

Efecto anti-proliferativo en líneas celulares de cáncer de mama y cérvico-uterino causado por nanotubos de carbono múltipared - lectina de *Phaseolus lunatus* var. *silvester* Baudet

Jazmín Aguilar-Vázquez¹, María del Socorro Pina-Canseco², Yadira Gochi-Ponce³, Alma Dolores Pérez-Santiago^{1*}

¹Unidad de Bioquímica e Inmunología, División de Estudios de Posgrados e Investigación, Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Oaxaca, Oaxaca de Juárez Oaxaca, México; ²Laboratorio de Biología Celular en Cáncer e Inflamación, Centro de Investigación, Facultad de Medicina y Cirugía, UNAM-UABJO, Oaxaca de Juárez Oaxaca, México; ³Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Tijuana, Tijuana Baja California, México

ABSTRACT

Anti-proliferative effect in breast and cervical-uterine cancer cell lines, caused by multi-walled carbon nanotubes - lectin of *Phaseolus lunatus* var. *silvester* Baudet

Introduction. Carbon nanotubes have been conjugated with a wide range of molecules for use in medicine due to the properties they have, such as size, chemical and mechanical properties, and they can be targeted at specific sites.

Objective. To evaluate the cytotoxic effect of the multiple-walled carbon nanotube conjugate with lectin of *Phaseolus lunatus* (NTCPM-IPI) in four carcinoma cell lines (MDA MB-231, MCF-7, ViBo and HeLa).

Methods. Multiple-walled carbon nanotube (NTCPM) were purified in a mixture of concentrated acids, 1: 3 [HNO₃ (70%) / H₂SO₄ (95-98%)] and sonicated for 4 h, the pH was adjusted to 7 and incubated with lectin of *Phaseolus lunatus* var. *silvester* (IPI) for 4 h under constant stirring at 4° C. The cytotoxic activity of IPI and the NTCPM-IPI conjugate was measured by MTT and crystal violet tests at 24, 48 and 72 h, in two carcinoma cell lines.

Results. Synchronized ViBo, MDA MB-231 and MCF-7 cells showed a reduction of 51, 53 and 47% respectively with the NTCPM-IPI conjugate, while HeLa showed a 55% reduction with IPI alone.

Conclusions. Cytotoxic activity is potentiated using the NTCPM-IPI conjugate in synchronized ViBo, MDA MB-231 and MCF-7 cells; however, for HeLa cells the effect is produced by IPI alone, so conjugation is unnecessary.

RESUMEN

Introducción. Los nanotubos de carbono se han conjugado con una amplia gama de moléculas para el uso en medicina debido a

Historial del artículo

Recibido: 11 sep 2020

Aceptado: 28 feb 2021

Disponible en línea: 1 may 2021

Palabras clave

Lectina de *Phaseolus lunatus*, nanotubos de carbono, cáncer de mama, cáncer cérvico uterino, efecto citotóxico.

Keywords

Lectin of *Phaseolus lunatus*, carbon nanotubes, breast cancer, uterine cervical cancer, cytotoxic effect.

Copyright © 2021 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la *Creative Commons* (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

*Autor para correspondencia:

Víctor Manuel Martínez-Aguilar, Unidad de Bioquímica e Inmunología, División de Estudios de Posgrados e Investigación, Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Oaxaca/ Oaxaca de Juárez Oaxaca, México, 68030. Tel:+52951 229 97 30

Email: victor.martinez@correo.uady.mx

<https://revistabiomedica.mx>.

las propiedades que presentan, como tamaño, propiedades químicas y mecánicas, además que pueden dirigirse a sitios específicos.

Objetivo. Evaluar el efecto citotóxico que presenta el conjugado nanotubo de carbono de pared múltiple con lectina de *Phaseolus lunatus* (NTCPM-IPI) sobre cuatro líneas celulares de carcinoma (MDA MB-231, MCF-7, ViBo y HeLa).

Métodos. Los nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) se purificaron en una mezcla de ácidos concentrados, 1: 3 [HNO_3 (70 %) / H_2SO_4 (95-98 %)] y se sometieron a sonicación durante 4 h, el pH se ajustó a 7 y se incubó con lectina de *Phaseolus lunatus var. silvester* (IPI) durante 4 h en agitación constante a 4°C. La actividad citotóxica de IPI y el conjugado NTCPM-IPI se midió por pruebas de MTT y cristal violeta a las 24, 48 y 72 h, en dos líneas celulares de carcinoma.

Resultados. Las células ViBo, MDA MB-231 y MCF-7 sincronizadas mostraron una reducción del 51, 53 y 47 % respectivamente con el conjugado NTCPM-IPI, mientras que HeLa mostró un 55 % con IPI sola.

Conclusiones. La actividad citotóxica se potencializa utilizando el conjugado NTCPM-IPI en células ViBo, MDA MB-231 y MCF-7 sincronizadas; sin embargo, para células HeLa el efecto es producido por la IPI sola por lo que es innecesaria la conjugación.

INTRODUCCIÓN

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que reconocen de manera específica carbohidratos de la superficie celular o en suspensión, aglutinan células y precipitan glicoconjugados, algunas poseen por los menos dos sitios de reconocimiento a carbohidrato, de ahí su capacidad para aglutinar células (1). Algunas lectinas comparten la propiedad de participar en procesos biológicos y presentan la capacidad de interactuar con el sistema inmune (2). Las lectinas de leguminosas han sido estudiadas a partir de extractos crudos y purificados, ya que pueden presentar diversas propiedades biológicas como: antiproliferativas (3),

citotóxicas (4), mitóticas (5), inmunomoduladoras (6), antifúngicas (7) antivirales (8), entre otros.

