

Universidad del Papaloapan
Campus Tuxtepec
Ingeniería en Biotecnología

**“Actividad antiproliferativa de proteínas de
hojas de *Alternanthera dentata* (L.) Kuntze”**

Tesis

Que Para Obtener el Título de:

Ingeniero en Biotecnología

Presenta:

Fernando Sanchez Velasco

Directora: Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. 2024



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA


ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

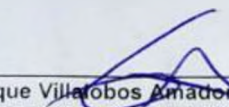
En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 04 de diciembre de 2023 a las 11:00 h, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis "Actividad antiproliferativa de proteínas de hojas de *Alternanthera dentata*" presentada por el alumno Fernando Sánchez Velasco, con número de matrícula 18090172, aspirante al título de Licenciatura.


Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

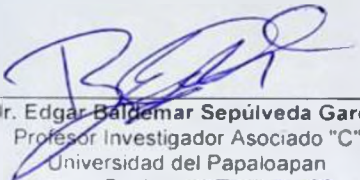
Tuxtepec, Oaxaca, a 04 de diciembre de 2023.


ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia
Profesor Investigador Titular "B"
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis


Dr. Enrique Villalobos Amador
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Paul Mauricio Sanchez Ocampo
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Edgar Baldeemar Sepúlveda Garcia
Profesor Investigador Asociado "C"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Oscar Abelardo Ramirez Marroquin
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Campus Loma Bonita
Av. Ferrocarril S/N, Col. Ciudad Universitaria, Loma
Bonita, Oaxaca C.P. 68400
Tel/Fax: 01 281 872 92 30

www.unos.edu.mx

Campus Tuxtepec
Circuito Central N° 200, Col. Parque Industrial,
Tuxtepec, Oaxaca. C.P. 68301
Tel/Fax: 01 287 875 9240



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 08 de enero de 2024
Oficio No. JCIB/001/01/2024

M.E. Yesenia Barrientos Arenal
Jefa de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Fernando Sánchez Velasco**, con número de matrícula 18090172, con título final "**Actividad antiproliferativa de proteínas de hojas de *Alternanthera dentata***", para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

- Dr. Enrique Villalobos Amador (Presidente, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Paul Mauricio Sanchez Ocampo (Secretario, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García (Vocal, Universidad del Papaloapan)
- Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú



Jacqueline Capataz Taur
Dra. Jacqueline Capataz Taur
Jefa de Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Tania Zúñiga Marroquín
Vo.Bo. Dra. Tania Zúñiga Marroquín
Encargada del Despacho de Vice Rectoría
Académica
Universidad del Papaloapan



c.c.p. Dr. Ariana Arlene Huerta Heredia, Directora de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Fernando Sánchez Velasco, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

Campus Loma Bonita
Av. Ferrocarril S/N, Col. Ciudad Universitaria, Loma
Bonita, Oaxaca C.P. 68400
Tel/Fax: 01 281 872 92 30

www.unpa.edu.mx

Campus Tuxtepec
Circuito Central N° 200, Col. Parque Industrial,
Tuxtepec, Oaxaca. C.P. 68301
Tel/Fax: 01 287 875 9240

Declaración de Originalidad

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Biotecnología de Plantas Medicinales del Centro de Investigaciones Científicas de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec bajo la dirección de la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia.

Los resultados de investigación son parte de los proyectos Cátedras-CONACyT “3212 Estudio integral de plantas medicinales para la producción y estandarización de fitoextractos” e “Identificación y caracterización de proteínas inactivadoras de ribosomas de plantas medicinales de la cuenca del Papaloapan” con número de registro 19/2021/UNPA-IBT.

Agradecimientos

Agradezco principalmente a mis padres: Juan Manuel Sanchez y Berenice Velasco por apoyarme incondicionalmente durante el proceso y la culminación de mis estudios de licenciatura.

Estoy agradecido con la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia, directora de este trabajo de tesis, por su tiempo, dedicación, apoyo personal y la confianza otorgada a mi persona. Su guía y orientación fueron fundamentales para el éxito de este proyecto.

Asimismo, doy las gracias a los Profesores-Investigadores por sus consejos y aportaciones, especialmente al Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García, al Dr. Miguel Ángel Peña Rico y la Dra Luz del Carmen Camacho Castillo; y por sus revisiones a la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa.

A mis compañeros y amigos del laboratorio por su apoyo Noelia Atilano y Guillermo Márquez. Y a mis compañeros del posgrado por compartir sus conocimientos conmigo Eduardo Anaya, Itzel Orea y Alain Nolasco.

Dedicatoria

A mis padres por **brindarme** la oportunidad de estudiar y a mis **hermanos** para que vean que si se puede.

*«Todo me sirve,
nada se pierde,
yo lo transformo»
~Gustavo Cerati*

Índice

1. Introducción	3
1.1. El cáncer	3
1.2. Las plantas como fuentes de nuevos fármacos	4
1.3. Plantas de la familia <i>Amaranthaceae</i> y género <i>Althernanthera</i>	4
1.4. Las Proteínas Inactivadoras de Ribosomas (RIPs)	6
1.5. Familias de plantas que producen RIPs.....	7
1.6. Antecedentes de proteínas con actividad antiproliferativa	8
1.7. Antecedentes de plantas <i>Amaranthaceae</i> con RIPs	11
1.8. Antecedentes de péptidos con actividad antiproliferativa.....	11
1.9. Posibles aplicaciones terapéuticas de las RIPs.....	13
1.10. Antecedentes del grupo de trabajo.....	14
2. Justificación	15
3. Hipótesis:	16
4. Objetivos:.....	16
4.1 Objetivo general:.....	16
4.2 Objetivos específicos:.....	16
5. Diagrama experimental	17
6. Materiales y Métodos.....	18
6.1 Colecta del material vegetal.....	18
6.2 Extracción/precipitación de proteínas por distintas metodologías.....	18
6.3 Cuantificación de proteína	21
6.4 Electroforesis en Gel SDS- PAGE al 12 y 15%	22
6.5 Electroelución de proteínas a partir de geles de poliacrilamida	24
6.6 Diálisis.....	25
6.7 Concentración de la muestra	25

6.8 Evaluación de actividad antiproliferativa.....	25
6.9 Análisis estadístico	26
7. Resultados y discusión.....	27
7.1 Métodos de extracción/precipitación de proteínas	27
7.2 Electroforesis en Gel SDS- PAGE	30
7.3 Evaluación de actividad antiproliferativa.....	37
8. Conclusión	43
9. Recomendaciones.....	44
9.1 Identificación de potenciales RIPs mediante un alineamiento de secuencias	44
9.2 Propuestas para obtener una mejor extracción:	44
9.3 Realizar un gel SDS-PAGE cargando muestras de los diferentes métodos de extracción de proteínas utilizados para comparar el perfil electroforético.....	44
9.4 Propuestas extraer y evaluar proteínas nativas de <i>A. dentata</i>	44
9.5 Identificación de las proteínas provenientes de las bandas con actividad antiproliferativa	45
10. Referencias	46
11. Anexos	58

Índice de Figuras

Figura 1. Tipos de cáncer que causaron más fallecimientos en 2020 (WHO, 2022a).	3
Figura 2. Fotografía de <i>Alternanthera dentata</i> (L.) Kuntze. Tomada en enero 2023, en San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, en las coordenadas: 18.013109, -96.171495.....	5
Figura 3. Representación de la estructura del ribosoma eucariota, la flecha señala el enlace que escinden las RIPs en bucle α -sarcina/ricina (α -SRL) del ARNr. Recuperado de: Olombrada <i>et al.</i> , 2020	6
Figura 4. Número de RIPs para cada orden de plantas. Cada tipo de RIPs es representada por un color de acuerdo a la clasificación propuesta por los autores. Recuperado de: Dougherty & Hudak, 2022.	8
Figura 5. Esquemas generales de las posibles aplicaciones terapéuticas de las RIPs en el tratamiento del cáncer: a) clonación de la secuencia de la RIP en vectores plasmídicos b) generación de inmunotoxinas formadas por un anticuerpo y una RIP.....	14
Figura 6. Hojas de <i>A. dentata</i> : a) hojas maduras y b) hojas juveniles.	18
Figura 7. Formación de agregado al realizar la extracción de proteína total mediante a) TCA/Acetona y b) precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	27
Figura 8. Gel SDS-PAGE al 12% de extractos proteicos de HM de <i>A. dentata</i> obtenidos con el método de TCA/A- β . Cada carril es una réplica de la extracción. MPM: Marcador de peso molecular.	30
Figura 9. Gel SDS-PAGE al 11% de extractos de proteínas de HM de <i>A. dentata</i> a) extracto crudo b) extracto crudo pasado por Amicon® 10K. Cada pozo contiene 71.3 μg de proteína. Carriles principales con muestra: C1, C2, C3 y C4; al lado invasión de carril con la muestra proteica. MPM: Marcador de peso molecular.	31
Figura 10. Geles SDS-PAGE de extractos de proteínas de HM de <i>A. dentata</i> a) al 12% con: C1 (Extracto crudo con 69.54 μg de proteína), C2 (Extracto crudo pasado por Amicon® 10K con 70 μg de proteína), C3 (TCA/A-DTT con 39 μL), C4 (extracción metanólica con 39 μL). Carriles principales con muestra: C1, C2, C3 y C4; al lado invasión de carril con la muestra proteica. b) al 15% con: C1 (Extracto crudo con 69.54 μg de proteína). Las bandas seleccionadas se muestran con flechas y nomenclatura. MPM: Marcador de peso molecular.	32

Figura 11. Gel SDS-PAGE al 15% de extracto crudo de HJ (Ext HJ) de *A. dentata*. Cada pozo contiene 39 μ L de extracto proteico. Cada carril es una réplica de la extracción. MPM: Marcador de peso molecular.33

Figura 12. Gel SDS-PAGE al 12% de extractos de proteínas de HJ de *A. dentata* a) TRI-Reagent (TRI) b) Kit de extracción de proteínas totales de plantas Sigma-Aldrich PE0230 (P-K). Cada pozo contiene 30 μ g de proteína. Las bandas seleccionadas se muestran con flechas azules y números. MPM: Marcador de peso molecular.....33

Figura 13. Gel SDS-PAGE al 12% de extractos de proteínas de HJ y HM de *A. dentata* a) TRI-Reagent de HJ (TRI-HJ) b) TRI-Reagent de HM (TRI-HM). Cada pozo contiene 30 μ g de proteína. Las bandas seleccionadas se muestran con flechas azules y números. MPM: Marcador de peso molecular.34

Figura 14. Efecto de las proteínas de bandas B1, B2, B3 y B4 en contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 a las 24 h de incubación. Los resultados se expresan en porcentaje del control negativo (CN), medio DMEM. Los datos son la media \pm desviación estándar (DE). $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. * representa $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$ todos ellos frente al control negativo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA (análisis de la varianza) unidireccional con el software GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Se aplicó la prueba de Dunnet para comparar cada tratamiento con el control, con una significación estadística de $p < 0.05$38

Figura 15. Efecto de las proteínas de bandas B1, B2, B3, B4 y B5 en contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 a las 24 h de incubación. Los resultados se expresan en porcentaje del control negativo (CN), medio DMEM. Los datos son la media \pm desviación estándar (DE). $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. * representa $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$ todos ellos frente al control negativo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA (análisis de la varianza) unidireccional con el software GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Se aplicó la prueba de Dunnet para comparar cada tratamiento con el control, con una significación estadística de $p < 0.05$40

Figura 16. Efecto de las proteínas de bandas B1, B2, B3, B4 y B5 en contra células embrionarias de riñón humano HEK 293 a las 24 h de incubación. Los resultados se expresan en porcentaje del control negativo (CN), medio DMEM. Los datos son la media \pm desviación estándar (DE). $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. * representa $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$

y **** $p \leq 0.0001$ todos ellos frente al control negativo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA (análisis de la varianza) unidireccional con el software GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Se aplicó la prueba de Dunnet para comparar cada tratamiento con el control, con una significación estadística de $p < 0.05$60

Índice de Tablas

Tabla 1.	Proteínas RIPS de plantas que presentan actividad antiproliferativa	9
Tabla 2.	Plantas de la familia <i>Amaranthaceae</i> utilizadas en la medicina tradicional y las RIPS identificadas	12
Tabla 3.	Buffer de electroforesis 10 X Tris Glicina pH 8.3.....	23
Tabla 4.	Disoluciones para gel de corrida Acrilamida/Bisacrilamida al 12% y 15%.....	23
Tabla 5.	Disoluciones para la preparación del gel concentrador	23
Tabla 6.	Disoluciones para la preparación de solución de tinción de azul de Coomassie.....	24
Tabla 7.	Disoluciones para la preparación de solución desteñidora de azul de Coomassie. ...	24
Tabla 8.	Cuantificación de proteína en extractos de HM y HJ de <i>A. dentata</i> utilizando el kit 2D Quant	28
Tabla 9.	Determinación del contenido de azúcares reductores presentes hojas de diferentes especies de <i>Alternanthera</i>	29
Tabla 10.	Número de bandas obtenidas en el perfil electroforético mediante algunas de las metodologías de extracción/precipitación empleadas en hojas (HJ y HM) de <i>A. dentata</i>	36
Tabla 11.	Comparación del peso molecular de las diferentes bandas de proteínas obtenidas de HM (extracto crudo) y HJ (TRI-Reagent) de <i>Alternanthera dentata (L.) Kuntze</i>	36
Tabla 12.	Concentraciones empleadas en la curva dosis-respuesta para cada una de las bandas de HM en µg/mL y nM.....	38
Tabla 13.	Porcentaje de inhibición de viabilidad celular para cada una de las concentraciones empleadas en la curva dosis-respuesta de bandas de HM.	39
Tabla 14.	Concentraciones empleadas en la curva dosis-respuesta para cada una de las bandas de HJ en µg/mL y nM.....	40
Tabla 15.	Porcentaje de inhibición de viabilidad celular para cada una de las concentraciones empleadas en los ensayos con bandas de HJ.	41

Lista de Abreviaturas

2-DE	Electroforesis en gel bidimensional
% IVC	Porcentajes de inhibición en la viabilidad celular
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CHAPS	3-((3-colamidopropilo) dimetilamonio)-1-propanesulfonato
DTT	Ditiotreitol
HM	Hoja madura
HJ	Hoja juvenil
IC₅₀	Concentración Inhibitoria Media
kDa	Kilodaltons
MetS	Metabolitos secundarios
MPM	Marcador de peso molecular
MTT	Bromuro de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
nM	Nanomolar
PBS	Buffer fosfatos
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
pM	Picomolar
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RIPs	Proteínas Inactivadoras Ribosomas
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio
Seg	Segundos
TCA	Ácido tricloroacético
TCA/A-DTT	TCA/A con Ditiotreitol
TCA/A-βm	TCA/A con β-mercaptoetanol
TEMED	Tetrametiletildiamina
Tris	Trisaminometano
βm	β-mercaptoetanol

Resumen

Las plantas poseen un gran potencial como materia prima en la obtención de fármacos para el tratamiento del cáncer. En este sentido, una familia de plantas con un potencial poco explorado, son las *Amaranthaceae*. Se ha documentado que esta familia de plantas tiene la capacidad de producir proteínas, como las proteínas inhibidoras de ribosomas y péptidos de bajo peso molecular que muestran actividad citotóxica y antiproliferativa en distintas líneas celulares cancerosas. En el presente trabajo, se evaluó la actividad antiproliferativa de proteínas de bajo peso molecular provenientes de hojas de *Alternanthera dentata* (L.) Kuntze en contra de la línea celular MCF-7. Para la extracción de proteína, se utilizaron dos tipos de hojas: HJ (hoja juvenil) y HM (hoja madura). Se ensayaron diferentes metodologías para la extracción de proteínas, tales como: el método de TCA/Acetona, precipitación con sulfato de amonio, TRI-Reagent, extracción metanólica ácida, kit de extracción de proteína total de plantas y el extracto crudo. En la HM, el extracto crudo fue el método que cuantificó una mayor concentración de proteína. Por otra parte, en la HJ, el método de TRI-Reagent fue el que proporcionó el mayor contenido de proteína. Una vez obtenidas las muestras proteicas, se cargaron en geles de electroforesis SDS-PAGE al 12 y 15% con el fin de separar las proteínas, lo que permitió seleccionar bandas proteicas en el rango de 17-35 kDa. El método de TRI-Reagent fue el que mostró el mayor número de bandas detectadas en ambos tipos de hojas. A las bandas proteicas seleccionadas, se les evaluó la actividad antiproliferativa en contra de la línea celular MCF-7 a diferentes concentraciones. Dichas concentraciones se establecieron entre los siguientes rangos: 0.551-5.512 µg/mL para B1; 3.192-31.923 µg/mL para B2; 0.346-3.461 µg/mL para B3; y 2.449-24.487 µg/mL para B4. En el caso de la HM, se encontró que dos bandas, denominadas B3 y B4 con un PM de: 27.558 ± 0.349 kDa y 17 kDa, respectivamente, que redujeron la viabilidad celular en un $68.72 \% \pm 0.081$ aproximadamente. Las concentraciones que mostraron este efecto fueron desde 0.692 hasta 3.461 µg/mL para B3 y 4.897 hasta 24.487 µg/mL para B4. Por otra parte, en HJ, las bandas evaluadas no mostraron una reducción de la viabilidad celular en los ensayos. De esta manera, en este trabajo se encontró que proteínas de hojas de *A. dentata* presentan actividad antiproliferativa en contra de la línea celular MCF-7.

Abstract

Plants have shown to have a great potential in obtaining drugs for the treatment of cancer. In this sense, a family of plants with a poorly explored potential, are the *Amaranthaceae*. It has been documented that this family of plants has the ability to produce proteins, such as ribosome-inhibiting proteins and low molecular weight peptides that show cytotoxic and antiproliferative activity in different cancer cell lines. In the present work, the antiproliferative activity of low molecular weight proteins from leaves of *Alternanthera dentata* (L.) Kuntze was evaluated. For protein extraction, two types of leaves were used: HJ (juvenile leaf) and HM (mature leaf). Different methodologies for protein extraction were tested, such as: the TCA/Acetone method, ammonium sulfate precipitation, TRI-Reagent, acidic methanolic extraction, total plant protein extraction kit and crude extract. In HM, crude extract was the method that quantified a higher concentration of protein. On the other hand, in HJ, TRI-Reagent method was the one that provided the highest protein content. Once the protein samples were obtained, they were loaded on 12 and 15% SDS-PAGE electrophoresis gels in order to separate the proteins, which allowed to select protein bands in the range of 17-35 kDa. The TRI-Reagent method was the one that showed the highest number of bands detected in both types of leaves. The selected protein bands were evaluated for their antiproliferative activity against the MCF-7 cell line at different concentrations. These concentrations were established between the following ranges: 0.551-5.512 $\mu\text{g/mL}$ for B1; 3.192-31.923 $\mu\text{g/mL}$ for B2; 0.346-3.461 $\mu\text{g/mL}$ for B3; and 2.449-24.487 $\mu\text{g/mL}$ for B4. In the case of HM, it was found that two bands, named B3 and B4 with a MW of: 27.558 ± 0.349 kDa and 17 kDa, respectively, reduced cell viability by approximately $68.72 \% \pm 0.081$. Concentrations that showed this effect ranged from 0.692 to 3.461 $\mu\text{g/mL}$ for B3 and 4.897 to 24.487 $\mu\text{g/mL}$ for B4. On the other hand, in HJ, the evaluated bands did not show a reduction in cell viability in the assays. Thus, in this work it was found that proteins from *A. dentata* leaves have antiproliferative activity against the MCF-7 cell line.

