x10<sup>3</sup> células para usarlas en los tratamientos. Dos días después se les añadió la rutina y el lunasin de acuerdo al experimento descrito en la Tabla 1. Las placas se incubaron por 24 h. Los tratamientos de la Tabla 1 en los que se añadió lunasin y/o rutina en presencia de 3-MCA, se incubaron por 4 h. El medio se retiró de todas las placas y las células se lavaron dos veces con PBS. Todas las cajas se trataron nuevamente siguiendo la Tabla 1 y se incubaron por 7 d. Se capturaron imágenes de las células teñidas previamente con Giemsa (Sigma-Aldrich) a lo largo del experimento. Las células fueron recuperadas con la ayuda de un raspador estéril y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

**Tabla 1. Tratamientos empleados en los cultivos de NIH3T3**

Tratamiento	Medio basal con:
Control	-
3-MCA	18 mM
Lunasin	0.5 µM
Lunasin + 3-MCA	0.5 µM + 18 mM
Rutina	50 µM
Rutina + 3-MCA	50 µM + 18 mM
Lunasin + Rutina + 3-MCA	0.5 µM + 50 µM + 18 mM



## **2.5. Extracción de proteínas totales**

La extracción de las proteínas totales de células de mamífero se realizó siguiendo el método de TCA-Acetona con algunas modificaciones (Berkelman y Stenstedt, 1998). El paquete celular fue resuspendido en solución de extracción A (TCA 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.07%, en acetona) y sonificado en un homogeneizador de ultrasonidos (Sonics, CT, USA) por 1.5 minutos a una amplitud de 21% con intervalos de 5 segundos ON y 9.9 segundos OFF. Después se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 h y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se desechó el sobrenadante y el paquete se resuspendió en solución de extracción B ( $\beta$ -mercaptoetanol 0.07%, inhibidores de proteasas 1X, nucleasas 1X, EDTA 2 mM, n-dodecil- $\beta$ -D-maltósido 7.5 mM, en acetona) fría y se agitó en vortex por 1 min. La mezcla se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 h y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se desechó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente por aproximadamente 15 min. Las proteínas extraídas y precipitadas se resuspendieron en solución de rehidratación (8 M de urea, 2% de CHAPS, 0.002% de azul de bromofenol). La cuantificación de proteínas se realizó con el kit Protein-Assay (Bio-Rad) en un espectrofotómetro CARY 50-Bio (Varian Inc., CA, USA).

## **2.6. Electroforesis bidimensional y análisis de imágenes 2-DE**

Las tiras de 13 cm con rango lineal de pH 3-10 (Amersham Biosciences, England) se rehidrataron pasivamente con 1.5 mg de proteínas resuspendidas en 125  $\mu\text{L}$  de solución de rehidratación con buffer IPG 2% y 2.8 mg de ditiotreitól (DTT). La rehidratación se siguió por 15 h a temperatura ambiente en la bandeja de rehidratación. El IEF se llevó a cabo bajo el siguiente programa: gradiente a 500 V por 0.01 kVh, gradiente a 4000V por 5.6 kVh y una rampa a 8000V por 15.2 kVh. Las tiras se equilibraron con solución pH 7 de Tris-HCl 50 mM, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2% y trazas de azul de bromofenol durante 15 min en agitación constante. La segunda dimensión se llevó a cabo en geles de acrilamida 12% en un sistema Hoefer SE 600 (Amersham Biosciences). Las condiciones de la electroforesis para un gel fueron 10 mA por una hora seguido de 20 mA por 5 h aproximadamente. Los geles se tiñeron con Coomassie R-350 y se almacenaron en solución de ácido acético al 5% a  $4^{\circ}\text{C}$ . La digitalización de los geles 2-DE se realizó con un sistema Gel Doc (Bio-Rad). La comparación de imágenes para la identificación de puntos diferenciales se realizó con el programa MELANIE v7 (GeneBio, Geneva, Switzerland). En análisis de imágenes de los geles 2-DE se dividió en tres grupos: rutina, lunasin y rutina+lunasin. El análisis de las imágenes para rutina se realizó con los geles control, rutina, rutina+3-MCA y 3-MCA. El análisis para lunasin se realizó con los geles control, lunasin, lunasin+3-MCA y 3-

MCA. El análisis para el empleo simultáneo se realizó con los geles control, rutina+lunasin+3-MCA y 3-MCA.

## 2.7 Digestión en gel

Las manchas de proteínas diferencialmente expresadas se cortaron manualmente de los geles 2-DE. Las manchas cortadas se lavaron con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM (pH 7,8), acetonitrilo (ACN) grado HPLC/ $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM (1:1[v/v]) y ACN puro para eliminar los contaminantes y desteñir las proteínas. Los fragmentos de gel se secaron por centrifugación al vacío en un sistema Speed-Vac (Eppendorf, Hamburg, Germany). Las muestras se redujeron en una solución de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM con DTT 10 mM y después se alquilaron con iodoacetamida 55 mM. La digestión con tripsina de grado secuenciación (Promega, WI, USA) se llevó a cabo durante toda la noche a 37°C. Los fragmentos tripticos resultantes se extrajeron dos veces con solución de ACN:agua (3:2[v/v]) con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA). Los sobrenadantes se juntaron y se concentraron hasta un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Los péptidos se desalaron y se concentraron a un volumen de 5  $\mu\text{L}$  con puntas Zip-Tip C18 (Millipore, MA, USA), siguiendo el protocolo del fabricante. Los péptidos tripticos se separaron por cromatografía de líquidos (LC) en nanoescala en el sistema nano ACQUITYUPLC (Waters, MA, USA) equipado con una precolumna simétrica C18 (5 $\mu\text{m}$ , 20mmx180 $\mu\text{m}$ , Waters) y una precolumna analítica C18 BEH130 (1.7  $\mu\text{m}$ , 100mmx100 $\mu\text{m}$ , Waters). Para cada muestra digerida, se inyectaron a la precolumna 4  $\mu\text{L}$  de muestra diluida en solución acuosa con ácido fórmico al 0.1% a un flujo de 600 nL/min. Después de la desalación y preconcentración, los péptidos se eluyeron en la columna analítica, y se separaron con un gradiente lineal de 30-80% de fase móvil B (0.1% de ácido fórmico en ACN) por 30min con un flujo de 600 nL/min, seguido de un lavado por 2 min con fase móvil B al 85%. La columna fue reequilibrada a las condiciones iniciales por 15 min con fase móvil A ( $\text{H}_2\text{O}$  grado MilliQ con ácido fórmico 0.1%). La temperatura de la columna se mantuvo a 35°C. El estándar de calibración externa, [Glu<sup>1</sup>]-Fi humano B (Sigma-Aldrich), fue liberado por la bomba auxiliar del sistema nanoACQUITYUPLC a un flujo de 200 nL/min a una concentración de 100 fmol/mL hacia el rociador de referencia de la fuente del Nano Lock Spray del espectrómetro de masas.