Las semillas de *Phaseolus lunatus var. silvester* Baudet, también conocidas en la región de la Costa de Oaxaca como frijol “rojo rayado”, es un alimento comúnmente consumido que proporciona beneficios nutricionales debido a su alto contenido de fibra y bajo contenido de grasa, contiene aminoácidos esenciales principalmente ácido aspártico, serina y leucina (9). Se estima que la lectina purificada a partir del frijol “rojo rayado” tiene un contenido de 4.5 % de carbohidratos, como manosa, glucosa, fucosa, arabinosa y xilosa, lo que indica que se trata de una glicoproteína, asimismo es una de las muchas lectinas que muestran afinidad por 2-acetamido-2-desoxi-D-galactosa (o N-acetil-D-galactosamina) y cuentan con alta especificidad por eritrocitos humanos tipo A (10).

Por otra parte, los nanotubos de carbono (NTC) son alótropos de carbono, compuestos por una o varias capas de grafeno enrolladas, las cuales están formadas por múltiples anillos de átomos de carbono perfectamente estructurados. Su tamaño varía desde unos nanómetros de diámetros hasta varios milímetros de largo. Los enlaces químicos que unen a los átomos de carbono son uniones sp^2 y sp^3 que les confiere fuerza y longitud ilimitada; las láminas de grafeno se atraen entre sí mediante fuerzas de Van der Waals (11). Sus propiedades estructurales, mecánicas y electrónicas son impresionantes debido a su pequeño tamaño y masa (12), además de su gran área superficial que permite adsorber o conjugar con una amplia variedad de moléculas terapéuticas como: fármacos, proteínas, anticuerpos, ADN, enzimas, etc. (13,14). En el presente estudio se evaluó el efecto citotóxico de un conjugado preparado a base de nanotubos de carbono de pared múltiple con lectina de *Phaseolus lunatus var. silvester* (NTCPM-IPI) sobre cuatro líneas celulares de carcinoma (MDA-MB 231, MCF-7, HeLa y ViBo).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de *Phaseolus lunatus var. silvester* Baudet o frijol rojo rayado se obtuvieron en la comunidad de Jamiltepec, Oaxaca, México, las

cuales corresponden al número de catálogo 33373 (15), fueron almacenadas en un lugar fresco dentro de un frasco de vidrio hermético hasta el momento de su análisis; las semillas utilizadas en el análisis no tuvieron ningún tratamiento previo y se usaron completamente secas y maduras. El gel Sephadex G-200 y el azúcar N-Acetil-D-galactosamina fueron adquiridos en Sigma Aldrich, USA; el medio de crecimiento Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) 1X con L-glutamina fue marca Caisson, USA; el Suero Fetal Bovino (SFB) marca Biowest, USA; la solución de Tripsina-EDTA marca Corning, USA; el agua inyectable marca PiSA, México; los nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) fueron proporcionados por la Dra. Yadira Gochi Ponce del Centro de Investigación de Materiales del Instituto Tecnológico Nacional de México, Campus Tecnológico de Tijuana, México; los NTCPM se obtuvieron por el método de aspersión pirolítica, empleando 0.076 gr de ferroceno, 2 mL de Tolueno con una velocidad de flujo de 0.5 L/min de argón. Las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (CaCu) y mama fueron donación de la Dra. Rebeca López Marure del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Tlalpan, Edo. México: HeLa, proveniente de adenocarcinoma, positiva para VPH 18 (ATCC®CCL-2); ViBo, una línea celular generada en México la cual es negativa para VPH, obtenida de un carcinoma primario de CaCu; MCF-7, proveniente de adenocarcinoma, es una línea luminal epitelial con receptores de estrógeno, progesterona y glucocorticoides (ATCC®HTB-22); y MDA-MB 231, proveniente de adenocarcinoma, derivada de derrame pleural y negativa para ER, PR y E-cadherina y expresa p53 mutado (ATCC®HTB-26); Las muestras de eritrocitos se obtuvieron de donantes sanos provenientes del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Oaxaca, México.

Aislamiento y purificación de la lectina

Las semillas de *Phaseolus lunatus* var. *silvester* Baudet (200 g) fueron molidas en una licuadora industrial marca laboratory Blender, la harina obtenida fue empleada para extracción de proteínas

con buffer de fosfatos salinos (PBS) pH 7.2. Una vez obtenido el extracto se eliminaron proteínas de bajo peso molecular con $\text{NH}_2(\text{SO}_4)_2$ al 20 % de saturación. El sobrenadante fue ajustado posteriormente a 60 % de saturación nuevamente con $\text{NH}_2(\text{SO}_4)_2$. El precipitado obtenido fue suspendido en PBS pH 7.2 y posteriormente dializado contra agua y equilibrado con PBS pH 7.2 para su purificación por cromatografía de filtración en Sephadex G-200 (2 cm × 45 cm). A las fracciones obtenidas se les midió proteína por la técnica de Bradford (16) y actividad de lectina por hemaglutinación con eritrocitos humanos tipo A al 3 % (17), ésta se observó en un microscopio binocular marca Zeiss Axiolab. Se siguió el procedimiento reportado para extracción y purificación de la lectina de *Phaseolus lunatus* variedad silvester Baudet.

Construcción del Complejo NTCPM-lectina

Purificación y funcionalización de NTCPM

Se utilizaron 6 mg de NTCPM los cuales se adicionaron a 20 mL de una mezcla de ácidos concentrados [1:3 [HNO_3 (70 %)/ H_2SO_4 (95-98 %)](18), sometidos a sonicación por 4 h a 42 KHz, trascurrido el tiempo reposaron por 24 h a temperatura ambiente, enseguida se ajustó el pH a 7 por centrifugación con agua bidestilada a 3750 rpm, ajustado el pH se cambió el agua destilada por buffer de fosfatos PBS a pH 7.2, posteriormente se tomaron 150 μL de NTCPM y se incubaron con 600 μL de IPI (5 mg mL^{-1}) en agitación constante a 4°C por 18 h, finalmente el complejo formado se lavó con PBS a pH 7.2 a 10 000 rpm por 10 min, para eliminar residuos de lectina no unidos.