1. Introducción

1.1. El cáncer

El cáncer es una de las enfermedades con mayor importancia en el mundo. En el año 2020 fue la principal causa de muerte a nivel mundial con 10 millones de defunciones (WHO, 2022a). Además, según estimaciones, en 2021 se diagnosticaron 20 millones de casos de cáncer y 10 millones de personas murieron (WHO, 2023). En la Figura 1 se presentan los tipos de cáncer que causaron el mayor número de fallecimientos en el mundo en el año 2020, siendo el cáncer de pulmón el principal responsable con el 18% del total (1.8 millones de fallecimientos). Durante el 2020, se registraron 195, 499 casos de cáncer en México (WHO, 2020). Además, en el mismo año entre enero y agosto se registraron 60, 421 defunciones por causa de tumores malignos en territorio nacional (INEGI, 2021). A nivel estatal se registraron 2,038 fallecimientos a causa del cáncer en 2020; siendo el cáncer cervicouterino, de mama y de próstata, los principales causantes de estos fallecimientos (Jiménez, 2021). Aunque existen terapias para el tratamiento del cáncer basadas en la administración de fármacos quimioterapéuticos, intervenciones quirúrgicas y radiación (Zaimy *et al.*, 2017), éstas presentan efectos secundarios como diarrea, náuseas y, fatiga, e incluso otros efectos que pueden llegar a ser mucho más graves como afectaciones a órganos esenciales o causar infertilidad (Schirrmacher, 2019).

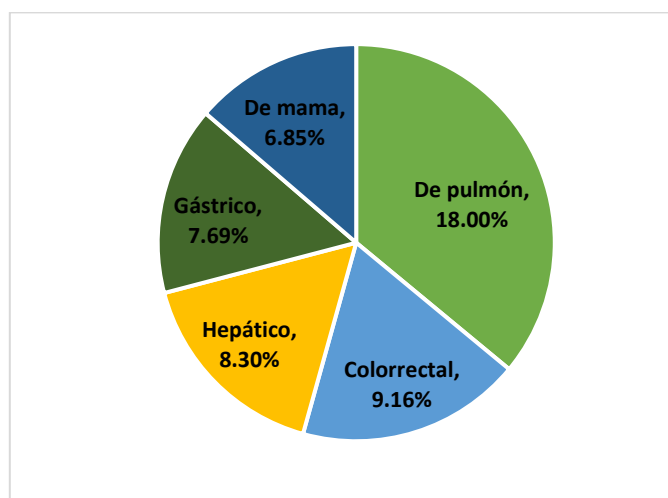


Figura 1. Tipos de cáncer que causaron más fallecimientos en 2020 (WHO, 2022a).

1.2. Las plantas como fuentes de nuevos fármacos

En los últimos años se ha optado por tratamientos menos agresivos y preferentemente obtenidos de fuentes naturales. Una de estas fuentes naturales con enorme potencial para obtener nuevos fármacos son las plantas. Los compuestos procedentes de las plantas han proporcionado a la industria farmacéutica el 40% de los medicamentos modernos (Jassim & Naji, 2003). Las plantas de forma natural son productoras de sustancias con actividad anticancerígena. En la industria farmacéutica existen casos de éxito de fármacos aprobados para el tratamiento de cáncer provenientes de plantas, por ejemplo: el Dronabinol, la Nabilona (en tratamiento de náuseas por la quimioterapia), la Vincristina, el Paclitaxel (Taxol®) y el mepesuccinato de omacetaxina (Synribo®) (Majolo *et al.*, 2019; National Cancer Institute, 2023). En este sentido, según la enciclopedia Británica, un fármaco anticanceroso es cualquier compuesto que tiene eficacia en el tratamiento de enfermedades malignas o cancerosas (Britannica, 2021). Por otra parte, la actividad antiproliferativa hace referencia a la capacidad de una sustancia para inhibir o prevenir la proliferación (crecimiento rápido) de células cancerosas (Merriam-Webster Medical Dictionary, 2023).

1.3. Plantas de la familia *Amaranthaceae* y género *Alternanthera*

Existe una familia de plantas con un enorme potencial para ser utilizadas como fuente para la obtención de nuevos fármacos con actividad anticancerígena. Estas plantas son de la familia *Amaranthaceae*, la cual comprende 65 géneros y 900 especies (Mahbubur & Iffat, 2014).

Se ha documentado que el género *Alternanthera*, perteneciente a la familia *Amaranthaceae*, incluye 80 especies y muchas de ellas han sido utilizadas en la medicina tradicional (Miguel, 2018).

Debido a esto, se han estudiado los extractos de varias especies de *Alternanthera* demostrando que tienen propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes y anticancerígenas; hasta el día de hoy, han sido aislados 129 compuestos bioactivos de 9 especies de *Alternanthera* (Singla *et al.*, 2022). Además de las propiedades previamente mencionadas, se ha reportado que sus extractos poseen actividad antiproliferativa. En ese sentido, Gothai *et al.* (2018) observaron que el extracto de *A. sessilis* tiene actividad citotóxica en células de cáncer de colon. Asimismo, Saengha *et al.* (2022) demostraron que extractos etanólicos de *A. sissoo* y *A.*

betzickiana presentan propiedades antiproliferativas en células de cáncer de mama, de hígado y de útero.

Alternanthera dentata (L.) Kuntze conocida comúnmente como pequeño rubí o “terramicina”, ahora es reconocida como *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Figura 2) (Singla *et al.*, 2022). Es una planta ornamental, muy utilizada para adornar y embellecer los jardines, se encuentra ampliamente distribuida en Brasil, Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela, Guayanas, Nicaragua, Belice, Guatemala, México y el Caribe; esta especie tiene una distribución nativa que abarca desde México hasta la región tropical de América (POWO, 2023). Se ha reportado que esta planta se utiliza comúnmente en la medicina tradicional, ya que sus hojas se emplean en tratamientos contra el dolor, algunas infecciones, diabetes y la malaria; se ha demostrado que los extractos de hoja tienen efecto antinociceptivo, antiviral, antimicrobiano, antiinflamatorio y antioxidante (Marchete *et al.*, 2021; Riyama *et al.*, 2021). Además, los extractos obtenidos con acetato de etilo de hojas de *A. brasiliana* presentan actividad antitumoral comparable a la del fármaco estándar 5-Fluoro uracilo (Samudrala *et al.*, 2015). Al analizar el extracto, los autores, reportaron la presencia de metabolitos secundarios (MetS) como: flavonoides, fenoles, taninos, glucósidos y saponinas; sin embargo, no se detectó la presencia de proteínas o péptidos.



Figura 2. Fotografía de *Alternanthera dentata* (L.) Kuntze. Tomada en enero 2023, en San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, en las coordenadas: 18.013109, -96.171495.

1.4. Las Proteínas Inactivadoras de Ribosomas (RIPs)

Si bien la gran mayoría de compuestos con actividad antiproliferativa son metabolitos secundarios (MetS), también se han descrito proteínas de plantas con esta actividad. Un ejemplo de ello son las Proteínas Inactivadoras de Ribosomas (Ribosome-Inactivating Protein, por sus siglas en inglés “RIPs”). Las RIPs son una familia de toxinas que inhiben de forma irreversible y específica la síntesis de proteínas en las células eucariotas (Walsh *et al.*, 2013). Estas proteínas se han relacionado con la defensa de las plantas, ya que, presentan actividad insecticida, antiviral, antibacteriana y antifúngica (Zhu *et al.*, 2018). En muchos casos, las RIPs escinden una adenina específica ubicada en el bucle α -sarcina/ricina (α -SRL) del ARNr (Figura 3). Esto ocasiona la inhibición de la unión del factor de elongación y, por lo tanto, la inhibición de la síntesis de proteínas (Kocyigit *et al.*, 2023).

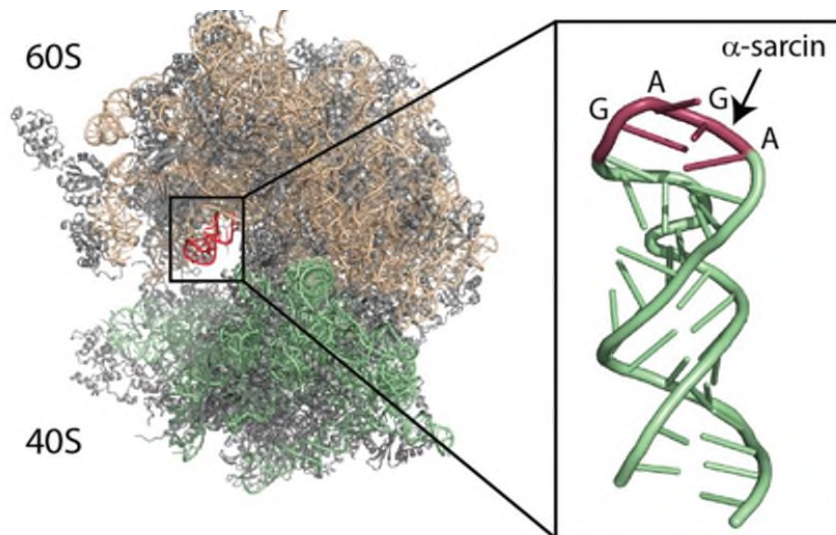


Figura 3. Representación de la estructura del ribosoma eucariota, la flecha señala el enlace que escinden las RIPs en bucle α -sarcina/ricina (α -SRL) del ARNr. Recuperado de: Olombrada *et al.*, 2020

Existen 3 tipos principales de RIPs: tipo I, tipo II y tipo III (Maqsood *et al.*, 2021). Las RIPs **tipo I** están formadas por una sola cadena de aminoácidos que contiene un dominio con actividad RNA N-glicosidasa y presentan un peso molecular entre los 23 y 35 kDa. Por otro lado, las RIPs **tipo II** se conforman por dos cadenas: una cadena similar a la de las RIPs tipo I y una cadena de lectina combinada con glicoproteínas (Puri *et al.*, 2009). Estas RIPs presentan un peso molecular entre

los 56 y 65 kDa (Puri *et al.*, 2012). Ambas tipos de RIPs han sido localizadas en hojas, semillas y raíces de las plantas. Por otro lado, Reinbothe *et al.* (1994) propusieron un tercer tipo de RIP llamada JIP60. Esta RIPs **tipo III** está formada por dominio amino terminal (semejante al de las RIPs I) unido a un dominio carboxilo terminal y presenta un peso molecular de 60 kDa (Puri *et al.*, 2012). Walsh *et al.* (2013) argumentaron que las RIPs II son más tóxicas que las RIPs I. Esto debido a que, a diferencia de las RIPs I, las RIPs II poseen el dominio B que promueve la entrada a las células objetivo, lo cual les otorga una mayor toxicidad.

1.5. Familias de plantas que producen RIPs

Hasta ahora, todos los genes vegetales clonados y todas las RIPs vegetales purificadas se han obtenido de plantas con flores (Peumans & van Damme, 2010). Además, gracias a un análisis filogenético se ha demostrado que las RIPs de las angiospermas comparten un ancestro común de las RIPs I de las monocotiledóneas modernas (Bolognesi *et al.*, 2016). Anteriormente, las RIPs I solían subdividirse en tres grupos. En el primero se encontraban las RIPs de numerosas dicotiledóneas de especies como: *Amaranthaceae*, *Cucurbitaceae* y *Phytolaccaceae*; en el segundo grupo se encontraban las RIPs aisladas de plantas de la familia *Poaceae* y en el tercer grupo se encontraban plantas de la subfamilia *Panicoideae* y también *Poaceae* (específicamente en *Z. mays*) (Peumans & van Damme, 2010). Recientemente, Dougherty & Hudak, (2022) realizaron un análisis filogenético sobre la evolución de la RIPs en plantas. A partir de los resultados, descubrieron 15 categorías para clasificar estas proteínas. Además, informaron que la familia *Amaranthaceae*, perteneciente al orden *Caryophyllales*, posee alrededor de 50 RIPs identificadas (Figura 4).

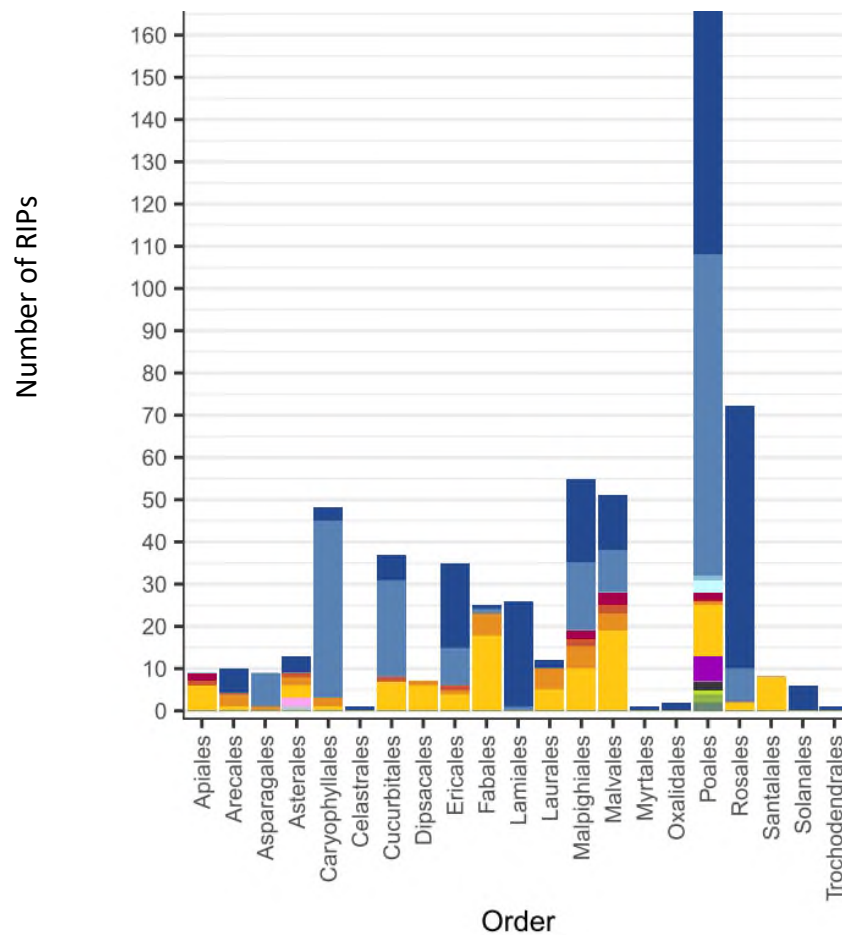


Figura 4. Número de RIPs para cada orden de plantas. Cada tipo de RIPs es representada por un color de acuerdo a la clasificación propuesta por los autores. Recuperado de: Dougherty & Hudak, 2022.

1.6. Antecedentes de proteínas con actividad antiproliferativa

En la Tabla 1 se observa una lista de proteínas RIPs que presentan actividad antiproliferativa en diferentes tipos de tumores, así como la planta fuente, su peso molecular y el punto isoeléctrico (pI). Estas proteínas con actividad antiproliferativa, se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal.

Tabla 1. Proteínas RIPS de plantas que presentan actividad antiproliferativa

RIP	Planta	Familia	Género	Peso Molecular (kDa)	pI
RIPs Tipo I					
Amaranthin	<i>Amaranthus viridis</i> L.	Amaranthaceae	<i>Amaranthus</i>	30	9.8
Balsamin	<i>Momordica balsamina</i> L.	Cucurbitaceae	<i>Momordica</i>	28	N/A
Bougainin	<i>Bougainvillea spectabilis</i>	Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea</i>	26	9.6
Lychnin	<i>Lychnis chalconica</i>	Caryophyllaceae	<i>Silene</i>	≈30	N/A
MAP30	<i>Momordica charantia</i>	Cucurbitaceae	<i>Momordica</i>	30	N/A
α-Momorcharin	<i>Momordica charantia</i>	Cucurbitaceae	<i>Momordica</i>	30	9
β-Momorcharin	<i>Momordica charantia</i>	Cucurbitaceae	<i>Momordica</i>	29	9
Cochinin	<i>Momordica cochinchinensis</i>	Cucurbitaceae	<i>Momordica</i>	28	N/A
Gelonin	<i>Gelonium multiflorum</i>	Euphorbiaceae	<i>Euphorbiaceae</i>	30	8.15
Trichosanthrin	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Cucurbitaceae	<i>Trichosanthes</i>		N/A
Heterotepalins	<i>Phytolacca heterotepala</i>	Phytolaccaceae	<i>Phytolaccaceae</i>	28-36	8.5-9.5
Sodins	<i>Salsola soda</i> L.	Amaranthaceae	<i>Salsola</i>	≈29	N/A
Quinoín	<i>Chenopodium quinoa</i>	Amaranthaceae	<i>Chenopodium</i>	29.5	N/A
RIPs Tipo II					
Lanceolin	<i>Adenia lanceolata</i>	Passifloraceae	<i>Adenia</i>	61	N/A
Stenodactylin	<i>Adenia stenodactyla</i>	Passifloraceae	<i>Adenia</i>	63	N/A
Foetidissimin II	<i>Cucurbita foetissima</i>	Cucurbitaceae	<i>Cucurbita</i>	61	N/A
Ebulin I	<i>Sambucus ebulus</i> L.	Adoxaceae	<i>Sambucus</i>	56	N/A
Mistletoe	<i>Viscum album</i>	Santalaceae	<i>Viscum</i>	65	N/A
Articulatin D	<i>Viscum articulatum</i>	Santalaceae	<i>Viscum</i>	66	5.4
Cinnamomin	<i>Cinnamomum camphora</i>	Lauraceae	<i>Cinnamomum</i>	61	N/A

Nota. pI = punto isoeléctrico; N/A = no disponible. Modificado de: Puri et al., 2012

Existen reportes de RIPs extraídas de diferentes plantas que presentan actividad citotóxica en distintas líneas celulares cancerosas. Un antecedente de ello es el estudio de *Rybak et al.* (1994), en el cual se aisló la proteína MAP30 (RIP I) de *Momordica charantia*, perteneciente a la familia *Cucurbitaceae*, y se demostró su actividad citotóxica en líneas celulares tumorales humanas de riñón, pulmón y de mama. Por otro lado, *Kishida et al.*, (1983) reportaron la extracción de una proteína designada como luffin, purificada de semillas de *Luffa cylindria roem*, planta perteneciente a la familia *Cucurbitaceae* e informaron que inhibía la síntesis proteica en reticulocitos de conejo. En este sentido, *Liu et al.* (2010) estudiaron el efecto de la proteína α -luffin (RIP I) recombinante en las líneas celulares cancerosas: JEG-3 (coriocarcinoma humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular) y MCF-7 (cáncer de mama), y observaron actividad citotóxica. Los investigadores concluyeron que α -luffin posee actividad antitumoral. Otro ejemplo es la proteína aislada de semillas de *Momordica charantia*, la cual fue denominada α -Momorcharin (α -MMC) (*Yeung et al.*, 1986). Además, *Ng et al.*, (1994) encontraron que la α -MMC mostraba una fuerte actividad citotóxica en células de coriocarcinoma y células de melanoma. Asimismo, *Girbés et al.* (1993) reportaron la purificación de una proteína nombrada Nigrin b, extraída de *Sambucus nigra L*, planta perteneciente a la familia *Adoxaceae*. En este aspecto, *Muñoz et al.* (2001) compararon el efecto citotóxico de la Nigrin b con la Ricin (ambas RIP II) en diversas líneas celulares cancerosas. Encontraron que la Nigrin b causaba una pérdida en la viabilidad celular y, comparada con la Ricin, mostraba una citotoxicidad menor.