## 2.8 Análisis de péptidos mediante espectrometría de masas

El análisis de espectrometría de masas de los péptidos tripticos se realizó en el equipo SYNAPT-HDMS (Waters). El equipo fue operado en modo V y el análisis

se llevo a cabo en ESI positivo. El analizador TOF del espectrómetro de masas fue calibrado externamente con  $[Glu^1]$ -Fi humano B con una  $m/z$  de 133 a 2422. Los datos obtenidos fueron corregidos con el ion monoisotópico doble protonado del  $[Glu^1]$ -Fi humano B. El rociador de referencia fue muestreado cada 30 s. El campo de radiofrecuencia (RF) aplicada al analizador de masas cuadrupolar se ajustó de tal manera que los iones se transmitieran de manera eficiente con una  $m/z$  de 50 a 2000. Los datos de LC-MC independientes de adquisición fueron colectados en una fuente, baja energía y modo de adquisición de energía elevado ( $MS^e$ ). El tiempo de adquisición del espectro en cada fase fue de 1.5 s con un retraso de 0.1 s entre cada escaneo. En modo MS de baja energía, los datos se recolectaron a energía de colisión constante de 3 eV. En modo MS de elevada energía, la energía de la colisión fue rampeada de 15 a 45 eV por 1.5 s de integración. Un ciclo de baja y uno de elevada energía fue adquirido cada 3.2 s.

## 2.9 Identificación de proteínas

La interpretación de los datos y la identificación de las proteínas se realizaron con los datos obtenidos de MS/MS en el motor de búsqueda MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Las búsquedas se realizaron en la base de datos no redundante del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI nr, <http://www.ncbi.nih.gov>). Se empleó la tripsina como proteasa específica con un solo corte permitido. La tolerancia de masa del ión precursor y la fragmentación de iones se fijó en 10 ppm y 0.1 Da, respectivamente. Como modificación fija se estableció la carbamidometilación y como modificación variable la metilación. La identificación se consideró exitosa cuando el puntaje obtenido por MASCOT fue significativo, indicando identidad u homología con una  $P < 0.05$ , un porcentaje de cobertura considerable dentro de la proteína y más de tres coincidencias de los fragmentos obtenidos.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Purificación de lunasin de semillas de amaranto**

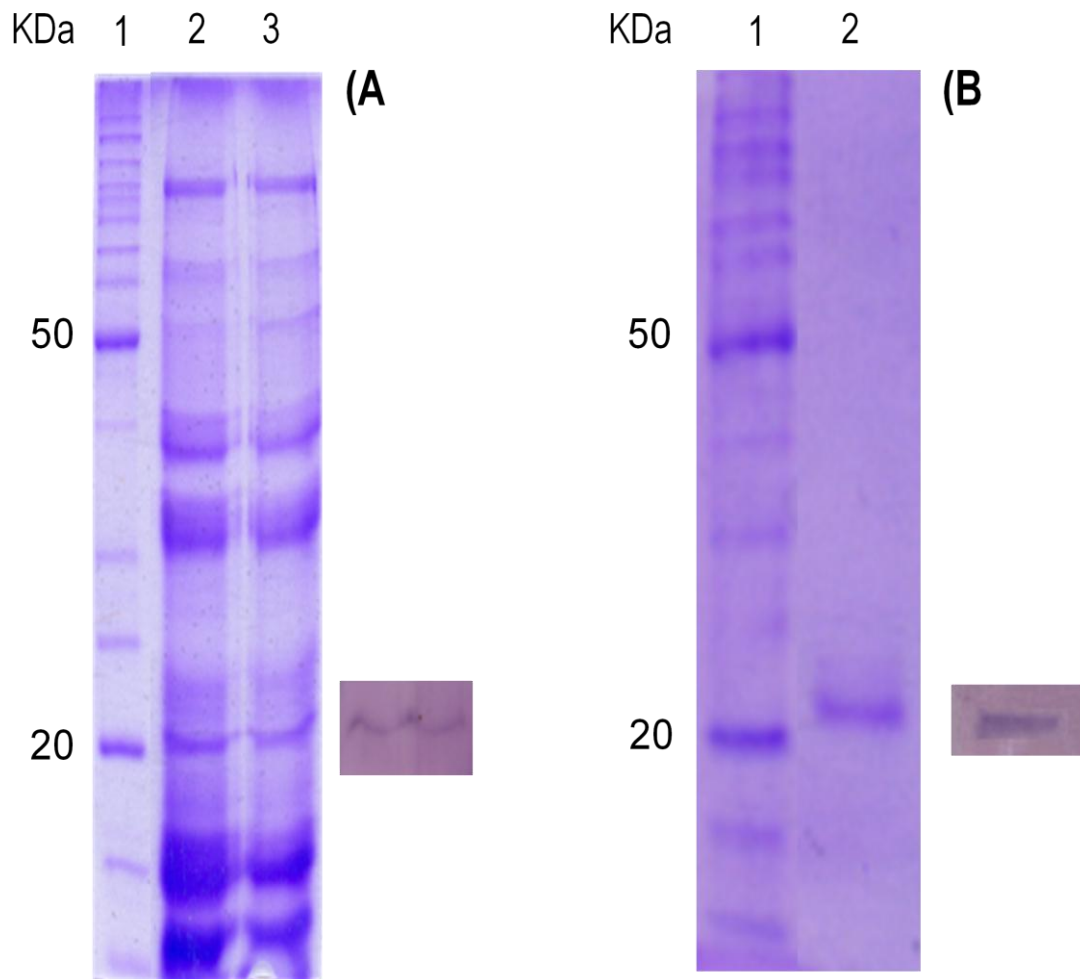
Las globulinas de amaranto fueron separadas en gel SDS-PAGE (Fig. 1A) y el lunasin fue detectado por Western blot (recuadro Fig. 1A). La banda fue cortada y el péptido fue purificado por elusión pasiva. El péptido aislado se analizó en gel de acrilamida (Fig. 1B) y mostró con PM aproximado de 22 kDa que corresponde al lunasin aislado (confirmación por Western blot, recuadro Fig. 1B) con un 95% de pureza.