Cultivo celular

Las líneas celulares de cáncer de mama humano (MDA MB-231, MCF-7) y cáncer cervical humano (HeLa y ViBo) fueron cultivadas bajo las mismas condiciones, empleando medio de crecimiento RPMI-1640 con L-glutamina, acondicionándolo con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1 % de antibiótico / antimicótico. Las células se cultivaron a 37 ° C en una atmosfera de CO_2 al 5 % de humedad relativa.

Sincronización celular

La sincronización celular se llevó a cabo privando a las células de nutrientes, en el ensayo se disminuyó la concentración de SFB del 10 al 3 %, por lo que el crecimiento de las líneas celulares es más lento y hace que las células se encuentren sometidas a estrés, por lo tanto, disminuye la confluencia en los primeros días y entran en una misma fase de crecimiento, por lo que es necesario ampliar el tiempo del cultivo para alcanzar la confluencia deseada.

Actividad antiproliferativa y viabilidad celular en IPI

El efecto antiproliferativo de la lectina de *Phaseolus lunatus var. silvester* Baudet sobre líneas celulares de cáncer de mama y cáncer cérvico-uterino, se evaluó mediante pruebas colorimétricas utilizando sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, MTT) (19), debido a que este ensayo mide la proliferación celular reduciendo metabólicamente la sal por la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. El compuesto resultante (azul de formazán) puede solubilizarse y cuantificarse espectrofotométricamente. Las células se cultivaron en placas de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos para cultivos celulares. Se añadieron 100 μL por pocillo a una confluencia de 5×10^3 células en medio RPMI 1640 con L-glutamina y 10% SFB, después de 24 h se cambió el medio de crecimiento colocando 95 μL de medio nuevo y 5 μL de IPI, para tener una concentración final de la lectina de 0.04, 0.12, 0.2, 0.28, 0.42, 0.44, 0.52, 0.6, 0.7, 2.1, 3.5, 4.9, 6.3, 7.7, 9.1, 10.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, posteriormente se incubó a tres tiempos, 24, 48 y 72 h, en una atmósfera al 5% de CO_2 a 37 °C.

Transcurrido el tiempo de cada tratamiento, se agregaron 20 μL de MTT (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y se incubó por 4 h en oscuridad, posteriormente se decantó el medio y agregaron 50 μL de isopropanol acidificado, después se leyó a una densidad óptica (OD) de 570 nm en un lector de microplacas Multiskan FC.

La viabilidad celular se midió mediante ensayos de cristal violeta (CV) (20), pasado el tiempo de incubación se decantó el medio de crecimiento y añadieron 50 μL de glutaraldehído al 1,1% por 10

minutos para fijar las células, posteriormente se lavaron las células con agua corriente y escurrieron para teñir con 50 μL de violeta cristal por 20 min, a continuación, se lavaron con agua corriente y se colocaron 50 μL de ácido acético al 10% y se leyeron a una OD de 595 nm en un lector de microplacas Multiskan-FC.

Actividad antiproliferativa y viabilidad celular en conjugado NTCPM-IPI

El efecto antiproliferativo del conjugado NTCPM-IPI en líneas celulares de cáncer de mama y cáncer cérvico-uterino, se evaluó mediante pruebas colorimétricas de MTT y CV. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos para cultivos celulares, añadiendo 100 μL de células por pocillo a una confluencia de 5×10^3 células durante 24 h, transcurrido el tiempo se cambió el medio de crecimiento colocando 95 μL de medio nuevo y 5 μL del conjugado NTCPM-IPI, utilizando como controles a los NTCPM y IPI solos, en los mismos tiempos establecidos 24,48 y 72 h.

Análisis estadístico.

Todos los datos se expresan en porcentaje (%) de absorbancia media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes (significa \pm DS, $n = 3$), utilizando controles de disolvente y medio de crecimiento como referencia. El análisis estadístico se realizó con la prueba t Student utilizando el software Prisma (Graph Pad Prism 5), donde los valores fueron considerados estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$ (*) en comparación con el control de células en crecimiento normal.

RESULTADOS

Purificación de lectina de *Phaseolus lunatus var. silvester* Baudet

Se recuperaron 30 mL de una solución de lectina con 81,920 unidades hemaglutinantes (UHa mL^{-1}) y 12.5 mg mL^{-1} de proteína. La lectina obtenida a partir de *Phaseolus lunatus* mostró fuerte actividad hemaglutinante hacia eritrocitos humanos tipo A, como se muestra en la Figura 1.

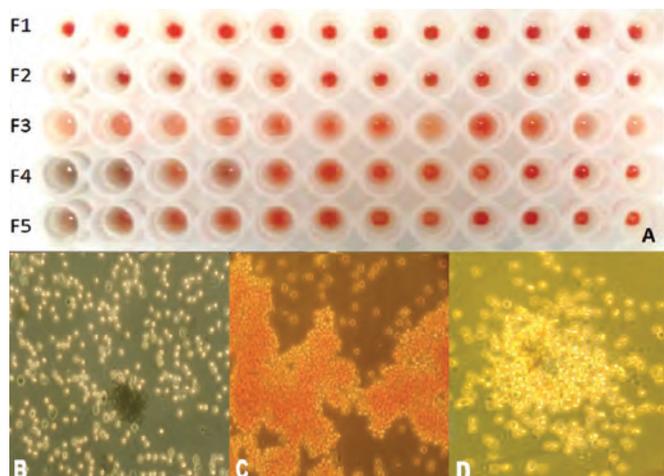


Figura 1. Actividad de lectina. A) Prueba de hemaglutinación: F1. Control negativo (PBS + eritrocitos humanos tipo A al 3 %). F2. Control negativo (NTCPM + eritrocitos humanos tipo A al 3 %). F3. Lectina de *Phaseolus lunatus* + eritrocitos humanos tipo A al 3 %. F4 y F5. Conjugado NTCPM-lectina + eritrocitos humanos tipo A al 3 %. Se observó que la lectina *Phaseolus lunatus* se mantiene activa después de la unión con los NTCPM; B) Micrografía de F2, a 40x, no se observó interacción; C) Micrografía de F3, vista a 40x., mostró afinidad hacia eritrocitos humanos tipo A y se observa en forma de aglutinación; D) Micrografía de F4, vista a 40x, mostró afinidad hacia los eritrocitos lo cual indicaría que la unión con los NTCPM fue exitosa.