Si bien, las proteínas mencionadas anteriormente provienen de plantas que no pertenecen a la familia *Amaranthaceae*, existen algunos reportes sobre RIPs provenientes de plantas de esta familia. Por ejemplo, *Kwon et al.* (1997) reportaron a la Amaranthin (Tabla 1), una RIP tipo I extraída de hojas de *Amaranthus viridis L*. Se encontró que la Amaranthin tenía una fuerte actividad inhibitoria de síntesis proteica a bajas concentraciones en reticulocitos de conejo, ya que, el IC_{50} sucedía con una concentración de 25 pM de Amaranthin. Asimismo, *Rotondo et al.* (2021) informaron sobre el aislamiento de la Quinoín, una RIP tipo I, extraída de *Chenopodium quinoa*. Además, se encontró que la Quinoín mostraba una alta citotoxicidad en ensayos con dos líneas celulares primarias de glioblastoma; siendo el IC_{50} un valor muy bajo de aproximadamente 5 nM. Por otra parte, *Landi et al.* (2022) describieron 3 nuevas RIPs tipo I (Sodin 5, Sodin eL, Sodin R) con un PM aproximado de 29 kDa, aisladas de *Salsola soda L*. De igual forma, se encontró que

las nuevas RIPs exhibían efectos citotóxicos en las líneas celulares HeLa y COLO 320, y también inhibían la síntesis de proteínas en reticulocitos de conejo. La IC₅₀ para el efecto citotóxico se encontraba entre 0.41-1200 nM, mientras que, para la inhibición de síntesis de proteínas, oscilaba entre 4.83-79.31 pM.

1.7. Antecedentes de plantas *Amarantheaceae* con RIPs

En la literatura se pueden encontrar estudios de plantas *Amarantheaceae* utilizadas en la medicina tradicional. En la Tabla 2, se encuentran plantas *Amarantheaceae* de las cuales, además de uso tradicional, se ha reportado la producción de RIPs, la mayoría de ellas del tipo I con peso molecular de 25 a 31 kDa.

1.8. Antecedentes de péptidos con actividad antiproliferativa

Existen reportes de péptidos extraídos de diferentes plantas *Amarantheaceae* que muestran actividad citotóxica en distintas líneas celulares cancerosas. Por ejemplo, Quiroga *et al.* (2015) estudiaron el efecto del aislado proteico de *Amaranthus mantegazzianus* en células de osteosarcomas de rata y encontraron que este aislado proteico tenía la capacidad de inhibir la proliferación en esta línea celular. Esta actividad antiproliferativa fue atribuida a péptidos de lectina con un peso molecular entre 20 y 45 kDa, además la concentración de péptidos que mostró una mayor actividad fue de 0.1 mg/mL. De igual modo, Hasan *et al.* (2021) reportaron el aislamiento de una glicoproteína denominada AGL con un peso molecular de 15 kDa proveniente de *Amaranthus gangeticus*. Encontraron que AGL inhibió la proliferación de células de carcinoma de ascitis de Ehrlich con concentraciones desde 8 hasta 64 µg/ml. Por otro lado, Silva-Sánchez *et al.* (2008) informaron sobre la presencia de un péptido con propiedades anticancerígenas. En dicho trabajo se extrajeron diferentes fracciones proteicas de semillas de *Amaranthus hypochondriacus*. Posteriormente, estas fracciones fueron sometidas a una digestión enzimática encontrando que la fracción de la glutelina (18.5 kDa), después de la digestión con tripsina mostró actividad apoptótica en la línea celular HeLa con concentraciones desde 1 hasta 5 µg/mL. Por otra parte, Sabbione *et al.* (2019) siguieron una estrategia similar. Sometieron aislados proteicos de *Amaranthus mantegazzianus* a una digestión gastrointestinal simulada, y encontraron que las

proteínas y péptidos obtenidas de la digestión exhibían actividad antiproliferativa en células tumorales HT-29 con concentraciones desde 0.15 hasta 2 mg proteína soluble/mL.

Tabla 2. Plantas de la familia *Amaranthaceae* utilizadas en la medicina tradicional y las RIPs identificadas

Planta	RIP Reportada	Tipo de RIP	Usos tradicionales de la planta	PM (kDa)	Referencia
<i>Beta vulgaris</i> L.	Betavulgin	Tipo I	Trastornos renales	30	Hornung <i>et al.</i> , 1996; el Gamal <i>et al.</i> , 2014
<i>Amaranthus viridis</i> L.	Amaranthin	Tipo I	Diurético, laxante, inflamación, tratamiento de la disentería	30	Kwon <i>et al.</i> , 1997
<i>Celosia cristata</i>	CCP-25	Tipo I	Antiinflamatorio y antinociceptivo	25	Balasubrahmanyam <i>et al.</i> , 2000; Islam <i>et al.</i> , 2016
<i>Celosia cristata</i>	CCP-27	Tipo I	Antiinflamatorio y anti-nociceptivo	27	Balasubrahmanyam <i>et al.</i> , 2000; Islam <i>et al.</i> , 2016
<i>Spinacia oleracea</i> L.	BP31	Tipo I	Laxante, antiinflamatorio y carminativo	31	Ishizaki <i>et al.</i> , 2002; Garg <i>et al.</i> , 2010
<i>Amaranthus tricolor</i>	AAP-1	Tipo I	Diabetes, disentería, anemia, enfermedades de la piel	27	Roy <i>et al.</i> , 2006; Rahmatullah <i>et al.</i> , 2013
<i>Chenopodium quinoa</i>	Quinoin	Tipo I	Disentería, ántrax, herpes, urticaria, resfriado, neumonía	29.5	Ragucci <i>et al.</i> , 2021; Zalles A & de Lucca D, 2006
<i>Salsola soda</i> L.	Sodins	Tipo I	Antibacteriano, hipotensor y enfermedades de la piel	≈29	Landi <i>et al.</i> , 2022; Murshid <i>et al.</i> , 2022

Modificado de: Polito *et al.*, 2016.

1.9. Posibles aplicaciones terapéuticas de las RIPs

El uso de estas proteínas como tratamiento terapéutico para el cáncer ha generado un gran interés en los últimos años. Hasta ahora, se han descrito dos posibles estrategias para utilizar las RIPs este modo: la clonación en vectores plasmídicos y la generación de inmunotoxinas. La primera estrategia consiste en el diseño de un constructo (Figura 5a) conformado por un vector que contiene la secuencia de la RIP. Al administrar este constructo directamente a las células cancerosas, se produce la proteína con actividad citotóxica intracelularmente, lo que resulta en la muerte celular (Ardini *et al.*, 2022). Un ejemplo de esta estrategia es el trabajo de Alford *et al.* (2009), quienes clonaron la secuencia de la α -Sarcina (RIP tipo I) en el vector pcDNA3.1. Los autores observaron una disminución en la viabilidad celular en las células HeLa transfectadas con el constructo. De forma similar, Zarovni *et al.* (2007) diseñaron el constructo pCI-SAP, conformado por el plásmido pCISfiRsrT y la secuencia de la Saporina (RIP tipo I). La transfección del constructo mostró actividad citotóxica en células de melanoma B16 y redujo significativamente el crecimiento tumoral. Algunas de las RIPs comúnmente estudiadas en esta estrategia son: la Lunasina, la Ricina y la Saporina (Glinka, 2013). Un antecedente a esta estrategia es el trabajo de Zhang *et al.* (2014), quienes clonaron la secuencia de la proteína Tricosantina (TCS) (RIP I) en un vector rAAV. Posteriormente, transfectaron a las líneas celulares de cáncer humano: HeLa, Huh7 y T47D. Sus resultados revelaron que la expresión intracelular de la TCS mostró actividad citotóxica en todas las líneas celulares de cáncer evaluadas, al inducir diversas vías de apoptosis. De este modo, los investigadores concluyeron que el uso de constructos de RIPs representa una estrategia terapéutica con un alto potencial para el tratamiento de cánceres humanos.

Por otro lado, las inmunotoxinas (InT) (Figura 5b) son híbridos formados por un anticuerpo acoplado química o genéticamente a una toxina proteica. El anticuerpo es capaz de unirse a una molécula diana en la superficie de la célula cancerosa y facilita la internalización de la toxina para destruir la célula (Flavell & Flavell, 2022). Esta estrategia es muy versátil, ya que se pueden seleccionar diferentes moléculas diana que se expresan en las células cancerosas (Maqsood *et al.*, 2021). Entre las RIPs más estudiadas para el diseño de inmunotoxinas se encuentran: la Bouganina, la Gelonina, la Momordina, la Ricina A y la Saporina (Glinka, 2013). Estas dos estrategias poseen importantes beneficios potenciales, tales como la especificidad y la versatilidad.

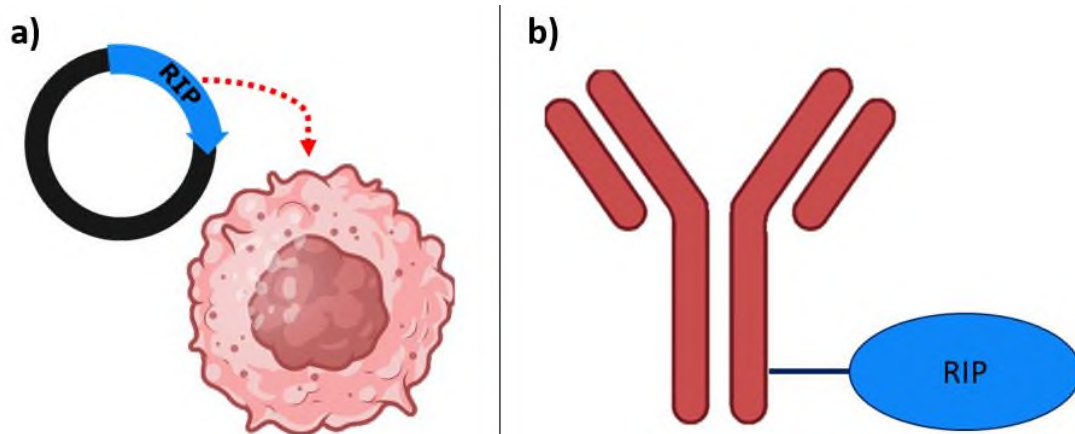


Figura 5. Esquemas generales de las posibles aplicaciones terapéuticas de las RIPs en el tratamiento del cáncer: a) clonación de la secuencia de la RIP en vectores plasmídicos b) generación de inmunotoxinas formadas por un anticuerpo y una RIP.

1.10. Antecedentes del grupo de trabajo

En el grupo de trabajo, Anaya-Esteban (2022) utilizó el protocolo descrito por Niu *et al.* (2018) para la extracción de proteínas de hojas y raíces de *Tecoma stans*. El método de TCA/Acetona mostró la mayor concentración de proteína extraída en comparación con otros métodos de extracción utilizados. Además, la separación de las proteínas de extracto de hojas por electroforesis SDS-PAGE proporcionó bandas bien definidas con pesos moleculares entre 20 y 85 kDa. Se evaluó la actividad citotóxica de las bandas de 28, 30 y 32 kDa contra la línea celular de cáncer de mama MDA MB 231, observando una pérdida de la viabilidad celular del 40% solo con las proteínas pertenecientes a la banda de 28 kDa.

2. Justificación

El cáncer es una de las enfermedades más preocupantes del mundo. En 2020, fue la principal causa de muerte a nivel mundial, con 10 millones de defunciones, además, en 2021 se registraron 20 millones de nuevos casos (WHO, 2022a; WHO, 2023). Más aún, la Organización Mundial de la Salud estima que los casos de esta enfermedad se incrementarán en los próximos años y la cifra llegará a los 30.2 millones en el año 2040; esto supone un aumento del 47% en comparación con los casos del 2020 (19.3 millones) (WHO, 2022b). Las terapias existentes para el cáncer presentan una serie de efectos secundarios en los pacientes que las reciben. Debido a esto, es de gran importancia el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas que sean dirigidas y efectivas.

Las plantas han sido una gran fuente para la obtención de nuevos fármacos y algunas de ellas tienen un potencial que no ha sido explotado, concretamente, las plantas de la familia *Amaranthaceae*, ya que, se ha reportado que esta familia de plantas expresa péptidos y proteínas que tienen actividad citotóxica contra líneas celulares cancerosas. Una de las plantas, perteneciente a la familia *Amaranthaceae*, que posiblemente podría expresar estas proteínas y péptidos es *Alternanthera dentata* (L.) Kuntze. Algunas especies de este género han sido empleadas tradicionalmente para el tratamiento del cáncer (Singla *et al.*, 2022). La búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento del cáncer permite proponer a *A. dentata* como una potencial fuente para identificar y caracterizar nuevos péptidos. Hasta el momento, en la literatura no existen estudios al respecto. La identificación y caracterización de estos péptidos y proteínas podría sentar las bases para un posible tratamiento contra el cáncer, además establecería el primer paso hacia la búsqueda de nuevas proteínas o péptidos con actividad antiproliferativa, explorando el potencial de las plantas de la Cuenca del Papaloapan.

3. Hipótesis:

Las hojas de *Alternanthera dentata* (L.) Kuntze expresan proteínas que poseen actividad antiproliferativa en contra de la línea celular MCF-7.

4. Objetivos:

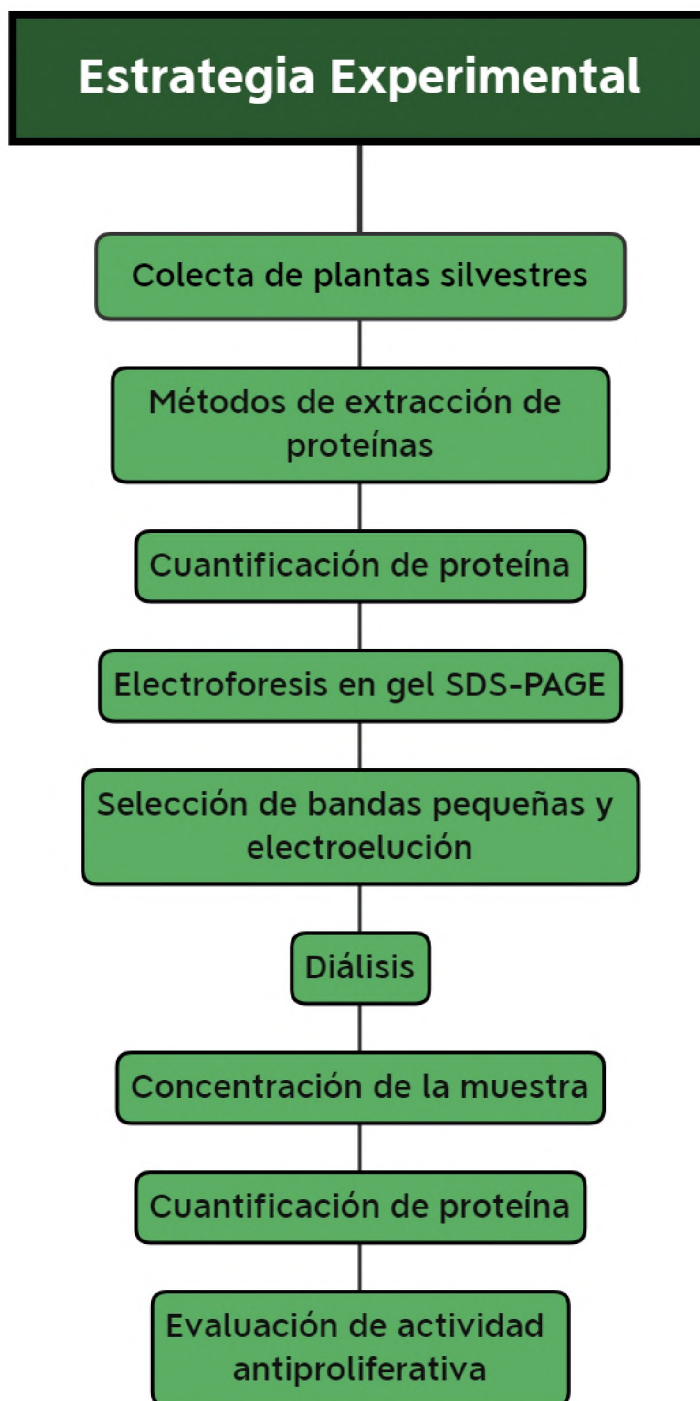
4.1 Objetivo general:

Evaluar la actividad antiproliferativa de proteínas de bajo peso molecular provenientes de las hojas de *Alternanthera dentata* (L.) Kuntze.

4.2 Objetivos específicos:

1. Extraer proteína total soluble de hojas juveniles y maduras de *Alternanthera dentata* (L.) Kuntze.
2. Separar y purificar las bandas pequeñas del perfil proteico observadas en el gel SDS-PAGE (17-35 kDa).
3. Evaluar si las bandas proteicas seleccionadas poseen actividad antiproliferativa.

5. Diagrama experimental



6. Materiales y Métodos

6.1 Colecta del material vegetal

Se colectaron hojas frescas de *Althernanthera dentata* en San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, en las coordenadas: 18.013109, -96.171495. Las hojas juveniles (HJ) y maduras (HM) de la planta (Figura 6), se limpiaron y desinfectaron de posibles contaminaciones. Posteriormente, se trasladaron en nitrógeno líquido al laboratorio para almacenar las muestras a -20 grados hasta su posterior uso.

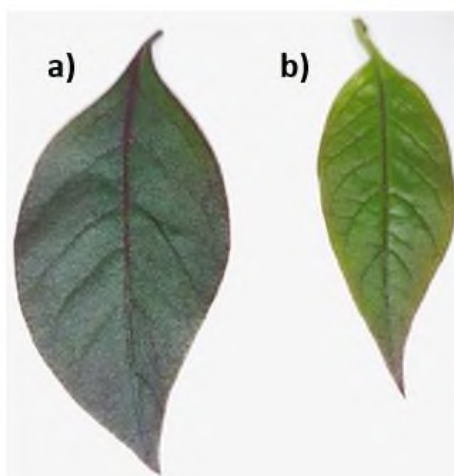


Figura 6. Hojas de *A. dentata*: a) hojas maduras y b) hojas juveniles.

6.2 Extracción/precipitación de proteínas por distintas metodologías

6.2.1 Método con TCA/acetona

Para la extracción de proteína total, se utilizó el método de TCA/Acetona (TCA/A) de Niu *et al.* (2018), tal como fue descrito previamente por Anaya-Esteban, (2022).

Primero se colocaron 500 mg de hojas de *A. dentata* en un mortero preenfriado con nitrógeno líquido para molerlas hasta obtener un polvo fino. Posteriormente, en un microtubo de 1.5 mL se agregó el polvo fino obtenido con 1 mL de solución de extracción. La solución de extracción estuvo compuesta por SDS al 1%, 0.1 M de Tris-HCl (pH 6.8), 2 mM de EDTA- Na_2 , 20 mM de DTT y 1 μL /1 mL de Cóctel de Inhibidor de proteasas (P9599-Sigma). Después de homogenizar el polvo fino con la solución de extracción, se colocó el microtubo en hielo durante 15 minutos. Finalizados estos 15 minutos, se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min a 4°C. Después de la centrifugación se colocó el extracto (sobrenadante) en tubos nuevos con una relación 1:1 de extracto proteico y una mezcla de TCA/acetona (20:80 v/v). Esta nueva disolución se dejó incubar durante una noche

a -20 °C. Posteriormente se llevó a cabo una centrifugación a 12,000 rpm durante 5 min a 4°C. Finalizada la centrifugación se lavó el precipitado de proteína con acetona al 80%. Después del lavado, nuevamente se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 min a 4°C. Asimismo, se añadió Ditiotreitolo 5mM (TCA/A-DTT) y β-mercaptoetanol 0.07% (v/v) (TCA/A-βm) a la acetona y al TCA/A empleados en la precipitación, de acuerdo con lo indicado por Niu *et al.* (2018) y por Natarajan *et al.* (2005), respectivamente. El pellet obtenido se dejó secar durante 10 minutos para que la acetona se volatilizará. El pellet proteico se recuperó en el buffer de rehidratación (1632105, Bio-Rad) y nuevamente se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 2 min. Finalmente, se recuperó la proteína soluble y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Se utilizó la centrifuga HETTICH UNIVERSAL 320 para llevar a cabo la metodología.