#### **3.2. Supresión de la transformación inducida por 3-MCA en células NIH3T3 por la rutina y el lunasin de amaranto**

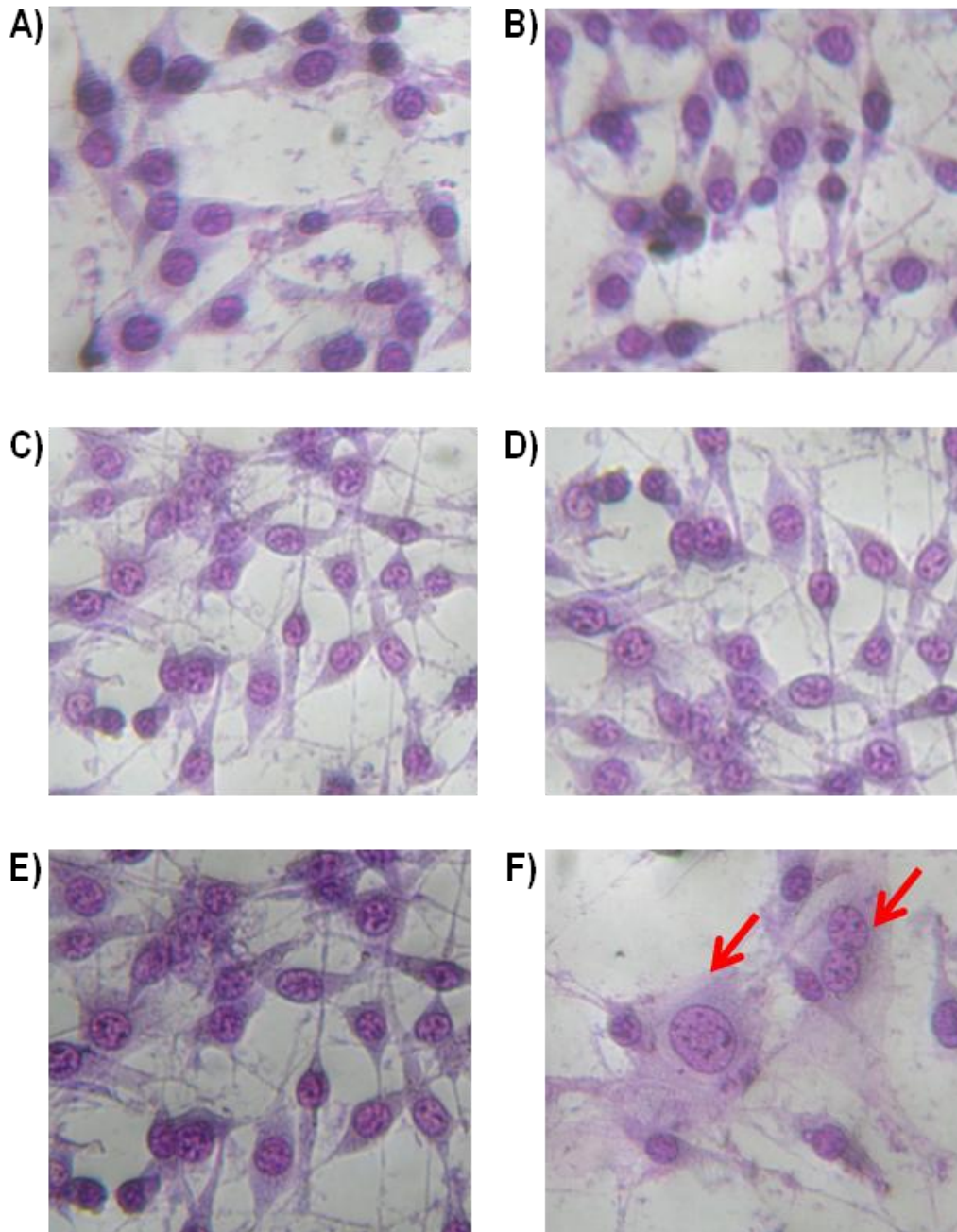
Para evaluar el efecto anti-transformante de la rutina y el lunasin de amaranto en respuesta al 3-MCA, se estableció un ensayo *in vitro* con fibroblastos de ratón sanos NIH3T3. Los cultivos en los que se agregó solamente la rutina y el lunasin en ausencia de 3-MCA, no mostraron cambios morfológicos respecto al cultivo control (fibroblastos cultivados en medio basal) (Fig. 2A y B). Sin embargo, en los cultivos donde se agregó el 3-MCA en presencia de la rutina (Fig. 2C), el lunasin (Fig. 2D) o ambos (Fig. 2E) se observó un menor número de células transformantes respecto a los no tratados (Fig. 2F). El número de focos por pozo inducidos por el 3-MCA sobre las células NIH3T3 se contabilizó en placas de 24 pozos. Se observó la disminución de focos cancerosos en presencia de los tratamientos con la rutina, el lunasin o ambos (Fig. 3). Los cultivos donde se agregó solamente la rutina y el lunasin se encuentra ausente la morfología de focos cancerosos.

#### **3.3 Separación de las proteínas mediante 2-DE e identificación de manchas diferenciales**

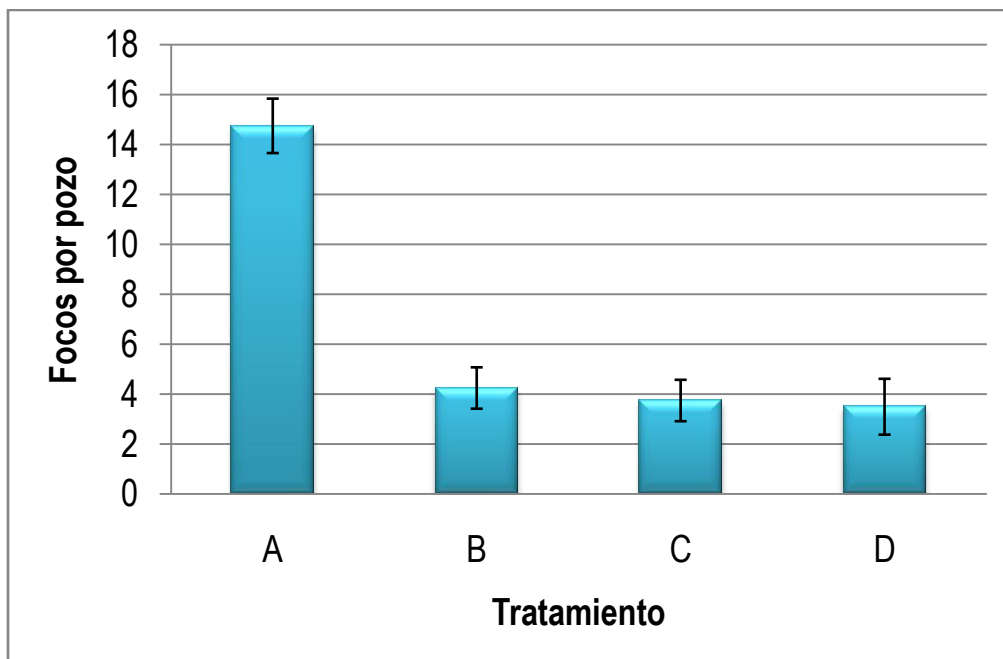
El análisis de las imágenes de los geles 2-DE de los diferentes cultivos reveló 62 manchas diferenciales que mostraron un incremento o decremento mayor a dos veces respecto al control. Se escogieron 38 manchas que mostraron los cambios más notables para analizarlas por MS. En total fueron identificadas 29 proteínas (Tablas S1-S7) y el resto está en proceso de identificación. En la Fig. 4 se presenta un ejemplo típico de un gel 2-DE donde se muestra la ubicación de las manchas identificadas. La clasificación de las proteínas identificadas mostró que la mayoría de las proteínas analizadas se encuentran situadas en el núcleo (48%), mientras que el resto se distribuyen por el resto de los organelos celulares y algunas de ellas se localizan en más de un solo organelo (Fig. 5).