Evaluación de la actividad citotóxica

Basados en los ensayos de MTT usando células de cáncer cérvico uterino y cáncer de mama tratadas con la lectina de *Phaseolus lunatus var. silvester*, se observó una reducción de la viabilidad celular en comparación con las células no tratadas con la lectina.

El cultivo de ViBo de 24 h de incubación con $0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la lectina presentó el 45 % de inhibición de la proliferación celular (Figura 2A) y una viabilidad celular del 63%; mientras que el cultivo de MDA MB-231 incubado con $0.44 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la lectina, a las 48 h presentó un 43 % de inhibición de la proliferación celular y viabilidad celular del 58 % (Figura 2B). Para el caso de células HeLa y MCF-7 incubadas con la lectina no se presentaron diferencias significativas en la proliferación celular y viabilidad, en comparación con el control de células no tratadas. Por su parte, las células HeLa sincronizadas sí presentaron inhibición de la proliferación en un 55 %, con una concentración

de $10.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la lectina (Figura 2C), y viabilidad celular del 49 %. En el cultivo de MCF-7 se observó el 42% de la inhibición de la proliferación celular con concentraciones de $10.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 2D), con viabilidad celular del 60 %. Ambas líneas presentaron inhibición de la proliferación celular a las 72 h de incubación con IPI.

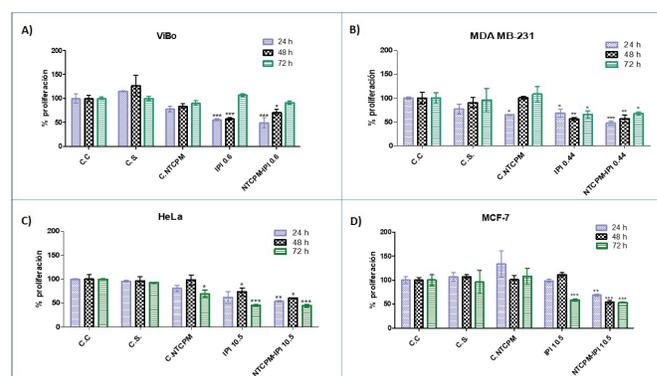


Figura 2. Efecto de la IPI, NTCPM y conjugado NTCPM-IPI sobre la proliferación de las líneas celulares neoplásicas ViBo (A), MDA-MB 231 (B), HeLa (C) y MCF-7 (D) evaluadas mediante los ensayos de MTT, de forma independiente y por triplicado, como se describe en material y métodos. C.C: Control de células vivas; C. S: Control de disolvente; C. NTCPM: Control de Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple; IPI: Lectina de *Phaseolus lunatus* en concentraciones de 0.44, 0.6 y $10.5 \mu\text{g mL}^{-1}$; NTCPM-IPI: Conjugado Nanotubo de Carbono-lectina de *Phaseolus lunatus* en concentraciones de 0.44, 0.6 y $10.5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

En cuanto al conjugado NTCPM-IPI, este resultó citotóxico para las dos líneas celulares de cáncer estudiadas, comparadas con los resultados producidos con la IPI sola en los tres tiempos establecidos y las mismas concentraciones de lectina, según la Tabla 1. El conjugado NTCPM-IPI en células ViBo mostró una actividad citotóxica del 51 % (Figura 2A) mientras que la viabilidad celular fue de 39% a las 24 h; para MDA MB-231 el efecto citotóxico fue de un 53 % a las 48 h (Figura 2B) y una viabilidad celular del 49 %.

Para las células sincronizadas HeLa el conjugado NTCPM-IPI mostró una actividad citotóxica del 54 % (Figura 2C), estadísticamente muy similar al expresado por la lectina sola, además la viabilidad celular fue de 66%. En las células MCF-7 se obtuvo un 47% de actividad citotóxica (Figura 2D) y una viabilidad celular del 54 %.

Tabla 1. Efecto citotóxico de la lectina de *Phaseolus lunatus* var. *silvester* Baudet y el conjugado NTCPM-IPI en células ViBo, MDA MB-231, HeLa y MCF-7 evaluados mediante ensayo de MTT.