6.2.2 Método con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄)

Para la extracción de proteína total se utilizó la metodología de extracción/precipitación mediante (NH₄)₂SO₄ descrita por Anaya-Esteban, (2022) y por Akyüz & Ersus, (2021) para la extracción de proteínas en *Beta vulgaris* L.

En primer lugar, se colocaron 500 mg de hojas de *A. dentata* en un mortero preenfriado con nitrógeno líquido y se molieron hasta obtener un polvo fino. Durante este proceso se agregó polivinilpolipirrolidona (PVPP) para una concentración final del 1.5% (P/P biomasa) para inhibir la oxidación enzimática. A continuación, se añadió 1 mL de solución de extracción compuesta por: buffer de fosfatos a pH 7.5 (0.1 M), cloruro de potasio (1 mM) y EDTA (2 mM), se mantuvo la mezcla a 4°C durante 2 horas. Finalizado el periodo de tiempo, se centrifugó a 4,500 rpm a 4 °C por 10 min. Luego, se agregó una solución al 85% de (NH₄)₂SO₄ al sobrenadante y se mantuvo en agitación a 4°C durante 60 min. Posteriormente, se filtró la mezcla y se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 10 min. Finalmente, el pellet obtenido se rehidrató con buffer de fosfatos y se almacenó a -20 grados hasta su posterior uso. Se utilizó la centrifuga HETTICH UNIVERSAL 320 para llevar a cabo la metodología.

6.2.3 Método de TRI-Reagent (Sigma-93289)

Para la extracción de proteína total se utilizó la metodología de extracción/precipitación de TRI-Reagent descrita por Anaya-Esteban, (2022) y siguiendo el protocolo del proveedor.

Primero, se colocaron 250 mg de hojas de *A. dentata* en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido, y se molieron hasta obtener un polvo fino. Enseguida, se añadió 1 mL de solución de TRI-Reagent, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente 10 min. A continuación, la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 10 min. Al sobrenadante resultante, se añadieron 200 µL de cloroformo, mezclándolo durante 20 seg. Acto seguido, se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 15 min, obteniendo un pellet. A este pellet obtenido, se añadieron 300 µL de etanol y se mezclaron por inversión, dejándolo incubar durante 3 min. Después, se centrifugó a 4,500 rpm a 4°C por 5 min. Al sobrenadante obtenido se añadieron 1.5 mL de isopropanol y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 15 min. El nuevo pellet obtenido se lavó agregando 500 µL de etanol al 99% y agitando fuertemente; posteriormente, se centrifugó a 8,650 rpm a 4°C durante 5 min. Este proceso se repitió 3 veces. Finalmente, el pellet obtenido se dejó secar hasta evaporar todo el etanol, se resuspendió en 50 µL de buffer de rehidratación y se almacenó a -20 grados hasta su posterior uso. Se utilizó la centrifuga HETTICH UNIVERSAL 320 para llevar a cabo la metodología.

6.2.4 Extracción metanólica ácida

Para la extracción de proteína total se acoplaron las metodologías de Poovitha & Parani, (2020) y de Yibchok-Anun *et al.*, (2006).

Primero se colocaron 500 mg de hojas *A. dentata* en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido, y se molieron hasta obtener un polvo fino. Enseguida se agregó al polvo 4.5 mL de una solución de metanol y ácido sulfúrico (1 M) en una relación 9:1, respectivamente. A continuación, se filtró la mezcla y el líquido se centrifugó a 11,396 rpm a 4°C por 10 min. Posteriormente, se ajustó el pH del sobrenadante a 3.0 utilizando Tris-base y se agregaron 4 volúmenes de acetona; la mezcla se mantuvo en refrigeración durante 24 h. Finalizado este periodo de tiempo, se centrifugó a 11,396 rpm a 4°C por 10 min. Al pellet obtenido se añadió acetona al 80% y se mezcló, luego se centrifugó a las condiciones mencionadas previamente. Finalmente, se dejó evaporar la acetona del pellet, se disolvió en buffer de Tris-base a pH 8.0 (10 mM) y se almacenó a -20 grados hasta su posterior uso. Se utilizó la centrifuga Thermo Scientific® Megafuge 16 para llevar a cabo la metodología.

6.2.5 Kit de extracción de proteína total de plantas (Sigma-Aldrich PE0230)

Para la extracción de proteína total se utilizó la metodología de extracción/precipitación del plant total protein extraction kit descrita por Anaya-Esteban, (2022).

Primero se colocaron 250 mg de hojas *A. dentata* en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido, y se molieron hasta obtener un polvo fino. Enseguida, se añadieron 1.5 mL de metanol y cóctel Inhibidor de proteasas (P9599-Sigma) en una relación 1:100. Luego, se agitó la mezcla y se incubó a -20°C por 5 min. Al finalizar el tiempo de incubación, se centrifugó a 5,500 rpm a 4°C durante 10 min y se descartó el sobrenadante; este procedimiento de adición de metanol se repitió 3 veces. Posteriormente, se dejó secar el pellet resultante de la centrifugación y se añadieron 1.5 mL de acetona, mezclándolos. Después, se incubó a -20°C por 5 min y se centrifugó a 5,500 rpm a 4°C durante 10 min; estos pasos se repitieron una vez más. El nuevo pellet obtenido se dejó secar hasta evaporar la acetona y se le añadieron 4 μL de reactivo de trabajo por cada 250 mg de hoja, para resuspender el pellet. Posteriormente, se dejó incubar por 15 min a temperatura ambiente con agitación intermitente. Finalizado el periodo de incubación se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 30 min. Finalmente, se recuperó el sobrenadante para obtener la proteína total soluble y se almacenó a -20 grados hasta su posterior uso. Se utilizó la centrifuga HETTICH UNIVERSAL 320 para llevar a cabo la metodología.

6.3 Cuantificación de proteína

6.3.1 Kit 2D Quant

Para la cuantificación de proteína con el Kit 2D Quant (GE80-6483-56, Cytiva) se siguieron las instrucciones del proveedor. Además, se preparó una curva estándar de BSA (5000206, Bio-Rad) con concentraciones desde 0 hasta 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, para analizar la muestra se agregaron 500 μL de precipitante a una disolución de 5 μL de extracto proteico y 45 μL de agua desionizada. Enseguida, esta disolución se mezcló durante 2-3 min. A continuación, se agregaron 500 μL de co-precipitante y se mezcló brevemente la disolución. Posteriormente se centrifugó a 12,740 rpm durante 5 min. Finalizada la centrifugación, el sobrenadante se retiró y al pellet obtenido se agregaron 100 μL de disolución de cobre y 400 μL de agua destilada y se agitó la mezcla hasta disolver la proteína precipitada. A continuación, se agregaron 1 mL de reactivo de color (reactivo A más reactivo B) y se dejó incubar la mezcla durante 15-20 min. Finalmente, se leyó la

absorbancia a 480 nm. La cantidad de proteína se estimó utilizando la curva estándar previamente generada. Se utilizó la centrifuga HETTICH UNIVERSAL 320 para llevar a cabo la metodología.

6.3.2 Ensayo de Bradford

Para la cuantificación de proteína utilizando el reactivo de Bradford (B6916, Sigma-Aldrich). se siguieron las instrucciones del proveedor. Se preparó una curva estándar de BSA (5000206, Bio-Rad) con concentraciones desde 50 hasta 1,400 µg/mL.

Se utilizaron 50 µL muestras con diferentes concentraciones, se añadió 1.5 mL de reactivo de Bradford y se mezcló por inversión. Posteriormente, se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 min. Finalizado el periodo de incubación, se midió la absorbancia a 595 nm. La cantidad de proteína se estimó utilizando la curva estándar previamente generada.

6.4 Electroforesis en Gel SDS- PAGE al 12 y 15%

Cada una de las muestras de proteína que se obtuvieron a partir de las hojas de *A. dentata* se sometieron a una electroforesis SDS-PAGE. Se utilizaron dos porcentajes diferentes de gel (12 y 15%) con la finalidad de obtener una mejor resolución y nitidez de las muestras proteicas, lo cual permitió la selección y recuperación de bandas de bajo peso molecular (17-35kDa). Primero se preparó el buffer de electroforesis 10 X Tris Glicina (Tabla 3). Posteriormente se prepararon las disoluciones para el gel de corrida Acrilamida/Bisacrilamida (Tabla 4) y para el gel concentrador (Tabla 5). Para generar el gel SDS-PAGE, se montó el sistema de electroforesis con dos placas de vidrio separadas. Luego, en un recipiente se mezclaron los componentes: acrilamida 30%, Tris·HCl 1.5 M (pH 8.8), H₂O desionizada y SDS 10%. Enseguida se agregaron los catalizadores: persulfato de amonio y TEMED y se homogenizó la solución. Inmediatamente, se vertió la mezcla entre las placas de vidrio y se dejó polimerizar. Se realizó el mismo procedimiento para el gel concentrador, sin embargo, al colocar la mezcla entre las placas de vidrio se colocó un peine para formar los pocillos donde se cargaron las muestras.

Tabla 3. Buffer de electroforesis 10 X Tris Glicina pH 8.3.

Componente	Contenido
Tris base	30 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
Disolver en 800 mL de agua destilada	

El pH fue ajustado utilizando HCl concentrado.

Tabla 4. Disoluciones para gel de corrida Acrilamida/Bisacrilamida al 12% y 15%.

Soluciones Stock	Gel (11%)	Gel (12%)	Gel (15%)
Acrilamida 30% (ml)	1.83	2.00	2.50
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 (ml)	1.25	1.30	1.30
H ₂ O desionizada (ml)	1.82	1.60	1.10
SDS 10% (ml)	0.05	0.05	0.05
Persulfato de amonio 10% (ml)	0.02	0.02	0.02
TEMED (ml)	0.01	0.01	0.01
Volumen total (ml)	4.98	4.98	4.98

Fuente: PMDA, 2010.

Tabla 5. Disoluciones para la preparación del gel concentrador

Preparación Stacking (3 mL)	
Disoluciones Stock	
Acrilamida 30% (ml)	0.500
Tris-Cl 1.5 M, pH 6.8 (ml)	0.380
H ₂ O desionizada (ml)	2.100
SDS 10% (ml)	0.025
Persulfato de amonio 10% (ml)	0.010
TEMED (ml)	0.005
Volumen total (ml)	3.020

Fuente: PMDA, 2010.

Se mezcló la proteína soluble con el buffer de carga y se dejó incubar en un termobloque a 95°C por 5 min. Posteriormente se cargaron las muestras en el gel colocando 30 µg de proteína soluble en cada pozo y 3 µl del marcador de peso molecular. Finalmente, el gel de Acrilamida/Bisacrilamida se colocó en la cámara de electroforesis, primero a 70 v durante 20 min y después a 100 V por 90 min.

Por otra parte, se preparó la solución de tinción de azul brillante de Coomassie (Tabla 6) y la solución desteñidora de azul de Coomassie (Tabla 7). Transcurrido el tiempo de corrida del gel, este se colocó en una bandeja con la solución de tinción de azul brillante de Coomassie por lo menos durante 3 horas. Posteriormente, el gel se destiñó con una solución de metanol, ácido acético y agua en relación de 40:10:50, respectivamente. Este proceso se realizó durante 1 h, renovando la disolución cada 20 min. Al finalizar este periodo de tiempo, el gel desteñado se colocó en un transiluminador para observar las bandas obtenidas. Las bandas encontradas entre 17 y 35 kDa se recuperaron del gel, cortándolas y se mantuvieron en buffer de electroforesis 10 X y refrigeración hasta la electrolución.

Tabla 6. Disoluciones para la preparación de solución de tinción de azul de Coomassie.

Solución de tinción de azul brillante de Coomassie (1 L)		
Componentes	Concentración final	Cantidad
Metanol	40% (v/v)	400 mL
Ácido acético glacial	10% (v/v)	100 mL
Azul brillante Coomassie R-250	0.1% (w/v)	1 g
Agua destilada	-	500 mL

Fuente: Brunelle & Green, 2014

Tabla 7. Disoluciones para la preparación de solución desteñidora de azul de Coomassie.

Solución desteñidora de azul brillante de Coomassie (1 L)		
Componentes	Concentración final	Cantidad
Metanol	40% (v/v)	400 mL
Ácido acético glacial	10% (v/v)	100 mL
Agua destilada	-	500 mL

Fuente: Brunelle & Green, 2014

6.5 Electroelución de proteínas a partir de geles de poliacrilamida

Para la electrolución se siguieron las instrucciones del proveedor del electrofiltro modelo 422 de Bio-Rad (Dunn, 2004).

En primer lugar, se colocaron los Frits en la base de cada tubo de vidrio y luego se ubicó el tubo en el módulo del Electro-Eluter. A continuación, se colocó el tapón de membrana en la parte inferior de cada adaptador de silicona y se llenó el adaptador con buffer del elución previamente

enfriado, eliminando las burbujas de aire en la membrana de diálisis. Posteriormente, se llenó cada tubo con buffer de elución y se colocaron los pedazos de las tiras de gel. Luego, se llenó la cámara con 600 mL de buffer de elución y se mantuvo en agitación a 4°C, eluyendo a 10 mA durante 6 horas.

6.6 Diálisis

Para la diálisis, se emplearon las membranas de diálisis del proveedor Sigma-Aldrich (D6066), con un corte de peso molecular de 12 kDa.

Antes de cargar las muestras, se hidrataron las membranas y se cerró un extremo con un nudo. Luego, se cargaron las muestras en las membranas y se anudaron completamente. Estas bolsas de diálisis se sumergieron en buffer de fosfatos (50 mM), enfriado previamente. La diálisis se llevó a cabo a 4°C con agitación y el buffer se renovó cada 6 horas.

6.7 Concentración de la muestra

Después de la diálisis, se emplearon los dispositivo Amicon® Ultra-2 del proveedor Sigma-Aldrich (UFC201024), con un corte de peso molecular de 10 kDa.

Primero, se humedecieron las membranas con 1 mL de agua mQ y se centrifugó a 4,000 G durante 1 min a 4°C. Posteriormente, se retiró el agua, se añadió la muestra y se colocaron todas las piezas del dispositivo. Luego, se colocó el dispositivo en la centrifuga y se centrifugó a 4,000 G a 4°C durante 10 min. Finalizado el periodo de tiempo, se recogió la muestra y se desechó el filtrado. El dispositivo se lavó con 50 µL de PBS y se colocó invertido en la centrifuga. Se centrifugó a 1,000 G durante 2 min a 4°C. Finalmente, se recuperó la muestra. Se utilizó la centrifuga Thermo Scientific® Megafuge 16 para llevar a cabo la metodología.

6.8 Evaluación de actividad antiproliferativa

Para la evaluación de la actividad antiproliferativa se utilizó la línea celular de cáncer de mama hormono dependiente (MCF-7) del Laboratorio de Cultivo de Células Animales del Centro de Investigaciones Científicas de la Universidad del Papaloapan.

6.8.1 Ensayo del método de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

Para evaluar la actividad citotóxica de las proteínas purificadas, se sometieron 15, 000 células de la línea celular MCF-7, a diferentes concentraciones de las proteínas con un peso molecular entre 17-35 kDa durante 24 horas. Para elaborar la curva dosis-respuesta, se utilizó como referencia el estudio de Landi *et al.*, (2022), en el que se evaluó la actividad citotóxica de la Sodin 5 (RIP I) a distintas concentraciones en las células HeLa y COLO 320. Cabe mencionar que en dicho estudio se empleó la proteína purificada. Con el PM de la Sodin 5, se estimaron las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ de la curva dosis-respuesta, las cuales fueron: 29.000, 2.900, 0.290, 0.029 y 0.0029. De acuerdo a estas concentraciones se diseñó una curva dosis-respuesta diluyendo cada muestra 10 veces y tomando los volúmenes de: 1, 2, 4, 6, 8 y 10 μL y se aforaron a 10 μL .

Después del tiempo de incubación con las proteínas, se añadieron 10 μL de MTT al 5 mg/mL y se incubó por 4 horas en condiciones de cultivo: una atmosfera al 5% de CO_2 , a 37°C y con 95% de humedad relativa. Finalizado este tiempo, se retiró el medio y se agregaron 100 μL de isopropanol o DMSO para disolver los cristales de formazán generados. Posteriormente, se tomó una lectura de absorción a 595 nm y se graficó la absorbancia contra concentración celular. Se realizaron tres ensayos independientes para validar el efecto de las proteínas.

6.9 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, en el que se comparó el número de bandas obtenidas contra el tipo de hoja (HM y HJ) en la extracción mediante TRI-Reagent. La prueba Tukey con 95% de confianza fue aplicada al número de bandas obtenidas, con el objetivo de comprobar si existe una diferencia significativa en el número de bandas obtenidas por tipo de hoja. El software empleado para el análisis fue Minitab (versión de prueba gratuita).

7. Resultados y discusión

7.1 Métodos de extracción/precipitación de proteínas

Con el objetivo de realizar una extracción total de proteínas, se empleó el método de TCA/Acetona (TCA/A) propuesto por Niu *et al.* (2018) y descrito por Anaya-Esteban (2022). Sin embargo, al añadir la mezcla de TCA/A (en proporción 10/90) al extracto vegetal de la hoja madura en una relación 1:1, se generó un agregado. En la Figura 7a se puede observar dicho agregado, el cual muestra una consistencia gelatinosa y un color oscuro. El agregado fue retirado y se continuó con el protocolo de precipitación; sin embargo, al cuantificar la proteína recuperada se obtuvieron bajas concentraciones de proteína (2250.467 ug proteína/ mL). Se hipotetizó que el pH podría ser la causa de la formación del agregado, ya que el pH del sobrenadante era de 5.5. Por ello, se ajustó el pH a 7 antes de añadir TCA/A. Sin embargo, el agregado se formó nuevamente.

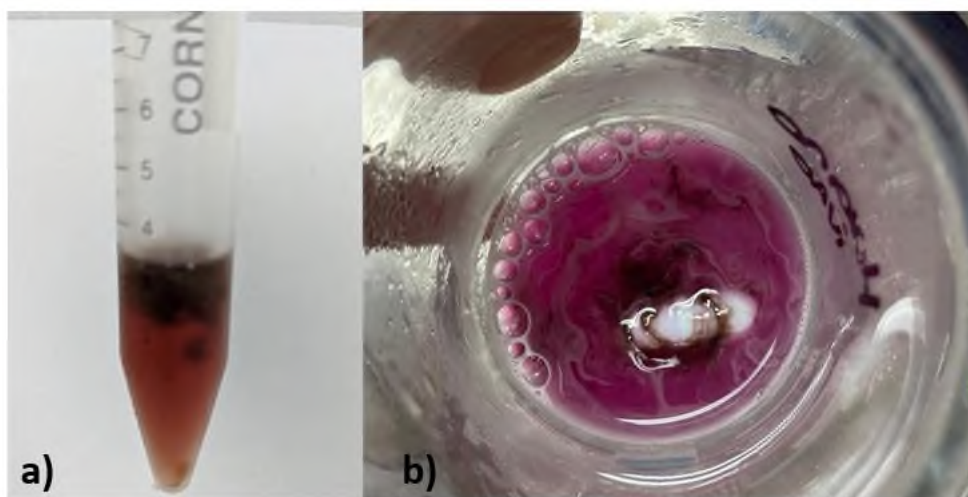


Figura 7. Formación de agregado al realizar la extracción de proteína total mediante a) TCA/Acetona y b) precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Para extraer proteínas y evitar la formación del agregado, se ensayaron diferentes metodologías de extracción de proteínas. Estas fueron: la precipitación con sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), la extracción/precipitación con TRI-Reagent, la extracción metanólica y la extracción mediante el plant total protein extraction kit. Al emplear la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se observó la formación del agregado al añadir la solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 7b) y no se detectó proteína en

la cuantificación. Con las demás metodologías, no se observó la formación del agregado. En el caso de la extracción/precipitación con TRI-Reagent, se cuantificó 1896.573 ± 113.696 μg proteína/mL para la HJ y 1282.866 ± 303.989 μg proteína/mL para HM. Por otro lado, en la extracción mediante el kit, se cuantificó 599.377 ± 84.687 μg proteína/mL para la HJ. En la Tabla 8 se resumen los diferentes métodos de extracción y las concentraciones cuantificadas.