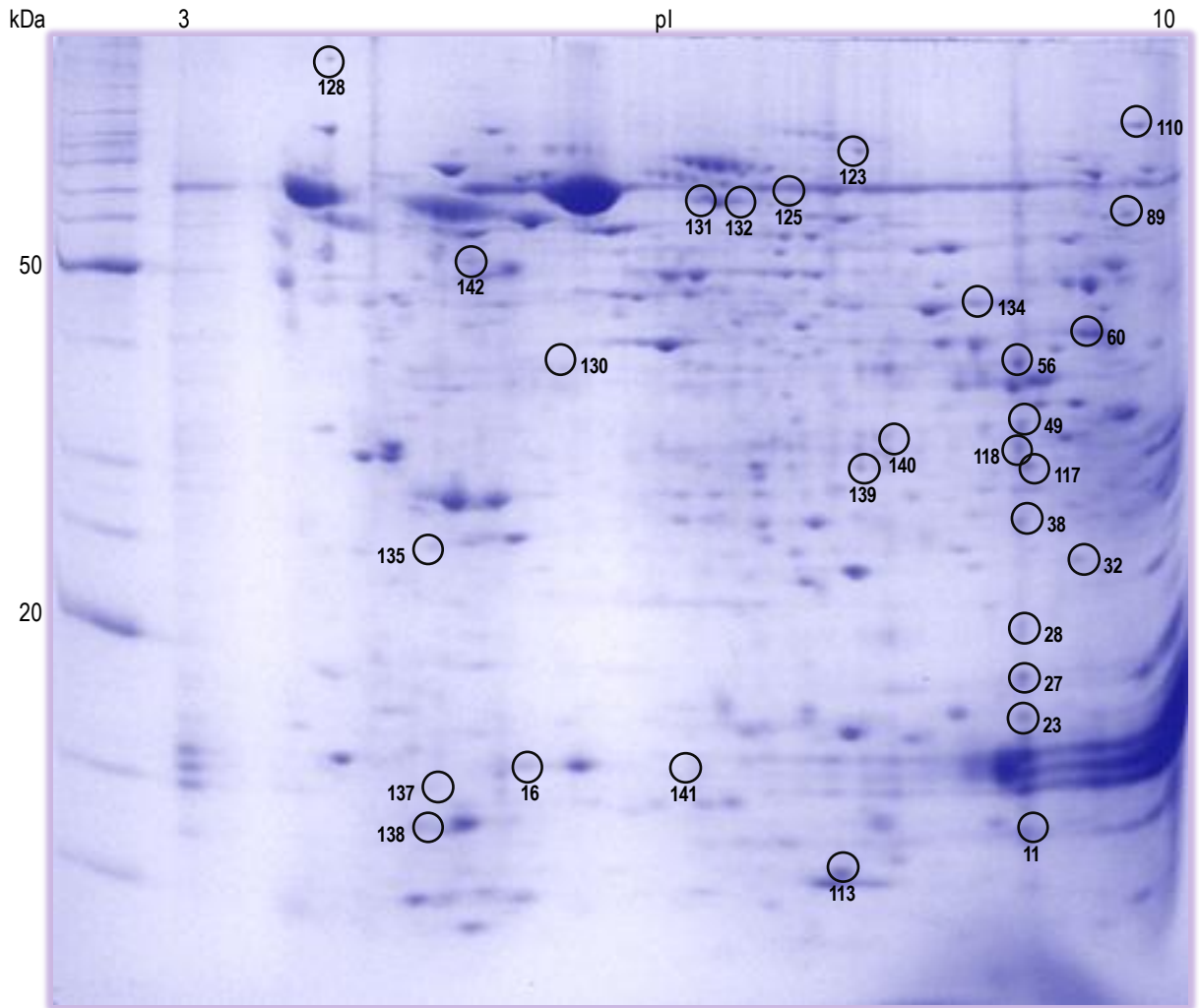
**Fig. 1. Geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie R-350 y detección de lunasin por Western blot.** A) Fracción globulinas 11S de proteínas de reserva de amaranto y Western blot contra lunasin, carril 1: marcador molecular, carril 2-3: globulinas 11S. B) Banda de 22 kDa y Western blot contra lunasin, carril 1: marcador molecular, carril 2: lunasin purificado.



**Fig. 2. Efecto de la rutina y el lunasin de amaranto en la transformación de fibroblastos NIH3T3 por el agente carcinogénico 3-MCA.** Imágenes tomadas con el objetivo de 10X muestran los cultivos de células tratadas con rutina A), lunasin B), 3-MCA más rutina C), 3-MCA más lunasin D), 3-MCA más combinación de rutina-lunasin E) y solo 3-MCA F). Las flechas indican los focos cancerosos.

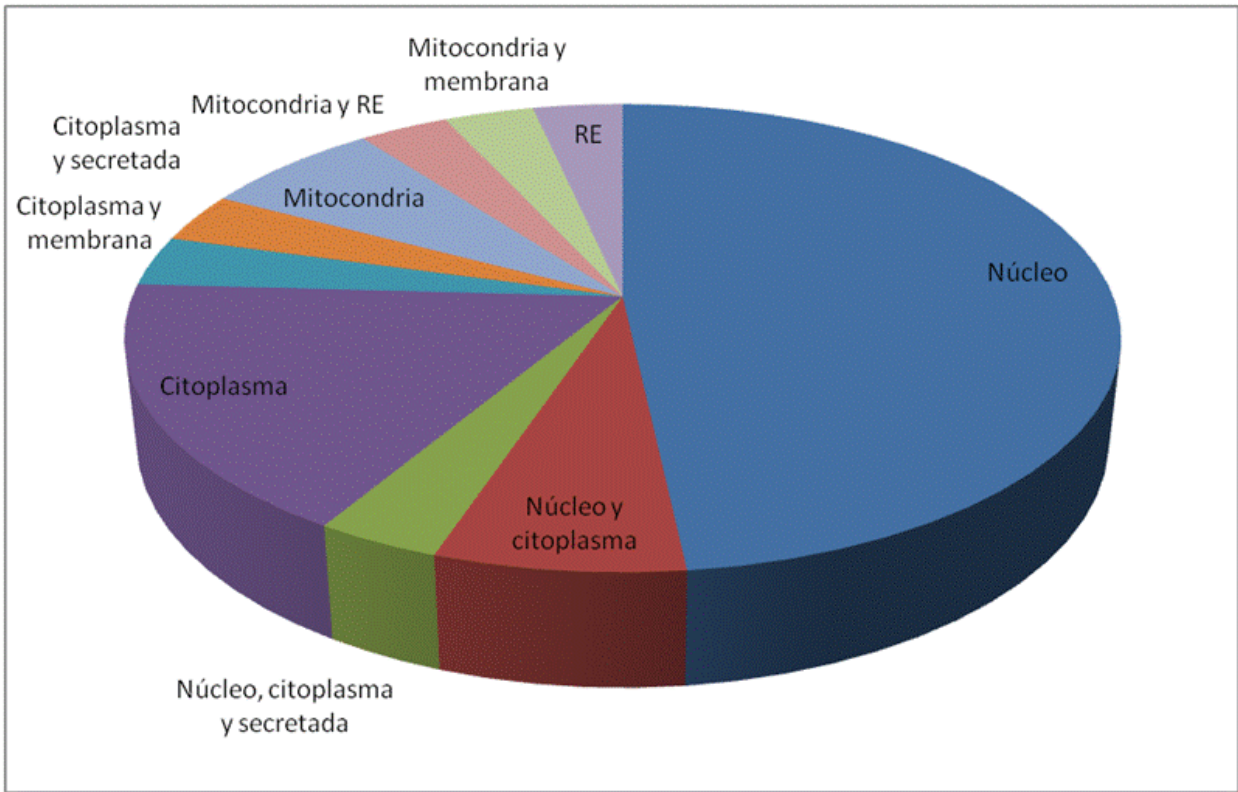


**Fig. 3. Decremento en el número de células inducidas por el agente carcinogénico 3-MCA.** A) Células tratadas con 3-MCA, B) Células tratadas con 3-MCA más rutina, C) Células tratadas con 3-MCA más lunasin, D) Células tratadas con 3-MCA más rutina y lunasin. n=4



**Fig. 4. Gel 2-DE representativo de células NIH3T3 teñido con Coomassie R-350.** Los círculos muestran la ubicación de las proteínas diferenciales identificadas.





**Fig. 5. Ubicación celular de las 29 proteínas identificadas por MS.** Los porcentajes para cada organelo son los siguientes: núcleo 48%, núcleo y citoplasma 7%, núcleo, citoplasma y secretada 3%, citoplasma 17%, citoplasma y membrana 3%, citoplasma y secretada 3%, mitocondria 7%, mitocondria y RE 3%, mitocondria y membrana 3% y RE 3%.