CONDICIONES			IPI		NTCPM-IPI	
Células en crecimiento normal	Dosis-respuesta	Tiempo (h)	Actividad citotóxica (%)	Viabilidad celular (%)	Actividad citotóxica (%)	Viabilidad celular (%)
ViBo	0.6 µg mL ⁻¹	24	45	63	51	39
		48	43	67	29	42
		72	37	84	9	63
MDA-MB 231	0.44 µg mL ⁻¹	24	34	70	53	52
		48	43	58	44	63
		72	26	60	36	72
Células Sincronizadas	Dosis-respuesta	Tiempo (h)	Actividad citotóxica (%)	Viabilidad celular (%)	Actividad citotóxica (%)	Viabilidad celular (%)
HeLa	10.5 µg mL ⁻¹	24	47	107	38	82
		48	40	67	26	71
		72	55	55	54	54
MCF-7	10.5 µg mL ⁻¹	24	10	100	32	84
		48	34	89	46	78
		72	42	60	47	66

DISCUSIÓN

La lectina obtenida de *Phaseolus lunatus*, variedad *silvester* Baudet por los procedimientos tradicionales de purificación de proteínas (21-23), nos permitió obtener una glicoproteína con una concentración de proteína de 12.5 mg mL⁻¹, alta actividad específica y afinidad hacia eritrocitos humanos tipo A; así como un rendimiento del 13 %. Otras lectinas extraídas de *Phaseolus* presentan rendimientos similares, la lectina de *Phaseolus vulgaris* cv. Frijol chino pinto presentó un rendimiento del 8.6 % (24); la lectina de *Phaseolus vulgaris* cv. Frijol rojo Hokkaido, 17 % (25); la lectina de *Phaseolus vulgaris* cv. Frijol anasazi: 15,8 % (26) y la lectina de *Phaseolus vulgaris* cv. Frijol blanco el 53 %, en todos los casos la pigmentación interfiere en el proceso de purificación y no se alcanzan mayores rendimientos (27).

Respecto a los bioensayos de citotoxicidad de la lectina de *Phaseolus lunatus* sobre líneas celulares

de cáncer de mama y cáncer cérvico uterino los resultados demostraron que la IPI puede inhibir la proliferación celular en varias líneas de carcinoma como: MDA MB-231, MCF-7, ViBo y HeLa. El efecto antiproliferativo más rápido se presentó en células ViBo a las 24 h con un IC₅₀ de 0.662 µg mL⁻¹, en comparación con células HeLa donde su efecto antiproliferativo fue del 55 %, mayor al expresado en las células ViBo, con una IC₅₀ 9.690 µg mL⁻¹. Este comportamiento puede deberse a que las células HeLa fueron sincronizadas y que son positivas para VPH, por lo tanto, sobreexpresan a la inosina monofosfato deshidrogenasa, el factor de necrosis tumoral (TNF) y la metiltransferasa 1 (28) a diferencia de las células ViBo que son negativas para VPH. Las células MDA MB-231 mostraron mayor sensibilidad (IC₅₀ de 0.425 µg mL⁻¹) al tratamiento con la lectina de *Phaseolus lunatus* en comparación con la línea celular MCF-7 con una IC₅₀ de 9.228 µg mL⁻¹ a las 72 h. esta diferencia entre

las líneas celulares puede deberse a los receptores de membrana que se expresan para cada línea celular, por ejemplo para MDA MB 231, positiva a la expresión del receptor de EGF y al receptor PAR1 de la trombina, a diferencia de MCF-7 la cual es negativa para el receptor PAR1(29), además que fue sincronizada.

Debido a que la transformación maligna se acompaña de profundas alteraciones en los procesos de N y O glicosilación en células sanas (30), los O-glicanos expresados en la superficie de las células cancerosas aparecen como componentes sacáridos de las glicoproteínas, N-acetil-galactosamina (O-GalNAc) unidas a la membrana (antígeno T y Tn) y glucolípidos (Lewis y Lewis X). La sobreexpresión de O y N-glucanos se produce como glucoproteínas y glucolípidos asociados con la membrana, exponiéndolos en la superficie celular (31,32). Por lo tanto, estos receptores de membrana están expuestos y son repetitivos, lo que puede explicar la unión de la lectina a ellos. El antígeno T se expresa en las glucoproteínas de la superficie celular (33), mientras que la lectina de *Phaseolus lunatus* es específica para GalNAc, es decir, pertenece a una de las lectinas vegetales específicas para el antígeno T y Tn. También interactúa con alfa D-Gal, una interacción que depende de la unión a su sitio principal de lectina a través de una red de enlaces de hidrógeno (34).

Tras el reconocimiento por los receptores de la membrana celular del cáncer, las lectinas pueden regular varias vías de señalización responsables de los efectos apoptóticos, antiproliferativos y autofágicos sobre las células cancerosas *in vitro* e *in vivo*. Actualmente hay investigaciones sobre los efectos que las lectinas de *Phaseolus lunatus* producen dentro de los sistemas biológicos. En un estudio de Wu, J. *et al.*, en 2016, se reportó un péptido aislado a partir de semillas comestibles de *Phaseolus lunatus* *billb*, denominado "lunatin", que exhibió actividad hemaglutinante hacia eritrocitos humanos del grupo sanguíneo A, y se mantuvo estable hasta 50 °C, a pH 2-11. Lunatin presentó potente actividad antifúngica y actividad antiproliferativa hacia células de leucemia K562 con una IC₅₀ de 13.7

μM, mientras que las células HeLa y HepG2 solo se vieron débilmente afectadas (36). R. R. e Lacerda, *et al.*, en 2016 estudiaron la actividad antitumoral de una lectina presente en semillas de *Phaseolus lunatus* *L. var. cascavel* (PLUN), la lectina exhibió termoestabilidad hasta 80 °C, mostrando actividad a pH 2-11, también expresó actividad antitumoral contra las células derivadas del melanoma a dosis de 100 y 50 μg / mL a las 72 h, reduciendo hasta 83% las células tumorales (36), mientras que Jack Hu Wong y Tzi Bun Ng en 2005, reportaron actividad antiproliferativa en células MCF-7 a partir de un péptido obtenido de *Phaseolus Lunatus* *L.*, inhibiendo el 90% de la proliferación celular a las 72 h a una concentración de 5,71 μM (37).

La lectina de *Phaseolus lunatus* *var. silvester* Baudet es una lectina estable a temperaturas altas y a un rango amplio de pH (38), y posee actividad hemaglutinante hacia eritrocitos humanos tipo A (39), además es una lectina selectiva ya que es específica para N-acetil-D-galactosamina (40), presenta actividad antiproliferativa y citotóxica en distintas líneas celulares. Los resultados proporcionan evidencia de que esta lectina puede ser una valiosa herramienta para estudios de células cancerosas.