Tabla 8. Cuantificación de proteína en extractos de HM y HJ de *A. dentata* utilizando el kit 2D Quant

Hoja de <i>A. dentata</i>	Método de Extracción	Concentración (μg proteína/ mL)
Madura	TCA/A- βm	2250.467
Madura	TCA/A-DTT	*ND
Madura	Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	*ND
Madura	Extracto crudo	1783.178
Madura	TRI-Reagent	1282.866 ± 303.989
Juvenil	Extracto crudo	*ND
Juvenil	TRI-Reagent	1896.573 ± 113.696
Juvenil	Kit Sigma-Aldrich PE0230	599.377 ± 84.687

*ND: no se detectó la presencia de proteína.

De acuerdo a la Tabla 8, el método de TRI-Reagent fue el que proporcionó el mayor contenido de proteína total soluble en HJ y el segundo en HM. Además, se observa una concentración de proteínas de 2,250 μg en el extracto obtenido con TCA/A- βm , sin embargo, en el gel de electroforesis SDS-PAGE se observa una banda semidefinida (Figura 8). En cambio, en el TCA/A-DTT no se detectó proteína. En el primer caso, posiblemente se obtuvo una sobrestimación de la cantidad de proteína debida a interferentes que producen color en los ensayos basados en la unión de iones cúpricos a las proteínas, como los aminoácidos individuales: cisteína o cistina, tirosina y triptófano (Herriott, 1941; Makkar *et al.*, 1980). En el caso de TCA/A-DTT, no se detectó la presencia de proteína probablemente debido a que el DTT habría quelado al cobre e impedido el ensayo (Thermo Fisher Scientific, 2023).

El fenómeno observado de la formación del agregado, coincide con lo reportado por Hashiguchi *et al.* (2021), quienes describieron que al precipitar con TCA/A se produjo un pellet pegajoso,

posiblemente debido a la abundante cantidad de polisacáridos que contiene *Opuntia Ficus-Indica*. Una posible explicación de este fenómeno es que la extracción/precipitación con TCA/Acetona da lugar a la coextracción de contaminantes poliméricos como: polisacáridos solubles de la pared celular y polifenoles en tejidos con altos niveles de estos (Rose *et al.*, 2004; Saravanan & Rose, 2004); estos compuestos son los que se polimerizan y forman el agregado. En la Tabla 9 se observa que las hojas de *A. dentata* presentan un alto contenido de azúcares reductores (81.07±0.23 mg/g) con respecto a otras especies del género (Preetha *et al.*, 2018); lo que podría ser la causa de la formación del agregado durante la extracción de proteína.

Tabla 9. Determinación del contenido de azúcares reductores presentes hojas de diferentes especies de *Alternanthera*

	Especie de <i>Alternanthera</i>				
	<i>A. philoxeroides</i>	<i>A. tenella</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>A. sessilis</i>	<i>A. dentata</i>
Azúcares reductores (mg/g)	14.86±0.12	15.61±0.04	27.02±0.10	56.12±0.20	81.07±0.23

Datos recuperados de: Preetha et al., 2018

En el caso de la extracción mediante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, como se mencionó anteriormente, una posible explicación para la formación del agregado serían los cambios drásticos de pH, ya que se pasó de un pH de 5.5 a uno básico. Por otra parte, un fenómeno similar sucedió al cuantificar los extractos mediante el ensayo de Bradford (pH de 1). Al añadir el reactivo de Bradford, se formó un agregado en la disolución, el cuál mostraba un color azul. Badui Dergal, (2016) menciona que las reacciones de los monosacáridos ante la presencia de ácidos y bases se dan normalmente a pHs extremos, ya que son relativamente estables a pHs de entre 3 y 7. En el caso del medio alcalino, se han descrito la formación de múltiples productos secundarios susceptibles de polimerización, en la reacción de monosacáridos a estos pHs (Arias-Giraldo & López-Velasco, 2019). Debido a la gran cantidad de azúcares reductores que poseen las hojas de *A. dentata*, esto podría ser la explicación para la formación del agregado en diferentes pH.

7.2 Electroforesis en Gel SDS- PAGE

Inicialmente, se emplearon geles de poliacrilamida con concentraciones del 7.5 al 10%, pero los resultados no mostraron bandas definidas. Por esta razón, se decidió aumentar los porcentajes de poliacrilamida al 11, 12 y 15%.

En la Figura 8 se muestra el gel SDS-PAGE de la extracción mediante TCA/A- β m. En el gel se distingue una única banda de aproximadamente 63 kDa. Debido a que no se observaron bandas en los geles SDS-PAGE al utilizar las extracciones proteicas de TCA/A- β m se optó por utilizar el extracto crudo para realizar los geles SDS-PAGE y cortar las bandas.

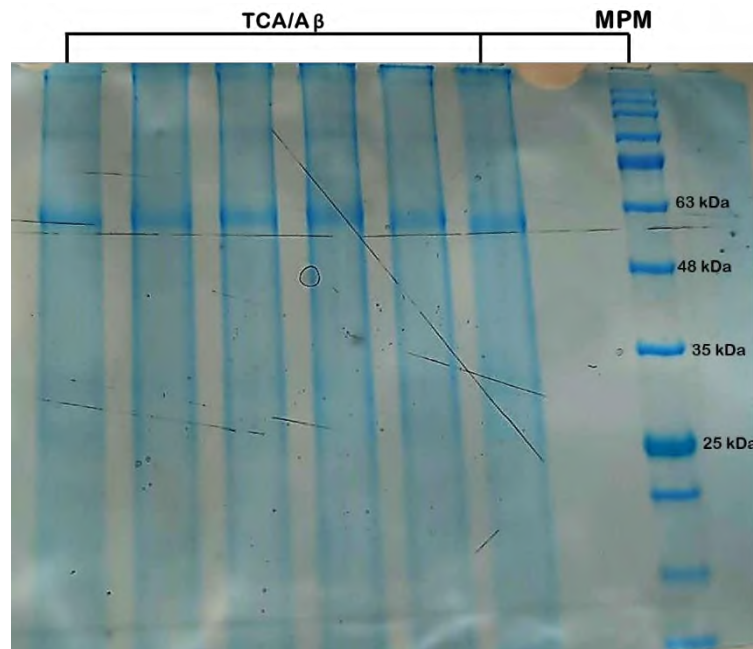


Figura 8. Gel SDS-PAGE al 12% de extractos proteicos de HM de *A. dentata* obtenidos con el método de TCA/A- β . Cada carril es una réplica de la extracción. MPM: Marcador de peso molecular.

Debido a que el extracto crudo tenía una variedad de compuestos que podrían interferir en los geles SDS-PAGE, se emplearon los Amicon® 10K para eliminar las moléculas pequeñas y para lograr una mayor claridad en las bandas de los geles. En la Figura 9, se muestra la comparación entre el perfil electroforético del extracto crudo y del extracto filtrado con el Amicon® 10K. En cada pozo fueron colocados 71.3 μ g de proteína. Se observa que las bandas presentan una baja definición y una intensidad débil. Además, no se aprecian cambios en el número ni en la nitidez de las bandas al filtrar el extracto crudo. En el rango de interés (17-35 kDa), se distinguen solo dos bandas (flechas azules) con pesos moleculares de 28.23 ± 0.45 y 26.24 ± 0.37 kDa, para la banda

superior e inferior, respectivamente. A partir de este resultado, se puede concluir que el pasar el extracto crudo por las membranas Amicon® 10K no aportó un beneficio en la resolución de las bandas vistas en los geles SDS-PAGE.

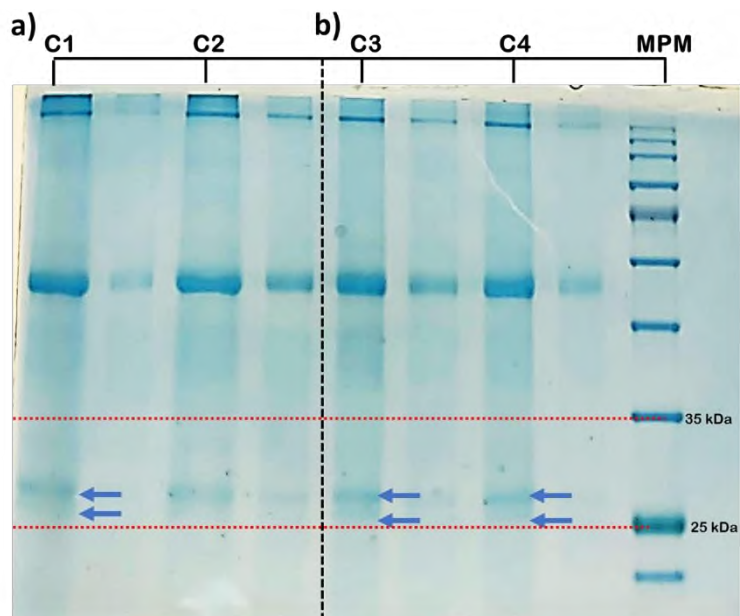


Figura 9. Gel SDS-PAGE al 11% de extractos de proteínas de HM de *A. dentata* a) extracto crudo b) extracto crudo pasado por Amicon® 10K. Cada pozo contiene 71.3 µg de proteína. Carriles principales con muestra: C1, C2, C3 y C4; al lado invasión de carril con la muestra proteica. MPM: Marcador de peso molecular.

En la Figura 10, se comparan los geles SDS-PAGE con distintos métodos de extracción para HM de *A. dentata*. Como se observa en la Figura 10a, el extracto crudo (C1) y el extracto filtrado con Amicon® 10K (C2) presentan el mismo perfil electroforético. No obstante, la extracción mediante TCA/Acetona (C3) y la extracción metanólica (C4) muestran un perfil electroforético muy distinto al de los demás métodos evaluados. En el caso de C3, se aprecia una menor cantidad de bandas y se observan muy tenues. Por otro lado, en C4 no se distinguen bandas, sino un barrido, lo cual podría sugerir una hidrólisis proteica causada posiblemente por la extracción con ácido. Al comparar este gel con el gel de extracto crudo (Figura 10b), se nota una diferencia en la intensidad y claridad de las bandas, así como la presencia de una banda (B4) no observada con los métodos de extracción mencionados anteriormente. En la Figura 10b se observa el perfil electroforético del extracto crudo en un gel SDS-PAGE al 15%, esto con la finalidad de obtener una mayor nitidez de las bandas. En el rango de interés (17-35 kDa), señalado entre líneas rojas, se observan 4

bandas bien definidas. Estas cuatro bandas fueron seleccionadas para extraer las proteínas y realizar las pruebas de actividad biológica, fueron nombradas de mayor a menor peso molecular como B1, B2, B3 y B4. El peso molecular aproximado de cada banda fue de: 33.412 ± 0.263 , 29.326 ± 0.263 , 27.558 ± 0.349 y 17 kDa, respectivamente.

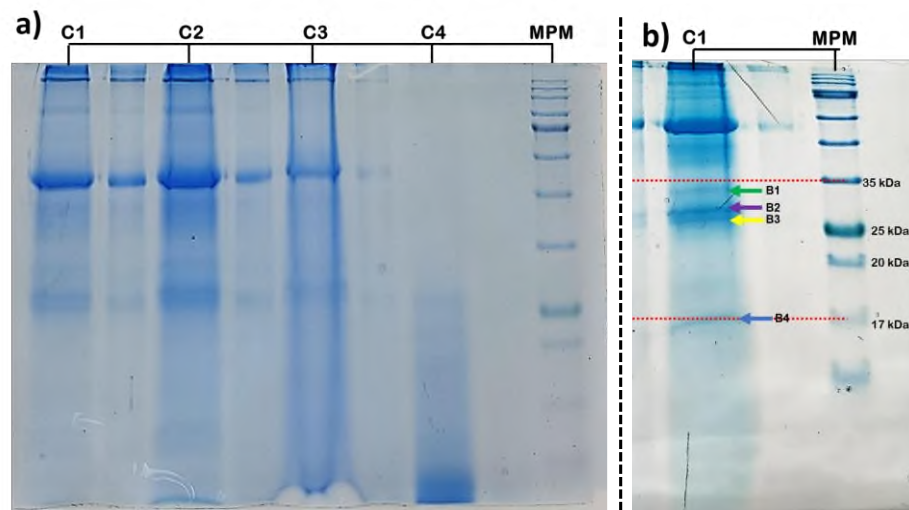


Figura 10. Geles SDS-PAGE de extractos de proteínas de HM de *A. dentata* a) al 12% con: C1 (Extracto crudo con 69.54 μ g de proteína), C2 (Extracto crudo pasado por Amicon® 10K con 70 μ g de proteína), C3 (TCA/A-DTT con 39 μ L), C4 (extracción metanólica con 39 μ L). Carriles principales con muestra: C1, C2, C3 y C4; al lado invasión de carril con la muestra proteica. b) al 15% con: C1 (Extracto crudo con 69.54 μ g de proteína). Las bandas seleccionadas se muestran con flechas y nomenclatura. MPM: Marcador de peso molecular.

En el caso de la HJ se evaluó obtener las proteínas desde el extracto crudo, al igual que con la HM, sin embargo, su bajo contenido de proteínas no permitió observar bandas en los geles de poliacrilamida (Figura 11). Debido a esto, se optó por buscar otros métodos de extracción que permitieran obtener bandas definidas en los geles SDS-PAGE. Los métodos evaluados fueron TRI-Reagent y el Kit de extracción de proteínas totales de plantas (Sigma-Aldrich PE0230). Se puede observar en la Figura 12a que el método TRI-Reagent permitió detectar un mayor número de bandas proteicas de bajo peso molecular (7 bandas), en el rango de aproximadamente 11 a 35 kDa. En cambio, con el método del Kit de Sigma (Figura 13b) se observó un menor número de bandas proteicas (3 bandas), en el rango de estudio.

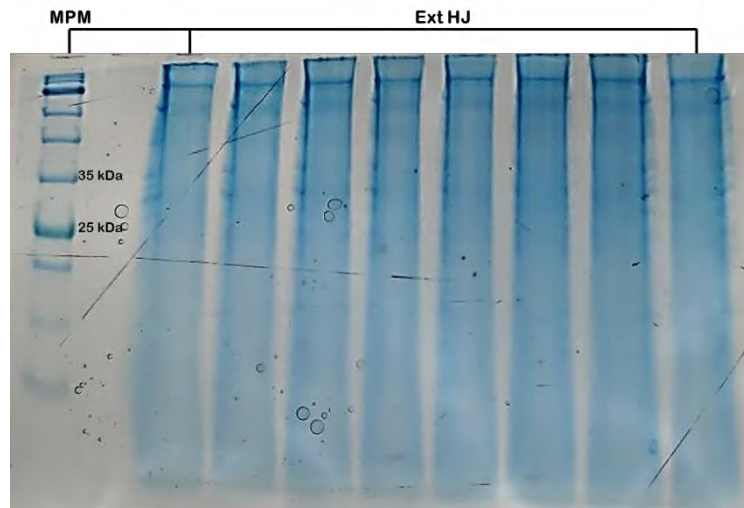


Figura 11. Gel SDS-PAGE al 15% de extracto crudo de HJ (Ext HJ) de *A. dentata*. Cada pozo contiene 39 μ L de extracto proteico. Cada carril es una réplica de la extracción. MPM: Marcador de peso molecular.

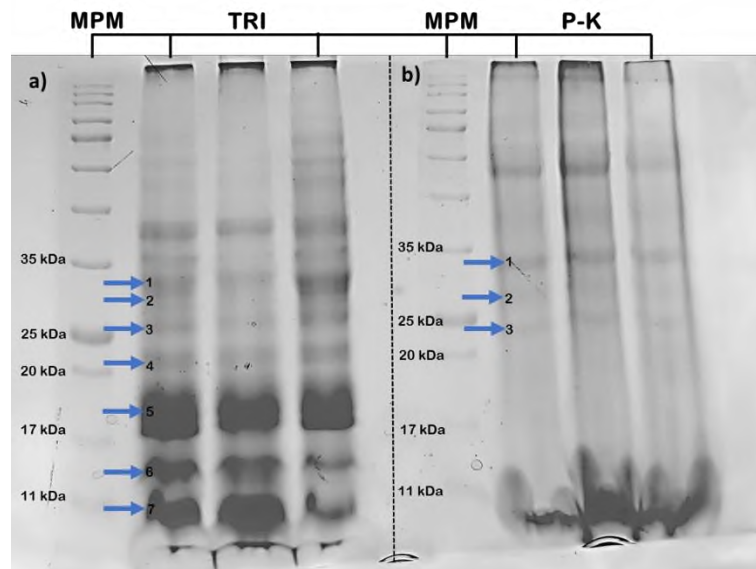


Figura 12. Gel SDS-PAGE al 12% de extractos de proteínas de HJ de *A. dentata* a) TRI-Reagent (TRI) b) Kit de extracción de proteínas totales de plantas Sigma-Aldrich PE0230 (P-K). Cada pozo contiene 30 μ g de proteína. Las bandas seleccionadas se muestran con flechas azules y números. MPM: Marcador de peso molecular.

El método de extracción seleccionado fue el de TRI-Reagent, por permitir detectar un mayor número de bandas proteicas de bajo peso molecular. Se nombraron las muestras de mayor a menor peso molecular como B1, B2, B3, B4 y B5. El peso molecular aproximado de cada banda

fue de 31.544 ± 2.243 , 28.660 ± 2.264 , 25.312 ± 1.650 , 22.358 ± 0.986 , 17.560 ± 1.532 , respectivamente.

Asimismo, se utilizó el método TRI-Reagent para extraer proteína de HM y contrastar el perfil electroforético con el de HJ. La Figura 13 muestra el perfil electroforético de ambas hojas. Mientras que para HJ se observan las 7 bandas descritas previamente, en HM se distinguen solo 5 bandas (Figura 13b). Además, el método TRI-Reagent proporcionó la mayor cantidad de proteína que correlaciona con un mayor número de bandas observadas en HJ (Tabla 8 y Figura 13).

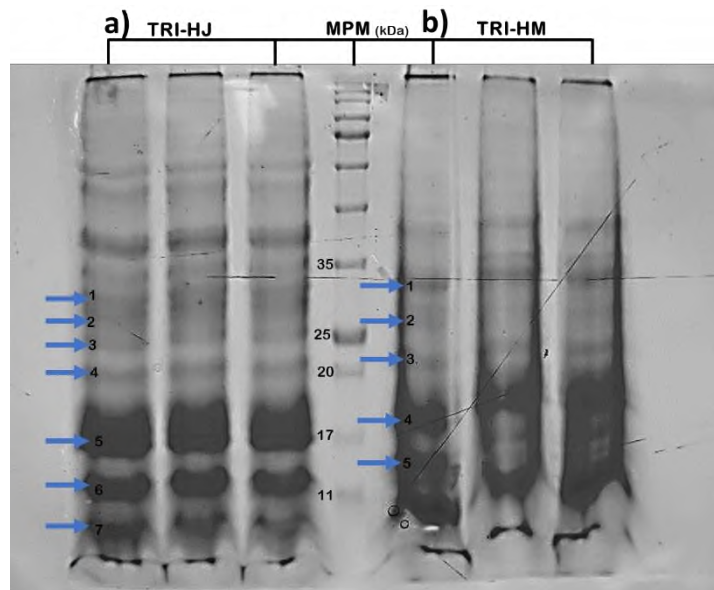


Figura 13. Gel SDS-PAGE al 12% de extractos de proteínas de HJ y HM de *A. dentata* a) TRI-Reagent de HJ (TRI-HJ) b) TRI-Reagent de HM (TRI-HM). Cada pozo contiene 30 μ g de proteína. Las bandas seleccionadas se muestran con flechas azules y números. MPM: Marcador de peso molecular.