### **3.4 Efecto de la rutina y el lunasin sobre la expresión de proteínas en células NIH3T3 en contacto con 3-MCA**

En el tratamiento con rutina se vio afectada la expresión de cinco proteínas (Tabla S1). Se identificaron ocho proteínas que son afectadas por el tratamiento con rutina cuando las células NIH3T3 son puestas con contacto con el 3-MCA (Tabla S2). Se encontró que cinco proteínas que son afectadas por el tratamiento con lunasin (Tabla S3). Se identificaron siete proteínas que son afectadas por el tratamiento con lunasin cuando las células NIH3T3 son puestas con contacto con el cancerígeno 3-MCA (Tabla S4).

### **3.5 El tratamiento simultáneo de la rutina y el lunasin tiene un efecto sobre la expresión de proteínas distinto al mostrado cuando se emplean de manera individual**

La rutina y el lunasin empleadas de manera simultánea sobre los cultivos de células NIH3T3 activan proteínas diferentes a las identificadas con su uso por separado. El análisis de las imágenes 2-DE de los geles se realizó con el control (células NIH3T3), lunasin+rutina+3-MCA y 3-MCA. La Tabla S6 muestra la lista de las 11 proteínas identificadas por MS que son afectadas por el tratamiento con la rutina y el lunasin cuando las células NIH3T3 son puestas con contacto con el cancerígeno 3-MCA.

### **3.6 El 3-MCA modifica la expresión de proteínas cuando es puesto en contacto con células NIH3T3**

Los cultivos de células NIH3T3 expuestos al agente cancerígeno 3-MCA por un periodo de 4 h mostraron cambios en el perfil de expresión de proteínas. La Tabla S5 muestra la lista de las 12 proteínas identificadas por MS afectadas cuando las células NIH3T3 ausentes de cualquier tratamiento son puestas con contacto con el 3-MCA.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Proteínas nucleares

Las histonas son las proteínas principales que conforman la cromatina en las células eucariotas. La interacción de las histonas con los genes forma el nucleosoma. En este estudio se observó que la expresión de diferentes subunidades de proteínas que forman parte del nucleosoma (H1.2, H3.2 y H4), se modifican cuando el lunasin y el 3-MCA se añaden a los cultivos de fibroblastos NIH3T3. Se ha reportado que el lunasin de amaranto es capaz de internalizar en el núcleo de células NIH3T3 e inhibir la acetilación de la histona H4 en un 77% (Maldonado-Cervantes *et al*; 2010).

Las proteínas que forman parte de los ribosomas son esenciales para el funcionamiento correcto y síntesis de las proteínas. Se observó que un grupo de proteínas ribosomales (60S-L27, 60S-L28, MCG9098, MCG116025 y LLRep3) disminuyeron su expresión cuando las células NIH3T3 se pusieron en contacto con el 3-MCA. Al parecer, la proteína ribosomal 60S-L27 y la MCG9098 se vieron afectadas por cualquier estímulo aplicado a los cultivos. Sin embargo en el caso de la proteína ribosomal 60S-L27, la acción de la rutina y el lunasin se vio reflejada al no permitir que su expresión disminuyera por el efecto del 3-MCA.

Cuando la rutina se agregó a los cultivos de NIH3T3 que están en contacto con 3-MCA, se identificó la disminución de un factor rico en prolina y glutamina (PSF) esencial para el corte y empalme del pre-mRNA y que desaparece durante la apoptosis. Debido a esta forma de muerte celular conlleva a la degradación de proteínas, se consideró que el PSF, al igual que otros factores de corte y empalme es sensible a la proteólisis (Shav-Tal *et al*; 2001).

En el tratamiento con rutina en células transformadas con 3-MCA se identificó la disminución de una proteína tipo nucleofosmina, sin embargo, el tratamiento con lunasin parece mantener los niveles basales de esta proteína. La nucleofosmina es una proteína clave en la regulación de numerosos procesos como la duplicación del centrómero, el mantenimiento de la integridad genómica y la biogénesis de ribosomas (Yu *et al*; 2006). Se observó también que la proteína de unión a RNA FUS disminuyó su expresión cuando los cultivos de células NIH3T3 transformadas con 3-MCA y en presencia de rutina, lunasin, o ambos. El gen *fus* es miembro de la familia de genes FET de proteínas de unión a RNA que están involucradas en translocaciones cromosomales para generar fusiones de oncogenes humanos. Las proteínas de unión a RNA juegan un papel central en la

regulación de la expresión génica y ciertos procesos enzimáticos mediados por ARN (Sugawara *et al*; 2010).

La lámina nuclear es una red de proteínas de filamentos intermedios tipo V que se encuentran principalmente por debajo de la membrana nuclear interna. Participa en procesos como control del ciclo celular, transcripción de genes y replicación de ADN (Pratt *et al*; 2011). Se observó que la expresión de la isoforma A de la prelamina A/C aumentó con el tratamiento con lunasin, mientras que su expresión disminuyó cuando las células NIH3T3 fueron transformadas por el 3-MCA y tratadas con rutina.

Dentro de las proteínas nucleares se identificó también a la pirrolina-5-carboxilato reductasa 5, la cual disminuyó su expresión con el tratamiento con rutina. La L-prolina es un aminoácido que juega un papel importante en la proteína que contribuye al plegamiento de las proteínas, su estructura y su propia estabilidad, además sirve como un motivo de secuencia de reconocimiento (Nocek *et al*; 2005).

#### **4.2. Proteínas co-localizadas en el núcleo y otros organelos**

La expresión de la subunidad  $\alpha$  tipo-7 del proteosoma que se localiza en núcleo y citoplasma disminuyó cuando los cultivos de NIH3T3 fueron transformados el 3-MCA y que estuvieron en presencia de rutina o lunasin. La ribonucleoproteína heterogénea nuclear Q aumentó cuando los cultivos de NIH3T3 fueron tratados con 3-MCA. Se ha reportado que la expresión de esta proteína aumenta en astrocitos humanos sanos por el efecto de cannabinoides (Bindukumara *et al*; 2008). La galectina-3 es una proteína de unión a carbohidratos que se sobreexpresa en varios tumores y en células del sistema inmune en respuesta a varios estímulos, incluso se ha reportado que puede inhibir la progresión de tumores (Nangia-Makker *et al*; 2008). La presencia de esta proteína se ha reportado en el núcleo, citoplasma y también secretada. Nosotros observamos que esta proteína disminuyó con cualquier tratamiento aplicado comparado con el control.

#### **4.3. Proteínas del citoplasma**

Dentro de las proteínas citoplasmáticas, se identificaron proteínas del citoesqueleto o involucradas en procesos de plegamiento o disociación. Se observó que la citoqueratina 10 aumentó en los cultivos de NIH3T3 en contacto

con 3-MCA, sin embargo cuando estos mismos cultivos fueron tratados con rutina o lunasin, o ambas, su expresión no se vio modificada. En un estudio de proteómica comparativa se observó que ciertas proteínas del citoesqueleto se encontraron sobreexpresadas en tejido hepático canceroso comparadas con tejido hepático normal. La identificación de proteínas del citoesqueleto está relacionada con el desarrollo o progresión del cáncer (Darby *et al*; 2011). En el proceso de diferenciación de células 3T3-L1, la tubulina se expande por la acción de la insulina (Welsh *et al*; 2004). Se ha comprobado también que diversas proteínas de choque térmico (HSP) y proteínas del citoesqueleto como la tubulina aumentan su expresión en melanomas metastásicos (Huang *et al*; 2009). En nuestro análisis se encontró la sobreexpresión de la tubulina beta-5 en cultivos de NIH3T3 en contacto con 3-MCA en respuesta al tratamiento con rutina o lunasin, la combinación de ambos. Se encontró que la proteína controlada transcripcionalmente por tumores (p21) aumentó con el tratamiento con lunasin. Se ha reportado que la regulación de los niveles de p21 por la glucosa es probable que sea un mecanismo cito-protector para las células beta del páncreas contra el daño causado por la hiperglucemia (Diraison *et al*; 2011).