Debido a las propiedades y efectos que produce la lectina de *Phaseolus lunatus* se utilizó para la elaboración de un nuevo nanomaterial utilizando nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM).

Los NTC tienen la particularidad de ser materiales de muy pequeñas dimensiones con potencial para aplicaciones médicas (41). Por ejemplo, como portadores de droga en el organismo ya que son nanomateriales huecos y mucho más pequeños que las células sanguíneas (42). Además, pueden ser fácilmente modificados con una amplia variedad de moléculas a través de varios procedimientos. Por ejemplo, se pueden incorporar proteínas u otras biomoléculas sobre la estructura de los NTC y con ello aumentar su biocompatibilidad y biodisponibilidad, haciéndolos solubles en agua, altamente estable, dispersos, y con capacidad de carga (43-45), por lo que al ser funcionalizados se

mejora la eficacia terapéutica y reduce la toxicidad del NTC.

Por lo tanto los NTCPM empleados en este estudio al ser sometidos a sonicación en reflujo en ácidos concentrados permitieron la generación de grupos funcionales como COOH^- , OH^- y NH^+ , los cuales fueron utilizados para la funcionalización con la lectina de *Phaseolus lunatus*, este acoplamiento se puede verificar con técnicas de espectroscopia de infrarrojo, Raman, Uv-Vis, y técnicas de microscopia electrónica de barrido y transmisión, entre otras más; de la misma forma se puede verificar midiendo la actividad de lectina con eritrocitos humanos tipo A y observándolos al microscopio (Figura 1).

Debido a que el conjugado NTCPM-lectina es soluble a pH biológico, se mantuvo estable y disperso, y se evaluó sobre líneas celulares de carcinoma, demostrando que el efecto citotóxico de la lectina unida al NTCPM se potencializa en algunas líneas celulares de cáncer de mama y cáncer cérvico uterino. Las pruebas de MTT y CV fueron eficientes para la determinación del efecto citotóxico (46), para la línea celular ViBo (Figura 2A) se presentó un efecto citotóxico del 51 % a las 24 h con el conjugado, mayor al expresado con la lectina sola a las 24 h, el cual fue del 45%, sin embargo, transcurrido el tiempo de incubación con el conjugado la proliferación celular comienza a regenerarse, por lo que se puede decir que se presentó únicamente un arresto del ciclo celular dependiente del tiempo. Para las células HeLa sincronizadas (Figura 2C) no se presentó diferencia significativa del conjugado NTCPM-IPI (54 %) en comparación con la IPI (55 %) a las 72 h, por lo tanto, se puede decir que el efecto citotóxico es producido exclusivamente por la lectina y no por los NTCPM. Para las líneas celulares MDA MB 231 y MCF-7 sincronizadas se observó que el efecto citotóxico de la lectina se potencializa con la unión al NTCPM, para MDA MB-231 (Figura 2B) se mostró efecto con la IPI a las 48 h con un 43 %, mientras que con el conjugado NTCPM-IPI su efecto máximo se presentó a las 24 h con un 53 %, para el caso de MCF-7 sincronizadas (Figura 2D) se presentó un efecto del 42 % con la IPI y un 47% con el conjugado NTCPM-IPI.

Seyed Y.M. *et al.*, en 2012 reportaron la funcionalización de NTC de pared simple y su unión a las células cancerosas, la interacción de lectina con células MCF-7 se midió a concentraciones de 12.5 y 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando lectina HPA (*Aglutinina Helix pomatia*) sola y lectina HPA-NTCPS. La unión de la lectina HPA fue comparable al obtenido por lectina HPA-NTCPS, lo que indicó que el proceso de conjugación no afectó la velocidad de unión del epítipo por la lectina, por lo tanto, no potencializó su interacción (47). Xue, Y. en 2011 sugirió que la funcionalización NTCPM con lectinas podría aplicarse potencialmente en estudios biológicos celulares basados en la expresión de glucano en la superficie celular (48), y que los NTCPM en dosis bajas son un prometedor vehículo de administración de fármacos para las terapias dirigidas de células anormales en cáncer de seno (49).

CONCLUSIÓN

Se logró determinar la actividad citotóxica y antiproliferativa de la lectina de *Phaseolus lunatus var. silvester* Baudet a través de ensayos de viabilidad y proliferación celular utilizando el reactivo de MTT. La actividad citotóxica de la lectina de *Phaseolus lunatus* sobre líneas celulares de carcinoma ViBo, MDAMB-231 y MCF-7 sincronizadas se potencializa utilizando NTCPM, sin embargo, en células ViBo el efecto que se presenta solo es transitorio, y en células HeLa el efecto es producido exclusivamente por la lectina, por lo que es innecesaria la unión con el NTCPM. Los NTCPM tienen un alto potencial dentro del área biomédica, para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer, pudiéndose utilizar como biomarcadores o sistemas de detección con alta especificidad, sin embargo, se necesita una funcionalización eficiente para el empleo de estos nanomateriales, conjuntamente se requiere de más estudios para determinar sus posibles mecanismos de acción dentro de las células y hacer que esta afirmación sea verídica en un futuro.