Los resultados obtenidos muestran que la extracción/precipitación de proteínas con TRI-Reagent resultó más eficaz que los otros métodos evaluados para la obtención de bandas nítidas en los geles de electroforesis SDS-PAGE. Asimismo, se observaron más bandas con TRI-Reagent que, con el extracto crudo, debido a que esta metodología permite la eliminación de compuestos interferentes presentes en el extracto. Este método de extracción facilitará la replicabilidad de los resultados y permitirá obtener muestras proteicas para el análisis de geles 2-DE en trabajos posteriores.

Los métodos de TCA/Acetona y de TRI-Reagent (también llamado TRIzol®) son algunos de los más empleados para extraer proteínas y realizar estudios proteómicos de plantas. Xiong *et al.* (2011) llevaron a cabo una extracción de proteínas de tejidos de *Medicago truncatula* L y utilizaron geles 2-DE para comparar distintas metodologías. Además, optimizaron el método de TRI-Reagent para obtener una mayor resolución de los spots. Los investigadores reportan que el método de TRI-Reagent fue superior al método de TCA/Acetona en hojas y tallos, ya que, en este último contaminantes poliméricos coprecipitados dificultaban la resuspensión de las proteínas y la separación por 2-DE.

7.2.1 Perfiles electroforéticos de HJ y HM

Por otra parte, se compararon los perfiles electroforéticos de ambas hojas, obtenidos mediante las distintas metodologías. En la Tabla 10 se muestra el total de bandas proteicas obtenidas en el intervalo de 17-35KDa. Con el extracto crudo, se observaron 4 bandas en la HM. Con el método propuesto en el Kit Sigma-Aldrich PE0230, se detectaron muy pocas bandas en la HJ por lo que esta metodología no se empleó en la HM; estos resultados son similares a los obtenidos por Anaya-Esteban, (2022) en la extracción proteica de *Tecoma stans* mediante el kit. El método del TRI-Reagent mostró recuperar el mayor número de bandas detectadas, tanto en la HM como en la HJ. Según Anaya-Esteban, (2022), el método de extracción de proteínas con TCA/acetona le permitió obtener un mejor perfil electroforético, así como un mayor número de bandas (9 bandas) en hojas de *T. stans*. No obstante, los resultados aquí descritos coinciden con los de Xiong *et al.* (2011), debido a que el método de TRI-Reagent fue superior al método de TCA/Acetona en las extracciones proteicas de hojas de *A. dentata*. Además, otra ventaja del método de TRI-Reagent es que genera perfiles de alta calidad en la separación por 2-DE, en términos de resolución, número e intensidad de spots (Chan *et al.*, 2018; Lee & Lo, 2008). Esto podría ser muy útil para futuras investigaciones.

Tabla 10. Número de bandas obtenidas en el perfil electroforético mediante algunas de las metodologías de extracción/precipitación empleadas en hojas (HJ y HM) de *A. dentata*.

Método de extracción	Intervalo de PM (kDa)	Número de bandas	
		HM	HJ
Extracto crudo	17-35	4	*NOB
TRI-Reagent	17-35	4	5
TRI-Reagent	11-35	5	7
Kit Sigma-Aldrich PE0230	11-35	-	3

*NOB= no se observaron bandas

En la Tabla 11, se muestra la comparación de los PM de las bandas seleccionadas para los ensayos de actividad antiproliferativa. En el caso de la HM las bandas proteicas se recuperaron desde el extracto crudo y para la HJ con el método de TRI-Reagent. Se puede observar, que desde la B1 hasta la B3, se observan pequeñas diferencias en el PM para ambas hojas.

Tabla 11. Comparación del peso molecular de las diferentes bandas de proteínas obtenidas de HM (extracto crudo) y HJ (TRI-Reagent) de *Alternanthera dentata* (L.) Kuntze.

Banda	Peso molecular de las bandas (kDa)	
	HM	HJ
B1	33.412 ± 0.263	31.544 ± 2.243
B2	29.326 ± 0.263	28.660 ± 2.264
B3	27.558 ± 0.349	25.312 ± 1.650
B4	≈17	22.358 ± 0.986
B5	-	17.560 ± 1.532

Los perfiles electroforéticos de ambas hojas presentan diferencias, tanto en el PM (Tabla 11), como en el número total de bandas observadas: 11 bandas para TRI-HJ y 6 bandas para TRI-HM (Figura 13). De acuerdo con Fukasawa (1966), el perfil electroforético de las hojas maduras y juveniles de las plantas varía entre las diferentes fases de crecimiento. Esto podría deberse a que algunas especies tienen una morfología y un metabolismo distintos durante su ciclo de vida (Arteca, 1996). Por ejemplo, James *et al.* (1999) hallaron diferencias significativas en la forma de las hojas y en la distribución de la clorofila entre las hojas juveniles y maduras de *Eucalyptus*

globulus ssp. Sin embargo, los estudios sobre el perfil electroforético de las proteínas en los diferentes estados foliares de las plantas han mostrado resultados contradictorios. Por lo tanto, se requieren más investigaciones para explorar las posibles diferencias en el perfil electroforético de las hojas en las distintas fases de crecimiento.

7.3 Evaluación de actividad antiproliferativa

7.3.1 Actividad antiproliferativa HM

Previo a realizar los ensayos de actividad antiproliferativa se cuantificó la proteína obtenida de las bandas B1, B2, B3 y B4, las concentraciones fueron: 55.12, 319.23, 34.61 y 244.87 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Para elaborar la curva dosis-respuesta, se utilizó como referencia el estudio de Landi *et al.*, (2022). En la Tabla 12 se observan las concentraciones obtenidas de acuerdo al volumen utilizado de muestra, además, utilizando los PM de cada banda se estimaron las concentraciones en nano molar (nM). Estas concentraciones se encuentran dentro del rango evaluado por Landi *et al.*, (2022) con su RIP purificada. Con estas nuevas concentraciones se evaluó la actividad antiproliferativa usando cultivos celulares con células MCF-7 y se utilizó como control positivo Doxorubicina (Doxo) y negativo medio DMEM. Al finalizar el periodo de incubación se midió la viabilidad celular mediante el ensayo MTT (Figura 14). Se observó que B3 (27.558 ± 0.349 kDa) y B4 (17 kDa) reducen el porcentaje de viabilidad celular de forma similar a la Doxo (aproximadamente de un $68.724 \% \pm 0.081$), en las concentraciones evaluadas: 0.346 a 3.461 $\mu\text{g/mL}$ y 2.449 a 24.487 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. En el caso de B1 y B2, no se observa una tendencia en la reducción de la viabilidad celular.

Tabla 12. Concentraciones empleadas en la curva dosis-respuesta para cada una de las bandas de HM en $\mu\text{g}/\text{mL}$ y nM.

Volumen (μL)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				Concentración (nM)			
	B1	B2	B3	B4	B1	B2	B3	B4
1	0.551	3.192	0.346	2.449	16.497	108.856	12.559	144.041
2	1.102	6.385	0.692	4.897	32.994	217.711	25.118	288.082
4	2.205	12.769	1.384	9.795	65.988	435.422	50.236	576.165
6	3.307	19.154	2.077	14.692	98.982	653.134	75.354	864.247
8	4.410	25.538	2.769	19.590	131.977	870.845	100.472	1152.329
10	5.512	31.923	3.461	24.487	164.971	1088.556	125.590	1440.412

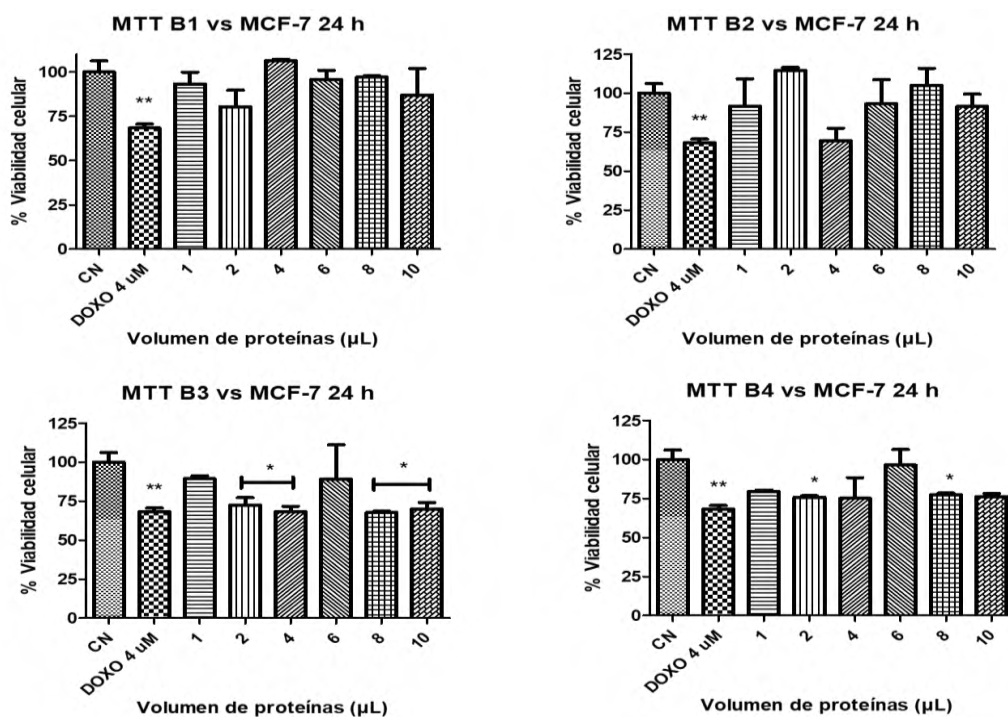


Figura 14. Efecto de las proteínas de bandas B1, B2, B3 y B4 en contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 a las 24 h de incubación. Los resultados se expresan en porcentaje del control negativo (CN), medio DMEM. Los datos son la media \pm desviación estándar (DE). $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. * representa $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ y **** $p \leq 0,0001$ todos ellos frente al control negativo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA (análisis de la varianza) unidireccional con el software GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Se aplicó la prueba de Dunnet para comparar cada tratamiento con el control, con una significación estadística de $p < 0,05$.

En la Tabla 13 se muestran los porcentajes de inhibición en la viabilidad celular (% IVC) obtenidos en cada una de las concentraciones utilizadas. Tal como se mencionó anteriormente, en el caso de B1 y B2, no se observa una tendencia a la disminución del % IVC. El % IVC promedio para ambas bandas fue muy bajo, siendo 4.373% y -5.809%, respectivamente. Por el contrario, en el caso de B3 y B4, se observa un mayor % IVC, siendo de 17.223% y 17.312%, respectivamente. El valor máximo del % IVC para estas dos bandas fue de 30.06% (3.461 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 27.349% (2.448 $\mu\text{g}/\text{mL}$), para B3 y B4, respectivamente. Estos valores son similares al % IVC del DOXO μM (28.500%). Los datos sugieren que el efecto en la disminución de la viabilidad celular es independiente de la dosis.

Tabla 13. Porcentaje de inhibición de viabilidad celular para cada una de las concentraciones empleadas en la curva dosis-respuesta de bandas de HM.

B1-HM		B2-HM		B3-HM		B4-HM	
Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% de Inhibición	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% de Inhibición	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% de Inhibición	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% de Inhibición
0.551	6.687	3.192	-3.874	0.346	6.713	2.448	27.349
1.102	23.36	6.384	-26.071	0.692	27.426	4.897	24.204
2.204	-6.457	12.769	11.955	1.384	19.09	9.794	17.427
3.307	4.334	19.153	-5.178	2.076	-4.82	14.692	-5.639
4.409	-5.664	25.538	-20.215	2.768	24.869	19.589	22.619
5.512	3.976	31.923	8.528	3.461	30.06	24.487	17.913

7.3.2 Actividad antiproliferativa HJ

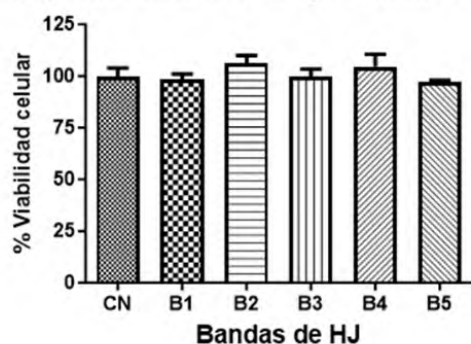
Previo a realizar los ensayos de actividad antiproliferativa se cuantificó la proteína obtenida de las bandas B1, B2, B3, B4 y B5 las concentraciones fueron: 48.27, 23.22, 8.77, 51.16 y 200.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

En la Tabla 14, se observan las concentraciones empleadas en los ensayos, además, utilizando los PM de cada banda se estimaron las concentraciones en nano molar (nM). Utilizando estas concentraciones se evaluó la actividad antiproliferativa en cultivos celulares de células MCF-7 y se utilizó como control negativo medio DMEM. Al finalizar el periodo de incubación se midió la viabilidad celular mediante el ensayo MTT (Figura 15). No se observó ninguna reducción en el porcentaje de viabilidad celular en ninguna de las bandas evaluadas.

Tabla 14. Concentraciones empleadas en la curva dosis-respuesta para cada una de las bandas de HJ en $\mu\text{g}/\text{mL}$ y nM .

Banda	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		Concentración (nM)	
	Baja	Alta	Baja	Alta
B1	0.048	0.48	1.522	15.217
B2	0.023	0.23	0.803	8.025
B3	0.0087	0.087	0.344	3.437
B4	0.051	0.51	2.281	22.811
B5	0.2	2	11.390	113.895

Ensayo MTT en MCF-7 a Baja Concentración 24 h



Ensayo MTT en MCF-7 a Alta Concentración 24 h

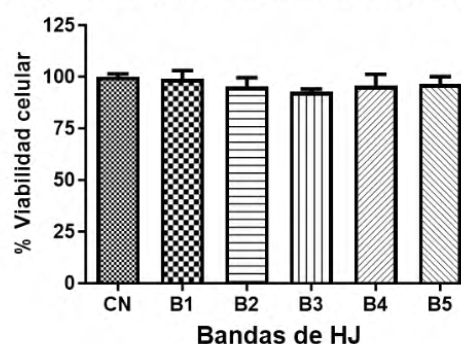


Figura 15. Efecto de las proteínas de bandas B1, B2, B3, B4 y B5 en contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 a las 24 h de incubación. Los resultados se expresan en porcentaje del control negativo (CN), medio DMEM. Los datos son la media \pm desviación estándar (DE). $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. * representa $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ y **** $p \leq 0,0001$ todos ellos frente al control negativo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA (análisis de la varianza) unidireccional con el software GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Se aplicó la prueba de Dunnet para comparar cada tratamiento con el control, con una significación estadística de $p < 0,05$.

En la Tabla 15 se muestran % IVC obtenidos en cada una de las concentraciones utilizadas. Los porcentajes son muy bajos, estos resultados sugieren que las proteínas provenientes de bandas de HJ, no tienen efecto en la actividad antiproliferativa de la línea celular MCF-7.

Tabla 15. Porcentaje de inhibición de viabilidad celular para cada una de las concentraciones empleadas en los ensayos con bandas de HJ.

B1-HJ		B2-HJ		B3-HJ		B4-HJ		B5-HJ	
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% IVC	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% IVC	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% IVC	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% IVC	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% IVC
0.048	1.770	0.023	6.083	0.0087	0.136	0.051	4.494	0.2	2.769
0.48	0.946	0.23	4.732	0.087	7.346	0.51	4.371	2	3.515

Nota: porcentaje de inhibición en la viabilidad celular (% IVC)

En la literatura se han reportado algunos casos de fracciones proteicas de origen vegetal con actividad contra células MCF-7. Por ejemplo, Rahma *et al.* (2022) evaluaron la actividad citotóxica y antiproliferativa de una fracción proteica extraída de las semillas de *Moringa oleifera* mediante cromatografía de intercambio iónico. Los autores hallaron que la fracción proteica presentaba una actividad citotóxica débil contra las células MCF-7, con un valor IC_{50} de 429.90 $\mu\text{g/mL}$, y que no tenía actividad antiproliferativa. Esto significa que la proteína no logró inhibir el crecimiento de las células cancerosas, pero fue capaz de inducir la muerte de las mismas. Asimismo, Sukma *et al.* (2022) aislaron diferentes fracciones proteicas de *Gnetum gnemon* utilizando cromatografía de intercambio iónico y sometieron a ensayos contra células MCF-7, sin embargo, no reportaron el PM de dichas fracciones. Los investigadores encontraron que una fracción proteica tenía efecto citotóxico en dichas células con un valor IC_{50} de 125.89 $\mu\text{g/mL}$, pero no inhibía la proliferación celular. Por otro lado, Fartousi *et al.* (2022) analizaron los efectos de la Dianthin-30 (RIP-I), proveniente de *Dianthus caryophyllus*, en un cultivo 3D de células MCF-7. Los investigadores reportaron que en todas las concentraciones evaluadas (1.25 hasta 10 $\mu\text{g/mL}$) mostraban un efecto inhibitorio significativo en el crecimiento celular, además de causar apoptosis.

Por otra parte, algunas fuentes bibliográficas describen la obtención de péptidos con actividad citotóxica y antiproliferativa a partir de diferentes plantas. Por ejemplo, Silva-Sánchez *et al.* (2008) describieron que la fracción proteica digerida con tripsina, de semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, mostró actividad apoptótica contra las células HeLa. Los autores reportaron que con 1 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción proteica, se causaba el 30% de apoptosis en la línea celular y con 5 $\mu\text{g/mL}$ se observaba un 38.8% de apoptosis. Mediante técnicas como: ensayo ELISA, Western

blot, y MALDI-TOF, se identificó un péptido de 18.5 kDa que tenía más del 60% de la secuencia peptídica de la lunasina de soja. Asimismo, Vilcacundo *et al.* (2019) reportaron péptidos que inhibían la viabilidad celular. Estos péptidos se obtuvieron mediante una digestión enzimática de harina de *Amaranthus caudatus*. Luego, se purificaron las fracciones peptídicas utilizando cromatografía líquida de fase reversa semi-preparativa (RP-HPLC). Los investigadores indicaron que los péptidos con un PM superior a 5 kDa eran más eficaces para inhibir la viabilidad celular en células Caco-2 de cáncer colorrectal humano. La obtención de fracciones peptídicas con actividad antiproliferativa depende de varios factores. Sin embargo, de acuerdo a los estudios mencionados anteriormente, la digestión enzimática favorece la liberación de péptidos de bajo PM y, por lo tanto, podría ser una estrategia para la obtención de péptidos con actividad antiproliferativa; en caso de no observarlos de forma nativa.

Por otra parte, Krobthong *et al.* (2022) describieron péptidos naturales con actividad citotóxica en seis tipos de células cancerosas humanas, los cuales fueron aislados de la flor de *Tecoma stans* (L.). Para obtener dicho péptidos, emplearon el método de extracción con agua caliente a presión (PHWE), seguido de una cromatografía de exclusión molecular. En el caso de la línea celular A549 (adenocarcinoma pulmonar) se encontró que los péptidos naturales disminuían la viabilidad celular hasta en un 60% a concentraciones superiores a 0.125 ng/mL.