La rutina agregada a los cultivo de células NIH3T3 tuvo la capacidad de aumentar los niveles del inhibidor Rho de disociación GDP 2. Este inhibidor ha sido caracterizado como un regulador de las GTPasas Rho con un papel importante en el desarrollo de numerosos aspectos del fenotipo maligno, incluyendo la progresión del ciclo celular, la resistencia a los estímulos apoptóticos, la neovascularización, la motilidad celular del tumor, la invasión y la metástasis (Cho *et al*; 2010). También observamos que algunas chaperonas como la proteína 1 del complejo T subunidad Z disminuyó con el tratamiento de la rutina.

#### **4.4. Proteínas co-localizadas en el citoplasma y otros organelos**

La dinactina es un complejo que vincula a una variedad de microtúbulos y es necesaria para la organización correcta del citoesqueleto (Lien *et al*; 2008). La subunidad 2 de la dinactina aumentó en cultivos de NIH3T3 en contacto con 3-MCA y en el tratamiento con rutina, sin embargo cuando estos cultivos fueron tratados con lunasin su expresión no se vio modificada. Encontramos que algunas proteínas del citoplasma también pueden ser secretadas al exterior celular, como el factor inhibidor de la migración de macrófagos. Dicho factor aumentó en los cultivos de NIH3T3 en contacto con 3-MCA y tratados con rutina, lunasin, o su empleo simultáneo. Se observó que este factor también aumentó en cultivos de células MCF7 cuando fueron tratadas con el fármaco melfalan, fármaco

antineoplásico inespecífico que pertenece a la familia de los quimioterápicos alquilantes (Zhang *et al*; 2007).

#### **4.5. Proteínas mitocondriales**

En un estudio de proteómica comparativa (2D-DIGE y MS) revelaron que existen proteínas sobreexpresadas propias del cáncer de próstata como disulfuro isomerasas y algunas HSP's (Ummanni *et al*; 2011). En nuestro estudio, la expresión de HSP10 aumentó en los cultivos de NIH3T3 en contacto con 3-MCA cuando fueron tratados con rutina o lunasin y de manera simultánea. La citrato sintasa disminuyó su expresión cuando los cultivos de NIH3T3 estuvieron en contacto con 3-MCA, sin embargo, los tratamientos con rutina y/o lunasin sobre estos mismos cultivos revierten el efecto del 3-MCA. La expresión desregulada de este tipo de enzimas también se ha reportado en células de cáncer de páncreas AsPC-1 (Xiaojun *et al*; 2010).

#### **4.6. Proteínas co-localizadas en el mitocondria y otros organelos**

Finalmente, dentro de la mitocondria y otros organelos como el retículo endoplásmico encontramos la expresión modificada de enzimas relacionadas con el procesamiento de ARNmt, metabolismo de aminoácidos y chaperonas como 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenasa tipo 2, aspartato aminotransferasa y disulfuro isomerasa A3. En un estudio de proteómica se determinó si la acción hepatoprotectora de S-adenosilmetionina en las primeras etapas está relacionada con alteraciones en el proteoma mitocondrial y se encontró que se afectan enzimas como 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenasas y disulfuro isomerasas (Andringa *et al*; 2010). Nosotros encontramos que la expresión de la disulfuro isomerasa A3 aumentó en los cultivos de NIH3T3 en contacto con 3-MCA y en tratamiento con lunasin, sin embargo cuando estos mismos cultivos fueron tratados con rutina su expresión no se vio modificada. Sin embargo, la expresión de 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenasa tipo 2 disminuyó cuando los cultivos de NIH3T3 estuvieron en contacto con 3-MCA, pero los tratamientos con rutina y/o lunasin sobre estos mismos cultivos contrarrestaron el efecto del 3-MCA.

## 5. CONCLUSIONES

El empleo de modelos de cultivo celulares es una herramienta útil para analizar los cambios a nivel de proteínas durante la transformación química que puedan estar relacionados con el desarrollo de focos cancerosos.

Se demostró que existen varias proteínas que participan en el mecanismo mediante el cual la rutina y el lunasin de amaranto ejercen su efecto protector sobre las células NIH3T3 cuando estas son puestas en contacto con agentes químicos como el 3-MCA.

Con este enfoque proteómico fue posible tener una primera aproximación de posibles marcadores o blancos terapéuticos activados por los fitoquímicos y biopéptidos relacionados con el tratamiento de cáncer.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198–207

Afanas'eva IB, Ostrakhovitch EA, Mikhal'chik EV, Ibragimova GA, Korkina LG. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochem Pharmacol* 2011; 61:677–684

Andringa KK, Adrienne L. King AL, Eccleston HB, Mantena SK, Landar A, Jhala NC, Dickinson DA, Squadrito GL, Bailey SM. Analysis of the liver mitochondrial proteome in response to ethanol and S-adenosylmethionine treatments: novel molecular targets of disease and hepatoprotection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010, 298(5):G732–G745

Asgary S, Naderi GH, Askari N. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Exp Clin Cardiol* 2005; 10(2):88-90

Barba de la Rosa AP, Fomsgaard IS, Laursen B, Mortensen AG, Olvera-Martínez JL, Silva-Sánchez C, Mendoza-Herrera A, De León-Rodríguez A, González-Castañeda J. Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *J Cereal Sci* 2009; 49:117-121

Berkelman T y Stenstedt T. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients. *Principles and Methods*. Edition AC 1998; 80-6429-60

Bindukumara B, Mahajana SD, Reynolds JL, Hub Z, Sykesa DE, Aalinkeela R, Schwartz SA. Genomic and proteomic analysis of the effects of cannabinoids on normal human astrocytes. *Brain Res* 2008; 1191:10.1016

Cho HJ, Baek KE, Yoo J. RhoGDI2 as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14(1):67-75

Darby IA, Vuillier-Devillers K, Pinault E, Sarrazy V, Lepreux S, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Desmoulière A. Proteomic Analysis of Differentially Expressed Proteins in Peripheral Cholangiocarcinoma. *Cancer Microenvironment* 2011; 4:73–91



Diraison F, Hayward K, Sanders KL, Brozzi F, Lajus S, Hancock J, Francis JE, Ainscow E, Bommer UA, Molnar E, Avent ND, Varadi A. Translationally controlled tumour protein (TCTP) is a novel glucose-regulated protein that is important for survival of pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2011; 54(2):368-79

Galvez AF, Chen N, Macasieb J. Chemopreventive property of a soybean peptide (Lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibit acetylation. *Cancer Res* 2001; 61:7473–8,

Galvez AF, de Lumen BO. A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis in mammalian cells. *Nat. Biotechnol* 1999; 17:495–500

Galvez AF, Revilleza MJR, de Lumen BO. A novel methionine-rich protein from soybean cotyledon: cloning and characterization of cDNA (accession No. AF005030). *Plant Register #PGR97-103. Plant Physiol* 1997; 114:1567–9