REFERENCIAS

1. Hernández-Cruz P, Pérez-Campos E, Martínez-Martínez L, Ortiz B, Martínez G. Las lectinas vegetales como

- modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Rev Edu Bioquim*; 2005 Mar; 24(1): 21-27. <https://www.redalyc.org/pdf/490/49024104.pdf>
2. Yau T, Dan X, Ala-Ng CC, Bun-Ng T. Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules*. 2015 Feb; 20(3): 3791–810. doi.org/10.3390/molecules20033791
 3. Yau-Sang C, Lixin-Xia, Bun-Ng T. White kidney bean lectin exerts anti-proliferative and apoptotic effects on cancer cells. *Int J Biol Macromolecules*. 2016 Apr; 85:335-45. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.094
 4. Hernández-Rivera E, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A, García-Gasca T. Efecto citotóxico diferencial de una fracción rica en lectina de Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre Células Cancerígenas. 2° Congreso Nacional de Química Médica. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. 2002; 1-4
 5. Castillo–Villanueva A, Abdullaev F. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Rev Invest Clín*. 2005 Feb; 57(1): 55-64. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762005000100007
 6. Presanna VK, Venkatesh YP. Characterization of onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) as an immunomodulatory protein, inducing Th1-type immune response in vitro. *Int Immunopharmacology*. 2015 Jun; 26(2): 304-13. doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.009
 7. Vázquez-Luna A, Rivadeneira-Domínguez E, Díaz-Sobad R. Lectinas en frutas y plantas comestibles: nuevas posibilidades de interacción entre la ciencia de los alimentos y la biomedicina. *CienciaUAT*. 2012 Jun; 6(3): 60-66. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=441942927008>
 8. Fang EF, Lin P, Wong JH, Tsao SW, Ng TB. A lectin with anti-HIV-1 reverse transcriptase, antitumor, and nitric oxide inducing activities from seeds of extralong autumn purple bean. *J Agric Food Chem*. 2010 Jan; 58(4): 2221-9. doi.org/10.1021/jf903964u
 9. Pérez-Santiago AD. Estudio bioquímico de la lectina de *Phaseolus lunatus* var. *silvester* Baudet. Tesis para obtener el título de Maestra en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico. Instituto Tecnológico de Oaxaca. Oaxaca de Juárez. México. Agosto 1999
 10. Galbraith W, Goldstein IJ. Phytohemagglutinin of the lima bean (*Phaseolus lunatus*); Isolation, characterization, and interaction with type A blood-group substance. *Biochem*. 1972 Oct; 11(21): 3976–84. doi.org/10.1021/bi00771a022
 11. Montes-Fonseca SL. Aplicaciones médicas de los Nanotubos de carbón Nanovacunas, administración de fármacos y terapias génicas. *Synthesis*. 2008; 15: 1-5 http://www.uach.mx/extension_y_difusion/synthesis/2009/10/05/aplicaciones_medicas_de_los_nanotubos_de_carbon.pdf
 12. He H, Pham-Huy LA, Dramou P, Xiao D, Zuo P, Pham-Huy P. Carbon nanotubes: applications in pharmacy and medicine. *Biomed Res Int*. 2013;2013:578290. doi.org/10.1155/2013/578290
 13. Andrade-Cuel ML, López-López LI, Sáenz Galindo A. Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. *Rev Mex Cienc Farm*. 2014 Mar; 43(3): 9-18. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v43n3/v43n3a2.pdf>
 14. Chen L, Xie-H, Yu W. Functionalization methods of carbon nanotubes and its applications. In *Carbon nanotubes applications on electron devices*. edición Ago 2011; 9:213-226 José Mauricio Marulanda, IntechOpen. doi.org/10.5772/18547
 15. Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Phaseolus lunatus* var. *silvester* Baudet, ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En Portal de datos abiertos UNAM (en línea), México, Universidad Autónoma de México; <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:33373>
 16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7; 72:248-54. doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3
 17. Aragón OF, Mentel F, Auerswald EA. Amino acid sequence of a lectin-like protein from *Lachesis muta* stenophrys venom. *Toxicon*. 1996 Jul; 34(7): 763-9. doi.org/10.1016/0041-0101(96)00011-6
 18. Chen RJ, Zhang Y, Wang D, Dai H. Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. *J Am Chem Soc*. 2001 Apr 25;123(16):3838-9. doi.org/10.1021/ja010172b
 19. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4
 20. Hernández- Cruz CV. Efecto antiproliferativo, citotóxico e inductor de apoptosis del dietilditiocarbamato sódico (DDTC) en líneas celulares de cáncer cérvico uterino. Tesis Para obtener el título de Bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Mayo 2013; https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/biologia/tesis/tesis_hernandez_cruz.pdf
 21. Nascimento KS, Cunha AI, Nascimento KS, Cavada BS, Azevedo AM, Aires-Barros MR. An overview of lectins purification strategies. *J Mol Recognit*. 2012 Nov; 25(11):527-41. doi.org/10.1002/jmr.2200
 22. Mundekkad D, Sulochana P. Purification and characterization of a novel anti-proliferative lectin from *Morus alba* L. leaves. *Protein Pept Lett*. 2012 Aug; 19(8):839-45. doi.org/10.2174/092986612801619516