8. Conclusión

En primer lugar, el método TCA/Acetona, propuesto para la extracción de proteína total de hojas de *A. dentata*, resultó ineficaz debido a los componentes naturales de las hojas. En cambio, el método de TRI-Reagent demostró resultados favorables para la extracción proteica. Con dicho método, se detectó un mayor número de bandas proteicas de bajo peso molecular en los geles SDS-PAGE. Por lo tanto, se concluye que el método de TRI-Reagent es el más adecuado para la extracción de la proteína en ambos tipos de hoja. En segundo lugar, al comparar los resultados obtenidos en los perfiles electroforéticos de geles SDS-PAGE, se observó una diferencia en el número de bandas obtenidas para cada tipo de hoja en el intervalo de 17-35 kDa. En la HM se observaron 4 bandas, mientras que en la HJ se observaron 5 bandas. Sin embargo, de acuerdo al análisis estadístico, no existe una diferencia significativa en el número de bandas obtenidas por cada tipo de hoja en el intervalo de estudio.

Finalmente, las bandas de HM denominadas B3 y B4 mostraron una reducción en la viabilidad celular de forma similar a la Doxo en las concentraciones evaluadas (de 0.035 a 0.346 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.245 a 0.244 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente). Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antiproliferativa indican que algunas proteínas pertenecientes a las bandas proteicas en el rango de estudio poseen dicha actividad. Por el contrario, las bandas evaluadas de HJ, no mostraron una reducción en la viabilidad celular. En base a estos hallazgos, se puede concluir que existen proteínas de hojas maduras de *A. dentata* con actividad antiproliferativa. Como futuras líneas de investigación, se podría continuar trabajando con dichas bandas para identificar y caracterizar a las proteínas que poseen la actividad y evaluar su especificidad con las células cancerosas. Identificar y caracterizar estas proteínas podría sentar las bases para un posible tratamiento contra el cáncer en algún futuro.

9. Recomendaciones

9.1 Identificación de potenciales RIPs mediante un alineamiento de secuencias

Se podrían utilizar algunas de las secuencias de RIPs reportadas y, mediante programas de alineamiento de secuencias como ONEKP: BLAST para plantas, se podría determinar si existen proteínas con secuencias similares a las de las RIPs o con regiones conservadas en el genoma de *A. dentata*.

9.2 Propuestas para obtener una mejor extracción:

Se podría utilizar el buffer de lisis modificado descrito por Bhardwaj & Yadav, (2013) como buffer de extracción y continuar con el método de TCA/Acetona. Dicho buffer de lisis está compuesto por: urea (9 M), tiourea (2 M), DTT al 1% y CHAPS al 4%. Además, se podría realizar la extracción de proteínas mediante fenol descrita por Bhardwaj & Yadav, (2013), debido a que los autores sugieren que esta extracción genera bandas muy nítidas y definidas en los geles SDS-PAGE. Finalmente, se podría utilizar la metodología descrita por Lledías *et al.* (2020). Los autores lograron aislar una RIP I de una planta con un alto contenido de azúcares (*A. tequilana var. azul*).

9.3 Realizar un gel SDS-PAGE cargando muestras de los diferentes métodos de extracción de proteínas utilizados para comparar el perfil electroforético.

9.4 Propuestas extraer y evaluar proteínas nativas de *A. dentata*

Uno de los factores que podría otorgar la actividad antiproliferativa a la proteína es su estructura tridimensional nativa, en caso de ser una enzima. Debido a esto se debería optar por utilizar métodos de extracción de proteínas nativas, algunos de estos métodos podrían ser: electroforesis en gel de poliacrilamida nativa y técnicas de cromatografía. Por ejemplo, Na Ayutthaya *et al.* (2020) describieron cómo aplicar la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida nativa azul (BN-PAGE) para extraer oligómeros de proteínas *Arabidopsis thaliana*. Por otra parte, en el caso de la cromatografía, Gholizadeh, (2019) describieron la extracción de una RIP I, proveniente de *Celosia plumosa*, utilizando cromatografía de intercambio aniónico e intercambio catiónico.

9.5 Identificación de las proteínas provenientes de las bandas con actividad antiproliferativa

Para identificar las proteínas con actividad antiproliferativa, se podrían utilizar geles bidimensionales (2-DE). Utilizando esta técnica, se separarían las proteínas en función de su peso molecular y su punto isoeléctrico. Después de separar las proteínas provenientes de las bandas, se emplearían técnicas como el western blot, MALDI, LC-MS/MS para identificarlas.

10. Referencias

1. “Antiproliferative.” Merriam-Webster.com Medical Dictionary, Merriam-Webster, <https://www.merriam-webster.com/medical/antiproliferative>. Accessed 6 Nov. 2023.
2. Akyüz, A., & Ersus, S. (2021). Optimization of enzyme assisted extraction of protein from the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves for alternative plant protein concentrate production. *Food Chemistry*, 335, 127673. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127673>
3. Alford, S. C., Pearson, J. D., Carette, A., Ingham, R. J., & Howard, P. L. (2009). Alpha-sarcin catalytic activity is not required for cytotoxicity. *Bmc Biochemistry*, 10, 1–11.
4. Anaya-Esteban, E. (2022). Evaluación de métodos de extracción de proteína total de *Tecoma stans*. Universidad del Papaloapan.
5. Ardini, M., Vago, R., Fabbrini, M. S., & Ippoliti, R. (2022). From Immunotoxins to Suicide Toxin Delivery Approaches: Is There a Clinical Opportunity? *Toxins*, 14(9), 579. <https://doi.org/10.3390/toxins14090579>
6. Arias-Giraldo, S., & López-Velasco, D. M. (2019). Reacciones químicas de los azúcares simples empleados en la industria alimentaria. *Lámpsakos*, 22, 123–136. <https://doi.org/10.21501/21454086.3252>
7. Arteca, R. N. (1996). Juvenility, Maturity and Senescence. In R. N. Arteca (Ed.), *Plant Growth Substances: Principles and Applications* (pp. 161–176). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2451-6_7
8. Badui Dergal, S. (2016). *Química de los alimentos*. México, Pearson Educación.
9. Balasubrahmanyam, A., Baranwal, V. K., Lodha, M. L., Varma, A., & Kapoor, H. C. (2000). Purification and properties of growth stage-dependent antiviral proteins from the leaves of *Celosia cristata*. *Plant Science*, 154(1), 13–21. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(99\)00192-2](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(99)00192-2)
10. Bolognesi, A., Bortolotti, M., Maiello, S., Battelli, M., & Polito, L. (2016). Ribosome-Inactivating Proteins from Plants: A Historical Overview. *Molecules*, 21(12), 1627. <https://doi.org/10.3390/molecules21121627>
10. Britannica. (2021). Anticancer drug | Pharmacology, Mechanisms & Side Effects. Retrieved from <https://www.britannica.com/science/anticancer-drug>

11. Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). Coomassie Blue Staining (pp. 161–167). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00013-6>
12. Chan, K.-K., Kwok, C., Sze, E., & Lee, F. (2018). Evaluation of the Use of TRIzol-Based Protein Extraction Approach for Gel-Based Proteomic Analysis of Dried Seafood Products and Chinese Tonic Foods. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1998. <https://doi.org/10.3390/ijms19071998>
13. Dougherty, K., & Hudak, K. A. (2022). Phylogeny and domain architecture of plant ribosome inactivating proteins. *Phytochemistry*, 202, 113337. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113337>
14. Dunn, M. J. (2004). Electroelution of Proteins From Polyacrylamide Gels. In P. Cutler (Ed.), *Protein Purification Protocols* (pp. 339–343). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-655-X:339>
15. el Gamal, A. A., AlSaid, M. S., Raish, M., Al-Sohaibani, M., Al-Massarani, S. M., Ahmad, A., Hefnawy, M., Al-Yahya, M., Basoudan, O. A., & Rafatullah, S. (2014). Beetroot (*Beta vulgaris* L.) extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity associated oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rodent model. *Mediators of Inflammation*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/983952>
16. Fartousi, M., Zargan, J., Zare Karizi, S., Zargan, S., Haji Noor Mohammadi, A., Mousavi, M., & Keshavarz Alikhani, H. (2022). Evaluation of the anti-cancer effect of Dianthin-30 on MCF-7 breast cancer cell line in 3D cell cultures. *Modern Medical Laboratory Journal*, 5(1), 38–46.
17. Flavell, D. J., & Flavell, S. U. (2022). Plant-Derived Type I Ribosome Inactivating Protein-Based Targeted Toxins: A Review of the Clinical Experience. *Toxins*, 14(8), 563. <https://doi.org/10.3390/toxins14080563>
18. Fukasawa, H. (1966). Disc Electrophoresis of Proteins from Juvenile and Adult Specimens of Ivy. *Nature*, 212(5061), 516–517. <https://doi.org/10.1038/212516a0>
19. Garg, V. K., Jain, M., Sharma, P. K., & Garg, G. (2010). Anti-inflammatory activity of *Spinacia oleracea*. *Int J Pharma Prof Res*, 1(1), 1–4.

20. Gholizadeh, A. (2019). Purification of a ribosome-inactivating protein with antioxidation and root developer potencies from *Celosia plumosa*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(1), 243–251. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0577-5>
21. Girbés, T., Citores, L., Miguel Ferreras, J., Angeles Rojo, M., Iglesias, R., Muñoz, R., Javier Arias, F., Calonge, M., Ramón García, J., & Méndez, E. (1993). Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of *Sambucus nigra* L. *Plant Molecular Biology*, 22(6), 1181–1186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00028990>
22. Glinka, E. M. (2013). Eukaryotic expression vectors containing genes encoding plant proteins for killing of cancer cells. *Cancer Epidemiology*, 37(6), 1014–1019. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2013.09.013>
23. Gothai, S., Muniandy, K., Esa, N. M., Subbiah, S. K., & Arulsevan, P. (2018). Anticancer potential of *Alternanthera sessilis* extract on HT-29 human colon cancer cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(8), 394–402. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.239427>
24. H. M. Mahbubur Rahman, A., & Iffat Ara Gulshana, M. (2014). Taxonomy and Medicinal Uses on *Amaranthaceae* Family of Rajshahi, Bangladesh. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 2(2), 54–59. <https://doi.org/10.12691/aees-2-2-3>
25. Hasan, I., Rahman, S. N., Islam, Md. M., Ghosh, S. K., Mamun, M. R., Uddin, Md. B., Shaha, R. K., & Kabir, S. R. (2021). A N-acetyl-D-galactosamine-binding lectin from *Amaranthus gangeticus* seeds inhibits biofilm formation and Ehrlich ascites carcinoma cell growth in vivo in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 928–936. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.052>
26. Hashiguchi, A., Yamaguchi, H., Hitachi, K., & Watanabe, K. (2021). An Optimized Protein Extraction Method for Gel-Free Proteomic Analysis of *Opuntia Ficus-Indica*. *Plants*, 10(1), 115. <https://doi.org/10.3390/plants10010115>
27. Herriott, R. M. (1941). Reaction of Folin's reagent with proteins and biuret compounds in presence of cupric ion. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 46(4), 642–644.

28. Hornung, E., Wajant, H., Jeske, H., & Mundry, K.-W. (1996). Cloning of a cDNA encoding a new ribosome-inactivating protein from *Beta vulgaris* (mangold). *Gene*, 170(2), 233–236. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00802-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00802-0)
29. INEGI. (2021). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO). COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 105/21. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf
30. Instituto Nacional del Cáncer. (2021). Cannabis y cannabinoides (PDQ®)–Versión para pacientes. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/mca/paciente/cannabis-pdq>
31. Ishizaki, T., Megumi, C., Komai, F., Masuda, K., & Oosawa, K. (2002). Accumulation of a 31-kDa glycoprotein in association with the expression of embryogenic potential by spinach callus in culture. *Physiologia Plantarum*, 114(1), 109–115. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140115.x>
32. Islam, S., Shajib, M. S., & Ahmed, T. (2016). Antinociceptive effect of methanol extract of *Celosia cristata* Linn. in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 400. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1393-5>
33. James, S. A., Smith, W. K., & Vogelmann, T. C. (1999). Ontogenetic differences in mesophyll structure and chlorophyll distribution in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* (Myrtaceae). *American Journal of Botany*, 86(2), 198–207.
34. Jiménez, C. (2021). Cáncer, causa de muerte de más de dos mil oaxaqueños en 2020 | Oaxaca. SOCIEDAD. <https://oaxaca.eluniversal.com.mx/node/194574>
35. Kishida, K., Masuho, Y., & Hara, T. (1983). Protein-synthesis inhibitory protein from seeds of *Luffa cylindrica* roem. *FEBS Letters*, 153(1), 209–212. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80149-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80149-5)
36. Kocyigit, E., Kocaadam-Bozkurt, B., Bozkurt, O., Ağagündüz, D., & Capasso, R. (2023). Plant Toxic Proteins: Their Biological Activities, Mechanism of Action and Removal Strategies. *Toxins*, 15(6), 356. <https://doi.org/10.3390/toxins15060356>
37. Krobthong, S., Yingchutrakul, Y., Sittisaree, W., Tulyananda, T., Samutrtai, P., Choowongkamon, K., & Lao-On, U. (2022). Evaluation of potential anti-metastatic and

- antioxidative abilities of natural peptides derived from *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth in A549 cells. *PeerJ*, 10, e13693.
38. Kwon, S.-Y., An, C. S., Liu, J. R., & Paek, K.-H. (1997). A Ribosome-Inactivating Protein from *Amaranthus viridis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(9), 1613–1614. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1613>
 39. Landi, N., Ragucci, S., Citores, L., Clemente, A., Hussain, H. Z. F., Iglesias, R., Ferreras, J. M., & di Maro, A. (2022). Isolation, Characterization and Biological Action of Type-1 Ribosome-Inactivating Proteins from Tissues of *Salsola soda* L. *Toxins*, 14(8), 566. <https://doi.org/10.3390/toxins14080566>
 40. Landi, N., Ragucci, S., Citores, L., Clemente, A., Hussain, H. Z. F., Iglesias, R., Ferreras, J. M., & Di Maro, A. (2022). Isolation, Characterization and Biological Action of Type-1 Ribosome-Inactivating Proteins from Tissues of *Salsola soda* L. *Toxins*, 14(8), 566. <https://doi.org/10.3390/toxins14080566>
 41. Lee, F. W.-F., & Lo, S. C.-L. (2008). The use of Trizol reagent (phenol/guanidine isothiocyanate) for producing high quality two-dimensional gel electrophoretograms (2-DE) of dinoflagellates. *Journal of Microbiological Methods*, 73(1), 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.006>
 42. Liu, L., Wang, R., He, W., He, F., & Huang, G. (2010). Cloning and soluble expression of mature α -luffin from *Luffa cylindrica* and its antitumor activities in vitro. *Acta Biochim Biophys Sin*, 42(8), 585–592. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq056>
 43. Lledías, F., Gutiérrez, J., Martínez-Hernández, A., García-Mendoza, A., Sosa, E., Hernández-Bermúdez, F., Dinkova, T. D., Reyes, S., Cassab, G. I., & Nieto-Sotelo, J. (2020). Mayahuelin, a Type I Ribosome Inactivating Protein: Characterization, Evolution, and Utilization in Phylogenetic Analyses of Agave. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00573>
 44. Lledías, F., Hernández, F., Rivas, V., García-Mendoza, A., Cassab, G. I., & Nieto-Sotelo, J. (2017). A Rapid and Reliable Method for Total Protein Extraction from Succulent Plants for Proteomic Analysis. *The Protein Journal*, 36(4), 308–321. <https://doi.org/10.1007/s10930-017-9720-3>

45. Majolo, F., de Oliveira Becker Delwing, L. K., Marmitt, D. J., Bustamante-Filho, I. C., & Goettert, M. I. (2019). Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery. *Phytochemistry Letters*, 31, 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.04.003>
46. Majolo, F., de Oliveira Becker Delwing, L. K., Marmitt, D. J., Bustamante-Filho, I. C., & Goettert, M. I. (2019). Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery. *Phytochemistry Letters*, 31, 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.04.003>
47. Makkar, H. P. S., Sharma, O. P., & Negi, S. S. (1980). Assay of proteins by Lowry's method in the presence of high concentrations of β -mercaptoethanol. *Analytical Biochemistry*, 104(1), 124–126.
48. Manns, J. M. (2011). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins. *Current Protocols in Microbiology*, 22(1). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03ms22>
49. Maqsood, Q., Sumrin, A., Mahnoor, M., Waseem, M., Ameen, E., & Tabassum, N. (2021). Potential use of Ribosome Inactivating Proteins (RIPS) as Cancer Therapeutic and its Indigenous Sources. *Annals of Medical and Health Sciences Research* | Volume, 11(S4).
50. Maqsood, Q., Sumrin, A., Mahnoor, M., Waseem, M., Ameen, E., & Tabassum, N. (2021). Potential use of Ribosome Inactivating Proteins (RIPS) as Cancer Therapeutic and its Indigenous Sources. *Annals of Medical and Health Sciences Research* | Volume, 11(S4).
51. Marchete, R., Oliveira, S., Bagne, L., Silva, J. I. de S., Valverde, A. P., Aro, A. A. de, Figueira, M. M., Fronza, M., Bressam, T. M., Goes, V. F. F. de, Gaspari de Gaspi, F. O. de, dos Santos, G. M. T., & Andrade, T. A. M. (2021). Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Alternanthera brasiliana* improve cutaneous wound healing in rats. *Inflammopharmacology*, 29(5), 1443–1458. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00862-3>
52. Miguel, M. (2018). Betalains in Some Species of the Amaranthaceae Family: A Review. *Antioxidants*, 7(4), 53. <https://doi.org/10.3390/antiox7040053>
53. Muñoz, R., Arias, Y., Ferreras, J. M., Jiménez, P., Rojo, M. A., & Girbés, T. (2001). Sensitivity of cancer cell lines to the novel non-toxic type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b. *Cancer Letters*, 167(2), 163–169. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00477-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00477-3)

54. Murshid, S. S. A., Atoum, D., Abou-Hussein, D. R., Abdallah, H. M., Hareeri, R. H., Almukadi, H., & Edrada-Ebel, R. (2022). Genus *Salsola*: Chemistry, Biological Activities and Future Prospective—A Review. *Plants*, 11(6), 714. <https://doi.org/10.3390/plants11060714>
55. Na Ayutthaya, P. P., Lundberg, D., Weigel, D., & Li, L. (2020). Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for the analysis of protein oligomers in plants. *Current Protocols in Plant Biology*, 5(2), e20107.
56. Natarajan, S., Xu, C., Caperna, T. J., & Garrett, W. M. (2005). Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Analytical Biochemistry*, 342(2), 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.04.046>
57. Ng, T. B., Liu, W. K., Sze, S. F., & Yeung, H. W. (1994). Action of α -momorcharin, a ribosome inactivating protein, on cultured tumor cell lines. *General Pharmacology: The Vascular System*, 25(1), 75–77. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(94\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0306-3623(94)90012-4)
58. Niu, L., Zhang, H., Wu, Z., Wang, Y., Liu, H., Wu, X., & Wang, W. (2018). Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. *PLoS ONE*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202238>
59. Olombrada, M., Pena, C., Rodríguez-Galán, O., Klingauf-Nerurkar, P., Portugal-Calisto, D., Oborská-Oplová, M., ... & Panse, V. G. (2020). The ribotoxin α -sarcin can cleave the sarcin/ricin loop on late 60S pre-ribosomes. *Nucleic acids research*, 48(11), 6210-6222.
60. Overview of protein assays methods | Thermo Fisher Scientific (2023). <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-assays.html>
61. Polito, L., Bortolotti, M., Maiello, S., Battelli, M., & Bolognesi, A. (2016). Plants Producing Ribosome-Inactivating Proteins in Traditional Medicine. *Molecules*, 21(11), 1560. <https://doi.org/10.3390/molecules21111560>
62. Poovitha, S., & Parani, M. (2020). Protein extracts from *Momordica charantia* var. *charantia* and *M. charantia* var. *muricata* show anti-lipidemic and antioxidant properties in experimental type 2 diabetic rats. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13370.