Han LY, Cai CZ, So SL, Chung C, Chen YZ. Prediction of RNA-binding proteins from primary sequence by a support vector machine approach. *RNA* 2004; 10(3): 355–368

Huang SK, Darfler MM, Nicholl MB, You J, Bemis KG. LC/MS-Based Quantitative Proteomic Analysis of Paraffin-Embedded Archival Melanomas Reveals Potential Proteomic Biomarkers Associated with Metastasis. *PLoS ONE* 2009; 4(2):10.1371

Kauss T, Moynet D, Rambemrt J, Al-Kharrat A, Brajot S, Thiolat D, Enneman R, Fawaz Fawaz, Djavad MM. Rutoside decreases human macrophage-derived inflammatory mediators and improves clinical signs in adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; 10:R19

Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of proinflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* 2005; 69(3):395-406

Lien WH, Gelfand VI, Vasioukhin V. Alpha E-catenin binds to dynamitin and regulates dynactin-mediated intracellular traffic. *J. Cell Biol* 2008; 83:6, 989–997

Maldonado-Cervantes E, Jeong HJ, León-Galván F, Barrera-Pacheco A, De León-Rodríguez A, González de Mejia E, de Lumen BO, Barba de la Rosa AP. Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits

chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells. *Peptides* 2010; 31: 1635-42

Nangia-Makker P, Balan V, Raz A. Regulation of Tumor Progression by Extracellular Galectin-3. *Cancer Microenvironment* 2008; 1:43–51

Nocek B, Chang C, Li H, Lezondra L, D. Holzle D, Collart F, Joachimiak A. Crystal Structures of  $\Delta^1$ -Pyrroline-5-carboxylate Reductase from Human Pathogens *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pyogenes*. *J Mol Biol* 2005; 354(1): 91–106

Paredes LO, Barba de la Rosa AP, Hernandez DL, Carabez AT. Amarantho: características y aprovechamiento industrial. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington D.C., 1990

Pratt CH, Curtain M, Donahue LR, Shopland LS. Mitotic Defects Lead to Pervasive Aneuploidy and Accompany Loss of RB1 Activity in Mouse LmnaDhe Dermal Fibroblasts. *PLoS ONE* 2011; 6(3):10.1371

Rodríguez Enríquez Ricardo J. Caracterización de ácidos fenólicos y flavonoides presentes en hojas de amaranto (*amaranthus hypocondriacus* L.). San Luis Potosí, S.L.P.: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., 2008, Tesis de maestría (Biología Molecular)

Rodríguez-Vaquero MJ, Alberto MR, Manca-de-Nadra MC. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 2007; 18, 93–101

Schwager J, Mahajeri MH, Fowler A, Weber P. Challenges in discovering bioactives for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 19:66-72, 2008  
Segura-Nieto M, Barba de la Rosa AP, Paredes-López O. Biochemistry of amaranth proteins. En: *Amaranth biology, chemistry and technology*. O Paredes-López (Ed.) CRC Press, 5, 1994

Shav-Tal Y, Cohen M, Lapter S, Dye B, Patton JG, Vandekerckhove J, Zipori D. Nuclear Relocalization of the Pre-mRNA Splicing Factor PSF during Apoptosis Involves Hyperphosphorylation, Masking of Antigenic Epitopes, and Changes in Protein Interactions. *Mol Biol Cell* 2001; 12:2328–2340

Silva-Sánchez C, Barba de la Rosa AP, León-Galván MF, de Lumen BO, De Leon-Rodríguez A, Gonzalez de Mejia E. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *J Agric Food Chem* 2008; 56:1233–40

Stanley PMP, Kamalakkannan N. Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *J Biochem Mol Toxicol* 2006; 20:96–102

Sugawara T, Hideyuki Oguro H, Negishi M, Morita Y, Ichikawa H, Iseki T, Yokosuka O, Nakauch H, Iwama A. FET family proto-oncogene *Fus* contributes to self-renewal of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2010; 38:696–706

Tai ES, Gillies PJ. Nutrigenomics—opportunities in Asia. *Forum Nutr* 2007; 60:80–90

Ummanni R, Mundt F, Pospisil H, Venz S, Scharf C. Identification of Clinically Relevant Protein Targets in Prostate Cancer with 2D-DIGE Coupled Mass Spectrometry and Systems Biology Network Platform. *PLoS ONE* 2011; 6(2): e16833

Welsh GI, Griffiths MR, Webster KJ, Page MJ, Tavare JM. Proteome analysis of adipogenesis. *Proteomics* 2004; 4:1042–1051

Xiaojun L, Min Z, Liang WGV, Shen H. Membrane proteomic analysis of pancreatic cancer cells. *J Biomed Sci* 2010; 17:74

Yu Y, Maggi LB, Brady SN, Apicelli AJ, Dai MS, Lu H, Weber JD. Nucleophosmin Is Essential for Ribosomal Protein L5 Nuclear Export. *Mol Cell Biol* 2006; 26:10:3798–3809, 2006

Zhang JT, Yang Liu Y. Use of comparative proteomics to identify potential resistance mechanisms in cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 2007; 33(8):741-756

## 7. MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Tabla S1. Proteínas identificadas en células NIH3T3 en respuesta al tratamiento con rutina**

ID	Proteína identificada	No. de Acceso	kDa/pl teóricos	Matches/Cobertura	Score	Función/Localización	Expresión
135	p21	gi 6678437	19.6/4.76	3/16	64	Unión a calcio y estabilización de microtúbulos/Citoplasma	↑
137	Tubulina beta-5	gi 7106439	50/4.78	4/8	35	Constituyente de microtúbulos/Citoplasma	↑
16	Inhibidor Rho de disociación GDP 2	gi 33563236	22.9/4.97	12/62	181	Intercambio GDP/GTP de Rho/Citoplasma	↑
138	Factor inhibidor de la migración de macrófagos, cadena A	gi 5542285	12.5/7.27	5/42	189	Citocina pro-inflamatoria/Citoplasma y secretada	↑
123	Proteína 1 del complejo T subunidad Z	gi 6753324	58.4/6.63	8/13	65	Chaperona/Citoplasma	↓

**Tabla S2. Proteínas identificadas en células NIH3T3 en respuesta al tratamiento con rutina+3-MCA**

ID	Proteína identificada	No. de Acceso	kDa/pl teóricos	Matches/Cobertura	Score	Función/Localización	Expresión
137	Tubulina beta-5	gi 7106439	50/4.78	4/8	35	Constituyente de microtúbulos/Citoplasma	↑
142	Dinactina subunidad 2	gi 28076935	44.2/5.14	6/22	72	Mitosis/Citoplasma y membrana	↑
138	Factor inhibidor de la migración de macrófagos, cadena A	gi 5542285	12.5/7.27	5/42	189	Citocina pro-inflamatoria/Citoplasma y secretada	↑
131	Prelamina A/C	gi 12835914	74.5/6.54	34/46	404	Lámina nuclear/Núcleo	↓

56	Tipo-nucleofosmina	gi 149251776	32.8/4.62	9/35	152	Chaperona/Núcleo	↓
89	Proteína de unión a RNA FUS	gi 20982845	52.9/9.4	5/8	43	Unión a AND y mantiene la integridad genómica/Núcleo	↓
60	PSF	gi 23956214	75.5/9.45	13/19	102	Unión a AND y ARN, splicing/Núcleo	↓
110	Aspartato aminotransferasa, precursor	gi 2690302	47.8/9.05	22/38	433	Metabolismo de aa. Absorción de ácidos grasos libres de cadena larga/Mitocondria y membrana celular	↓