23. He XM, Ji N, Xiang XC, Luo P, Bao JK. Purification, characterization, and molecular cloning of a novel antifungal lectin from the roots of *Ophioglossum pedunculatum*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011 Dec; 165(7-8):1458-72. doi.org/10.1007/s12010-011-9367-z
24. Ang, A.S.W., Cheung, R.C.F., Dan, X. et al. Purification and characterization of a glucosamine-binding antifungal lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. chinese pinto beans with antiproliferative activity towards nasopharyngeal carcinoma cells. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014 Jan; 172(2):672-86. doi.org/10.1007/s12010-013-0542-2
25. Wong JH, Wan CT, Ng BT. Characterization of a haemagglutinin from Hokkaido red bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Hokkaido red bean). *J Sci Food Agric*. 2010 Jan 15; 90(1):70-7. doi.org/10.1002/jsfa.3782
26. Sharma A, Ng TB, Wong JH, Lin P. Purification and characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. (Anasazi beans). *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009:929568. doi.org/10.1155/2009/929568
27. Shan-Chan Y, Xia L, Bun-Ng T. White kidney bean lectin exerts anti-proliferative and apoptotic effects on cancer cells. *Int J Biol Macromol*. 2016 Apr; 85:335-45. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.094
28. Vázquez-Ortiz G, Piña-Sánchez P, Hidalgo A, Lazos M, Moreno J, et al., Análisis de expresión global del cáncer cérvico uterino: rutas metabólicas y genes alterados. *Rev Inv Clin*. 2005 Jun; 57(3):434-41 <http://www.scielo.org.mx/pdf/ric/v57n3a7.pdf>
29. López-Naranj F, Ávila- Álvarez EP, Guadarrama-Flores B, et al., Estudio de las células cancerosas y su activación celular en el cáncer de mama. *Rev Edu Bioquim*. 2018 Nov; 37(4):100-110. [http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2018/04/REB37\(4\)Dic2018.pdf](http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2018/04/REB37(4)Dic2018.pdf)
30. Poiroux G, Barre A, Van Damme EJM, Benoist H, Rougé P. Plant lectins targeting O-glycans at the cell surface as tools for cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 9;18(6):1232. doi.org/10.3390/ijms18061232
31. Hakomori S. Aberrant Glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res*. 1989; 52:257-331. doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60215-8
32. Gallegos-Velasco BI, Coutiño R, Martínez G, Hernández-Cruz P. Marcadores glicosilados en cáncer de mama. *Rev Edu Bioquim*. 2008 Feb; 27(2):52-59 http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2008/02/f_2Articulo.pdf
33. Gallegos-Velasco BI, Cuevas B, Pérez-Campos E, Coutiño R, Hernández-Cruz P. El papel de la Gelectina-3 en el desarrollo del cáncer de mama. *Rev Edu Bioquim*. 2013 Mar; 32(1): 3-12. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952013000100002
34. Jeyaprakash AA, Katiyar S, Swaminathan CP, Sekar K, Surolia A, Vijayan M. Structural basis of the carbohydrate specificities of Jacalin: an X-ray and modeling study. *J Mol Biol*. 2003 Sep 5;332(1):217-28. doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00901-X
35. Wu J, Wang J, Wang S, Rao P. Lunatin, a novel lectin with antifungal and antiproliferative bioactivities from *Phaseolus lunatus* billb. *Int J Biol Macromol*. 2016 Aug; 89:717-24. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.092
36. E Lacerda RR, do Nascimento ES, de Lacerda JT, Pinto LD, Rizzi C, Bezerra MM, Pinto IR. et al. Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L. var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. *Int J Biol Macromol*. 2017 Feb; 95:1072-81. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.097
37. Chan YS, Wong JH, Ng TB. A glucuronic acid binding leguminous lectin with mitogenic activity toward mouse splenocytes. *Protein Pept Lett*. 2011 Feb;18(2):194-202. doi.org/10.2174/092986611794475110
38. Vázquez-Calleja MA. Preparación de películas biopoliméricas con la lectina de *Phaseolus lunatus* var. Silvester Baudet. Tesis para obtener el título de maestro en ciencias en desarrollo regional y tecnológico. Instituto Tecnológico de Oaxaca. Diciembre 2016
39. Hernández-Díaz P, Martín-González O, Rodríguez de Pablos-Vélez Y, Ganem-Báez FA. Aplicaciones de las lectinas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 1999; 15(2) http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02891999000200002
40. Flores-Carlos LF. Funcionalización de nanotubos de carbono con lectina de *Phaseolus lunatus* var. Silvester para su aplicación biológica. Tesis para obtener el título de Licenciada en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Oaxaca. Noviembre 2017
41. Vardharajula S, Ali SZ, Tiwari PM, Eroğlu E, Vig K, Dennis VA, Singh SR. Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7:5361-74. doi.org/10.2147/IJN.S35832
42. Pastorin G, Kostarelos K, Prato M, Bianco A. Functionalized carbon nanotubes: Towards the delivery of therapeutic molecules. *J Biomed Nanotec*. 2005; 1(2): 1-10 <https://www.nanomedicinelab.com/wp-content/uploads/2012/03/8thslide05.pdf>
43. Shi-Kam NW, Jessop TC, Wender PA, Dai H. Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into Mammalian cells. *J Am Chem Soc*. 2004 Jun 9;126(22):6850-1. doi.org/10.1021/ja0486059
44. Pantarotto D, Briand JP, Prato M, Bianco A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem Commun (Camb)*. 2004 Jan 7;(1):16-7. doi.org/10.1039/b311254c
45. Madani SY, Naderi N, Dissanayake O, Tan A, Seifalian AM. A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as

- drug delivery tools. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2963-79. doi.org/10.2147 / IJN.S16923
46. Śliwka L, Wiktorska K, Suchocki P, Milczarek M, Mielczarek S, Lubelska K, et al. The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. *PLoS One*. 2016 May 19;11(5):e0155772. doi.org/10.1371/journal.pone.0155772
47. Madani SY, Tan A, Dwek M, Seifalian AM. Functionalization of single-walled carbon nanotubes and their binding to cancer cells. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7:905-14. doi.org/10.2147/IJN.S25035
48. Xue Y, Bao L, Xiao X, Ding L, Lei J, Ju H. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes with lectin for label-free dynamic monitoring of cell-surface glycan expression. *Anal Biochem*. 2011 Mar 1;410(1):92-7. doi.org/10.1016/j.ab.2010.11.019
49. Kavosi A, Ghale-Noei SH, Madani S, Khalighfard S, Khodayari S, Khodayari H, et al. he toxicity and therapeutic effects of single-and multi-wall carbon nanotubes on mice breast cancer. *Sci Rep* 8, 8375 (2018). doi.org/10.1038/s41598-018-26790-x