63. POWO. (2023). *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze | Plants of the World Online | Kew Science. Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:10294-2>
64. Preetha, T. S., Anju, S., Anilkumar, S., & Mini, I. (2018). Nutritional analysis of selected species of *Alternanthera* Forsskal (Amaranthaceae).
65. Puri, M., Kaur, I., Kanwar, R., Gupta, R., Chauhan, A., & Kanwar, J. (2009). Ribosome Inactivating Proteins (RIPs) from *Momordica charantia* for Anti Viral Therapy. *Current Molecular Medicine*, 9(9), 1080–1094. <https://doi.org/10.2174/156652409789839071>
66. Puri, M., Kaur, I., Perugini, M. A., & Gupta, R. C. (2012). Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications. *Drug Discovery Today*, 17(13–14), 774–783. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.007>
67. Quiroga, A. v., Barrio, D. A., & Añón, M. C. (2015). Amaranth lectin presents potential antitumor properties. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 478–485. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.035>
68. Ragucci, S., Bulgari, D., Landi, N., Russo, R., Clemente, A., Valletta, M., Chambery, A., Gobbi, E., Faoro, F., & di Maro, A. (2021). The Structural Characterization and Antipathogenic Activities of Quinoin, a Type 1 Ribosome-Inactivating Protein from Quinoa Seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8964. <https://doi.org/10.3390/ijms22168964>
69. Rahma, I. S., Indrayudha, P., Saifudin, A., & Muflihah, C. H. (2022). Cytotoxic Activity and Antiproliferation of Soursop Seed (*Annona muricata* L.) Protein on MCF-7 Cells. *Proceedings of the 4th International Conference Current Breakthrough in Pharmacy (ICB-Pharma 2022)*, 3, 349.
70. Rahmatullah, M., Hosain, M., Rahman, S., Rahman, S., Akter, M., Rahman, F., Rehana, F., Munmun, M., & Kalpana, M. (2013). Antihyperglycemic and antinociceptive activity evaluation of methanolic extract of whole plant of *Amaranthus Tricolor* L. (Amaranthaceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(5). <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i5.31>
71. Reinbothe, S., Reinbothe, C., Lehmann, J., Becker, W., Apel, K., & Parthier, B. (1994). JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress

- reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), 7012–7016. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.15.7012>
72. Riyama, V., Arthi, I., Neethu Krishnan, S., & Fathima Suman, P. (2021). Review on *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze for its pharmacognostic, phytochemical, pharmacological perspectives. <https://doi.org/10.20959/wjpr202111-21352>
73. Rose, J. K. C., Bashir, S., Giovannoni, J. J., Jahn, M. M., & Saravanan, R. S. (2004). Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *The Plant Journal*, 39(5), 715–733. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02182.x>
74. Rotondo, R., Ragucci, S., Castaldo, S., Oliva, M. A., Landi, N., Pedone, P. V., Arcella, A., & Di Maro, A. (2021). Cytotoxicity Effect of Quinoin, Type 1 Ribosome-Inactivating Protein from Quinoa Seeds, on Glioblastoma Cells. *Toxins*, 13(10), 684. <https://doi.org/10.3390/toxins13100684>
75. Roy, S., Sadhana, P., Begum, M., Kumar, S., Lodha, M. L., & Kapoor, H. C. (2006). Purification, characterization and cloning of antiviral/ribosome inactivating protein from *Amaranthus tricolor* leaves. *Phytochemistry*, 67(17), 1865–1873. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.011>
76. Rybak, S., Lin, J., Newton, D., Kung, H., Monks, A., Chen, H., Huang, P., & Leehuang, S. (1994). IN-VITRO ANTITUMOR-ACTIVITY OF THE PLANT RIBOSOME-INACTIVATING PROTEINS MAP-30 AND GAP-31. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.5.5.1171>
77. Sabbione, A. C., Ogutu, F. O., Scilingo, A., Zhang, M., Añón, M. C., & Mu, T.-H. (2019). Antiproliferative Effect of Amaranth Proteins and Peptides on HT-29 Human Colon Tumor Cell Line. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(1), 107–114. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0708-8>
78. Saengha, W., Karirat, T., Buranrat, B., Katisart, T., Ma, N. L., & Luang-in, V. (2022). Antioxidant properties and cytotoxic effects of *Alternanthera sissoo* and *Alternanthera bettzickiana* extracts against cancer cells. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 50(3), 12776. <https://doi.org/10.15835/nbha50312776>
79. Samudrala, P., Augustine, B., Kasala, E., Bodduluru, L., Barua, C., & Lahkar, M. (2015). Evaluation of antitumor activity and antioxidant status of *Alternanthera brasiliana* against

- Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Pharmacognosy Research*, 7(1), 66. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.147211>
80. Saravanan, R. S., & Rose, J. K. C. (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *PROTEOMICS*, 4(9), 2522–2532. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300789>
81. Scagliotti, G. V., Parikh, P., von Pawel, J., Biesma, B., Vansteenkiste, J., Manegold, C., Serwatowski, P., Gatzemeier, U., Digumarti, R., Zukin, M., Lee, J. S., Mellempgaard, A., Park, K., Patil, S., Rolski, J., Goksel, T., de Marinis, F., Simms, L., Sugarman, K. P., & Gandara, D. (2008). Phase III Study Comparing Cisplatin Plus Gemcitabine With Cisplatin Plus Pemetrexed in Chemotherapy-Naive Patients With Advanced-Stage Non–Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(21), 3543–3551. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0375>
82. Schirrmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *International Journal of Oncology*, 54(2), 407–419. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4661>
83. Silva-Sánchez, C., de La Rosa, A. P. B., León-Galván, M. F., de Lumen, B. O., de León-Rodríguez, A., & de Mejía, E. G. (2008). Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1233–1240.
84. Silva-Sánchez, C., De La Rosa, A. P. B., León-Galván, M. F., de Lumen, B. O., de León-Rodríguez, A., & De Mejía, E. G. (2008). Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1233–1240.
85. Singla, R. K., Dhir, V., Madaan, R., Kumar, D., Singh Bola, S., Bansal, M., Kumar, S., Dubey, A. K., Singla, S., & Shen, B. (2022). The Genus *Alternanthera*: Phytochemical and Ethnopharmacological Perspectives. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.769111>
86. Sukma, S. T., Indrayudha, P., Saifudin, A., & Mufliah, C. H. (2022). Cytotoxicity of Melinjo (*Gnetum Gnemon* L.) Seed Protein on MCF-7 and Vero Cells and Its Antiproliferation Activity. *Proceedings of the 4th International Conference Current Breakthrough in Pharmacy (ICB-Pharma 2022)*, 3, 339.

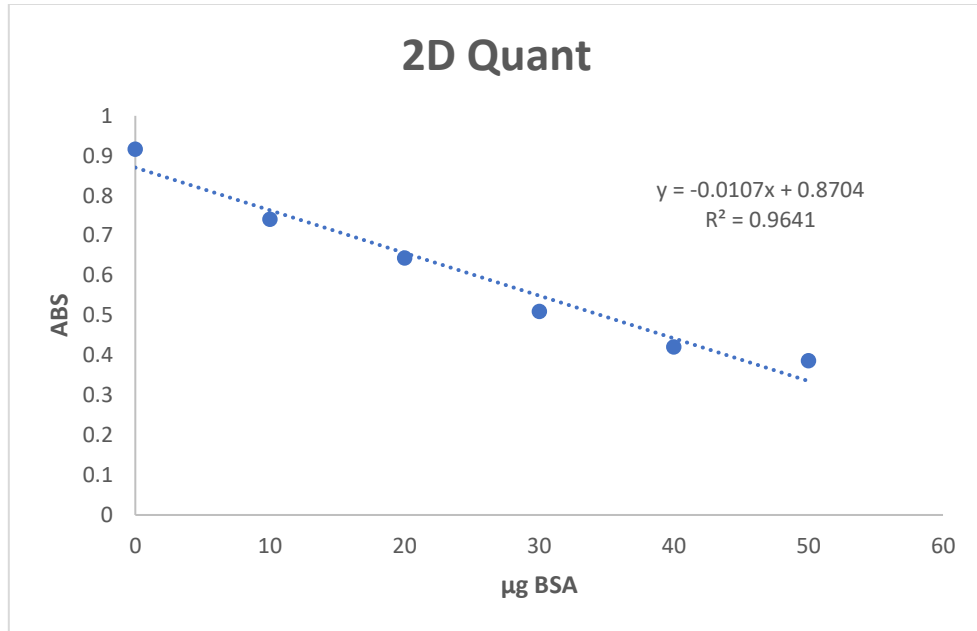
87. Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C., Miralles, B., & Hernández-Ledesma, B. (2019). Release of multifunctional peptides from kiwicha (*Amaranthus caudatus*) protein under in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(3), 1225–1232.
88. Walsh, M. J., Dodd, J. E., & Hautbergue, G. M. (2013). Ribosome-inactivating proteins. *Virulence*, 4(8), 774–784. <https://doi.org/10.4161/viru.26399>
89. WHO. (2020). Mexico. International Agency for Research on Cancer -World Health Organization. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-factsheets.pdf>
90. WHO. (2022a). Cáncer. Datos y Cifras -Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
91. WHO. (2022b). Cancer Tomorrow. THE GLOBAL CANCER OBSERVATORY. <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>
92. World Health Organization: WHO. (2022, 3 febrero). World Cancer Day: closing the care gap. World Health Organization: Global. Recuperado 14 de noviembre de 2023, de <https://www.who.int/news/item/03-02-2022-world-cancer-day-closing-the-care-gap>
93. Xiong, J., Yang, Q., Kang, J., Sun, Y., Zhang, T., Margaret, G., & Ding, W. (2011). Simultaneous isolation of DNA, RNA, and protein from *Medicago truncatula* L. *ELECTROPHORESIS*, 32(2), 321–330. <https://doi.org/10.1002/elps.201000425>
94. Yeung, H. W., Li, W. W., Chan, W. Y., Law, L. K., & Ng, T. B. (1986). Alpha and beta momorcharins: abortifacient proteins from the seeds of the bitter melon *Momordica charantia* (Family Cucurbitaceae). *International Journal of Peptide and Protein Research*, 28(5), 518–524. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1986.tb03286.x>
95. Yibchok-Anun, S., Adisakwattana, S., Yao, C. Y., Sangvanich, P., Roengsumran, S., & Hsu, W. H. (2006). Slow acting protein extract from fruit pulp of *Momordica charantia* with insulin secretagogue and insulinomimetic activities. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(6), 1126–1131.
96. Zaimy, M. A., Saffarzadeh, N., Mohammadi, A., Pourghadamyari, H., Izadi, P., Sarli, A., Moghaddam, L. K., Paschepari, S. R., Azizi, H., Torkamandi, S., & Tavakkoly-Bazzaz, J. (2017). New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on

nanoparticles. *Cancer Gene Therapy*, 24(6), 233–243.
<https://doi.org/10.1038/cgt.2017.16>

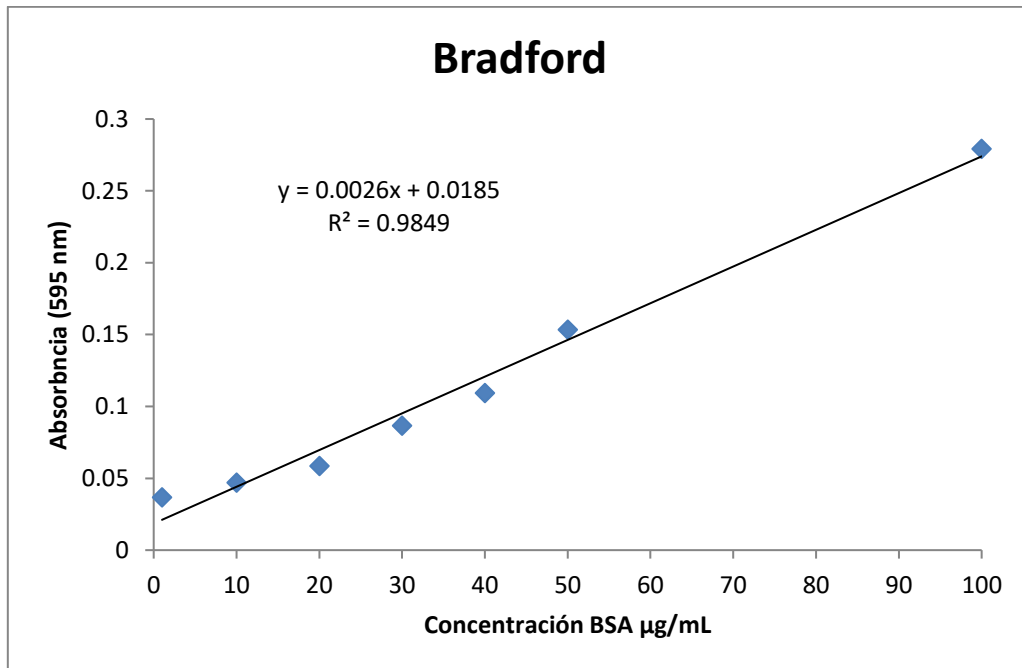
97. Zalles A, J., & de Lucca D, M. (2006). Descripción y uso de 100 plantas medicinales del altiplano boliviano. In *Descripción y uso de 100 plantas medicinales del altiplano boliviano* (pp. 1–105).
98. Zarovni, N., Vago, R., Solda, T., Monaco, L., & Fabbrini, M. S. (2007). Saporin as a novel suicide gene in anticancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy*, 14(2), 165–173.
99. Zhang, Y. hui, Wang, Y., Yusufali, A. H., Ashby, F., Zhang, D., Yin, Z., Aslanidi, G. v, Srivastava, A., Ling, C., & Ling, C. (2014). Cytotoxic genes from traditional Chinese medicine inhibit tumor growth both in vitro and in vivo. *Journal of Integrative Medicine*, 12(6), 483–494. [https://doi.org/10.1016/S2095-4964\(14\)60057-1](https://doi.org/10.1016/S2095-4964(14)60057-1)
100. Zhu, F., Zhou, Y.-K., Ji, Z.-L., & Chen, X.-R. (2018). The Plant Ribosome-Inactivating Proteins Play Important Roles in Defense against Pathogens and Insect Pest Attacks. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018>.

11. Anexos

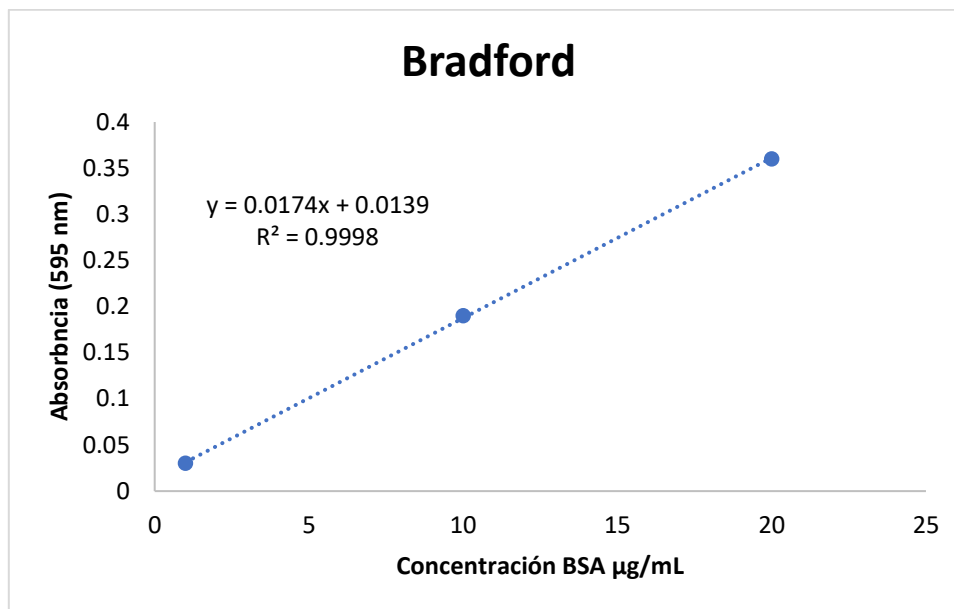
ANEXO 1. Curva 2D Quant con BSA como estándar



ANEXO 2. Curva de Bradford con BSA como estándar



ANEXO 3. Curva de Bradford con BSA como estándar



ANEXO 4. ANOVA de un solo factor: Número de Bandas vs Tipo de Hoja con extracción mediante TRI-Reagent

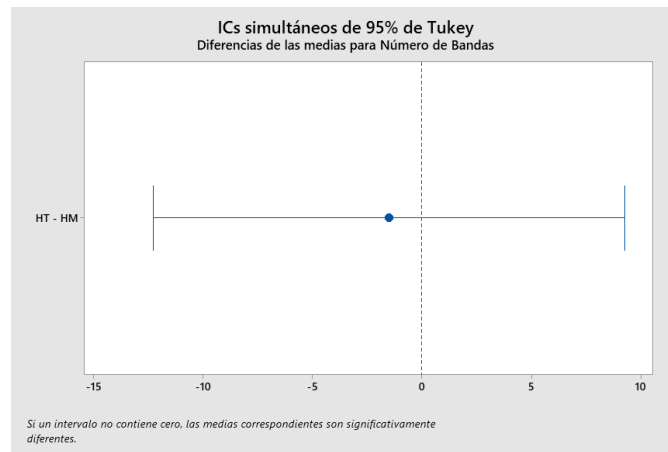
Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipo de Hoja	1	2.250	2.250	0.36	0.609
Error	2	12.500	6.250		
Total	3	14.750			

Prueba Tukey sobre los métodos utilizados.

Método de Tukey con una confianza de 95%

Tipo de		
Hoja	N	Media Agrupación
HM	2	4.000 A
HT	2	2.50 A

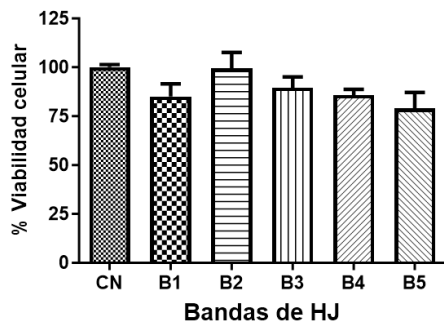
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



El valor p (0.609) es mayor que 0.05. Por lo tanto, se acepta H_0 y se concluye que no hay una diferencia significativa en el número de bandas obtenidas, por cada tipo de hoja en el intervalo de estudio.

ANEXO 5. Actividad antiproliferativa de HJ en la línea celular HEK 293 a dos concentraciones

Ensayo MTT en HEK 293 a Alta Concentración 24 h



Ensayo MTT en HEK 293 a Baja Concentración 24 h

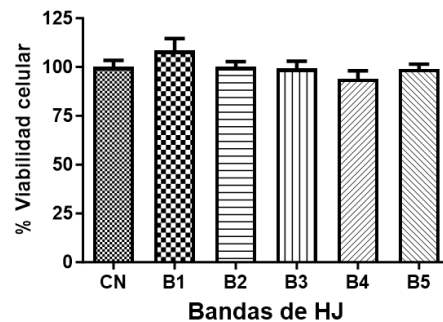


Figura 16. Efecto de las proteínas de bandas B1, B2, B3, B4 y B5 en contra células embrionarias de riñón humano HEK 293 a las 24 h de incubación. Los resultados se expresan en porcentaje del control negativo (CN), medio DMEM. Los datos son la media \pm desviación estándar (DE). $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. * representa $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$ todos ellos frente al control negativo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA (análisis de la varianza) unidireccional con el software GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Se aplicó la prueba de Dunnet para comparar cada tratamiento con el control, con una significación estadística de $p < 0.05$.