**Tabla S3. Proteínas identificadas en células NIH3T3 en respuesta al tratamiento con lunasin**

ID	Proteína identificada	No. de Acceso	kDa/pi teóricos	Matches/Cobertura	Score	Función/Localización	Expresión
132	Prelamina A/C isoforma A	gi 162287370	74.5/6.54	22/31	178	Lámina nuclear/Núcleo	↑
89	Proteína de unión a RNA FUS	gi 20982845	52.9/9.4	5/8	43	Unión a AND y mantiene la integridad genómica/Núcleo	↓
49	LLRep3	gi 200812	24.4/9.81	8/37	20	Ribonucleoproteína/Núcleo	↓
38	Subunidad $\alpha$ tipo-7 del proteosoma	gi 7106389	28/8.59	7/25	129	Proteolítica/ Núcleo y citoplasma	↓
110	Aspartato aminotransferasa, precursor	gi 2690302	47.8/9.05	22/38	433	Metabolismo de aa. Absorción de ácidos grasos libres de cadena larga/Mitocondria y membrana celular	↓

**Tabla S4. Proteínas identificadas en células NIH3T3 en respuesta al tratamiento con lunasin+3-MCA**

ID	Proteína identificada	No. de Acceso	kDa/pi teóricos	Matches/Cobertura	Score	Función/Localización	Expresión
139	Histona H1.2	gi 9845257	21/11.00	5/20	82	Componente del nucleosoma/núcleo	↑

137	Tubulina beta-5	gi 7106439	50/4.78	4/8	35	Constituyente de microtúbulos/Citoplasma	↑
138	Factor inhibidor de la migración de macrófagos, cadena A	gi 5542285	12.5/7.27	5/42	189	Citocina pro-inflamatoria/Citoplasma y secretada	↑
130	Disulfuro isomerasa A3	gi 56905	57/6.38	4/6	17	Cataliza los rearreglos de los puentes S-S/RE	↑
49	LLRep3	gi 200812	24.4/9.81	8/37	20	Ribonucleoproteína/Núcleo	↓
89	Proteína de unión a RNA FUS	gi 20982845	52.9/9.4	5/8	43	Unión a AND y mantiene la integridad genómica/Núcleo	↓

**Tabla S5. Proteínas identificadas en células NIH3T3 en respuesta al 3-MCA**

ID	Proteína identificada	No. de Acceso	kDa/pl teóricos	Matches/Cobertura	Score	Función/Localización	Expresión
141	Histona H3.2	gi 51301	15.4/11.27	2/25	27	Componente del nucleosoma/núcleo	↑
125	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear Q	gi 6576815	62.7/7.18	6/10	70	Procesamiento de ARNm/Núcleo y citoplasma	↑
128	Citoqueratina 10	gi 7638398	35/5.07	4/8	57	Filamento intermedio/citoplasma	↑
142	Dinactina subunidad 2	gi 28076935	44.2/5.14	6/22	72	Mitosis/Citoplasma y membrana	↑
113	HSP 10 kDa, mitocondrial	gi 6680309	10.9/7.93	10/70	22	Biogénesis de proteínas/Mitocondria	↑
130	Disulfuro isomerasa A3	gi 56905	57/6.38	4/6	17	Cataliza los rearreglos de los puentes S-S/RE	↑
49	LLRep3	gi 200812	24.4/9.81	8/37	20	Ribonucleoproteína/Núcleo	↓
118	MCG116025	gi 148708773	27.7/10.55	8/30	55	Ribonucleoproteína/Núcleo	↓
23	Proteína ribosomal 60S L27	gi 4506623	15.8/10.56	7/35	49	Ribonucleoproteína/Núcleo	↓

56	Tipo-nucleofosmina	gi 149251776	32.8/4.62	9/35	152	Chaperona/Núcleo	↓
38	Subunidad $\alpha$ tipo-7 del proteosoma	gi 7106389	28/8.59	7/25	129	Proteolítica/ Núcleo y citoplasma	↓
32	3-hidroxiacil-CoA dehidrogenasa tipo 2	gi 61888838	27.4/8.89	10/52	267	Maduración del ARNmt/Mitocondria y RE	↓
143	Citrato sintasa, precursor mitocondrial	gi 13385942	51/8.72	12/27	200	Metabolismo de carbohidratos/Mitocondria	↓

**TablaS6. Proteínas identificadas en células NIH3T3 en respuesta al tratamiento con lunasin+rutina+3-MCA**

ID	Proteína identificada	No. de Acceso	kDa/pl teóricos	Matches/ Cobertura	Score	Función/Localización	Expresión
141	Histona H3.2	gi 51301	15.4/11.27	2/25	27	Componente del nucleosoma/núcleo	↑
142	Dinactina subunidad 2	gi 28076935	44.2/5.14	6/22	72	Mitosis/Citoplasma y membrana	↑
137	Tubulina beta-5	gi 7106439	50/4.78	4/8	35	Constituyente de microtúbulos/Citoplasma	↑
138	Factor inhibidor de la migración de macrófagos, cadena A	gi 5542285	12.5/7.27	5/42	189	Citocina pro-inflamatoria/Citoplasma y secretada	↑
113	HSP 10 kDa, mitocondrial	gi 6680309	10.9/7.93	10/70	22	Biogénesis de proteínas/Mitocondria	↑
130	Disulfuro isomerasa A3	gi 56905	57/6.38	4/6	17	Cataliza los rearrreglos de los puentes S-S/RE	↑
118	MCG116025	gi 148708773	27.7/10.55	8/30	55	Ribonucleoproteína/Núcleo	↓
49	LLRep3	gi 200812	24.4/9.81	8/37	20	Ribonucleoproteína/Núcleo	↓
140	Pirrolina-5-carboxilato reductasa 2	gi 19526878	33.9/7.67	4/16	83	Biosíntesis de aminoácidos/Núcleo	↓
56	Tipo-nucleofosmina	gi 149251776	32.8/4.62	9/35	152	Chaperona/Núcleo	↓

<b>38</b>	Subunidad $\alpha$ tipo-7 del proteosoma	gi 7106389	28/8.59	7/25	129	Proteolítica/ Núcleo y citoplasma	↓
-----------	--	------------	---------	------	-----	-----------------------------------	---

**Tabla S7. Proteínas identificadas en células NIH3T3 afectadas por cualquier tratamiento**

<b>ID</b>	<b>Proteína identificada</b>	<b>No. de Acceso</b>	<b>kDa/pi teóricos</b>	<b>Matches/ Cobertura</b>	<b>Score</b>	<b>Función/Localización</b>	<b>Expresión</b>
<b>11</b>	Histona H4	gi 148700589	11.5/11.20	5/45	83	Componente nuclear del nucleosoma/Núcleo	↓
<b>27</b>	Proteína ribosomal 60S L28	gi 6677779	15.8/12.02	9/42	45	Ribonucleoproteína/Núcleo	↓
<b>28</b>	MCG9098	gi 295842468	17.2/10.65	6/24	33	Ribonucleoproteína/Núcleo	↓
<b>117</b>	Galectina-3	gi 126679	27.6/8.46	9/33	144	Lectina galactosa específica de unión a IgE/ Núcleo, Citoplasma y Secretada	↓