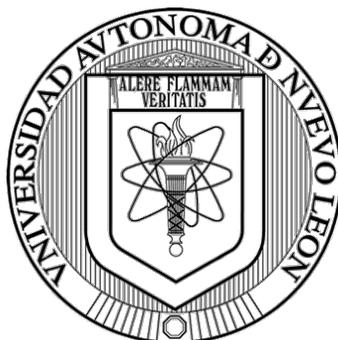


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ACTIVIDAD MODULADORA *IN VITRO* DEL PÉPTIDO
LUNASINA SOBRE EL CAMBIO DE ISOTIPO DE
INMUNOGLOBULINAS EN CÉLULAS DE BAZO DEL RATÓN
BALB/C**

POR
Q.B.P. LUIS JERÓNIMO PEREZ LIMÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

SAN NICOLÁS DE LAS GARZA, N. L. MÉXICO

Actividad moduladora *in vitro* del péptido lunasina sobre el cambio de isotipo de inmunoglobulinas en células de bazo del ratón BALB/c

DIANA
CABALLERO

Dra. Diana Caballero Hernández
Presidente

Cristina Rodríguez-Padilla

Dra. Cristina Rodríguez-Padilla
Secretario

Ana Carolina Martínez Torres

Dra. Ana Carolina Martínez Torres
Vocal 1

Patricia Tamez Guerra

Dra. Patricia Tamez Guerra
Vocal 2

Ricardo Gómez Flores

Dr. Ricardo Gómez Flores
Vocal 3

Katiushka Arévalo Niño



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado

SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios, ya que fue quien me ayudo a concluir estos estudios.

A mi familia, mis padres Jerònimo Pérez ,Esther Limón y hermana que me brindaron todo su apoyo desde el comienzo y me alentaron a cumplir esta etapa de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado.

A la Dra. Diana Caballero Hernández por la oportunidad brindada

A la Maestra en Ciencia Helen Yarimet Lorenzo Anota por haberme apoyo en la parte experimental de este trabajo.

DEDICATORIA

Quisiera dedicar esta tesis a mi familia la cual me ha apoyado y confiado en mí, en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

	Página
PORTADA	i
HOJA DE FIRMAS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivos específicos	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Modelos animales	23
6.2 Péptido lunasina	23
6.3 Obtención de células de bazo de ratón	23
6.4 Obtención de células mononucleares de bazo de ratón	23
6.5 Estandarización de reactivos	24
6.6 Ensayo de proliferación y viabilidad	24
6.7 Determinación de la actividad del péptido lunasina sobre linfocitos de bazo activados con lipopolisacárido (LPS)	25
6.8 Análisis de datos	25
7. RESULTADOS	26
7.1 Efecto del LPS sobre la viabilidad de cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratón BALB/c, obtenidos por el método de perfusión y analizados por el ensayo MTT	26
7.2 Efecto del LPS sobre la viabilidad de cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratón BALB/c, obtenidos por el método de maceración por el ensayo de calceína-AM	27
7.3 Efecto del LPS sobre la viabilidad de cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratón BALB/c, obtenidos por el método de perfusión, por el ensayo de calceína-AM	29
7.4 Efecto del péptido lunasina en la viabilidad de cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratón BALB/c.	30
7.5 Efecto del tratamiento del péptido lunasina en combinación con LPS y sobre la viabilidad de cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratón BALB/c	31
7.6 Efecto del biopéptido lunasina sobre el cambio de isotipo de inmunoglobulinas en cultivos primario de linfocitos de bazo	32
8. DISCUSIÓN	33
9. CONCLUSIÓN	37

RESUMEN

La lunasina es un péptido de origen vegetal, que se obtiene a partir de la fracción soluble de la soya, posee actividad biológica entre las que se destacan su actividad anti-inflamatoria, antitumoral y de modulación epigenética. En este trabajo se evaluó la capacidad del péptido lunasina para modular el cambio de isotipo de inmunoglobulinas secretadas por linfocitos de bazo de ratón BALB/c, vírgenes y activados. Se determinaron las condiciones de cultivo apropiadas, tiempo y concentración, para la activación de los linfocitos de bazo con lipopolisacárido (LPS). Se encontró que el péptido lunasina no tiene un efecto significativo sobre la viabilidad de linfocitos de bazo vírgenes o activados por LPS. En cuanto al cambio de isotipo de inmunoglobulinas, en presencia de lunasina se observó un perfil de isotipos de inmunoglobulinas similar al obtenido en células de bazo activadas con LPS, sin embargo se destaca el hallazgo de la presencia de IgA de forma independiente de la activación con LPS. En general, los resultados de este trabajo aportan evidencia del potencial del péptido lunasina para modular el cambio de isotipo, promoviendo la secreción de IgA por linfocitos de bazo de ratón BALB/c.

ABSTRACT

Lunasin is a peptide of plant origin, which is obtained from the soluble fraction of soybeans. It mostly mediates anti-inflammatory, antitumor, and epigenetic modulation activities. In this work, the potential of the lunasin peptide to modulate the isotype switch of immunoglobulins secreted by naïve and activated BALB/c-derived murine splenocytes was evaluated. Appropriate culture conditions, time, and concentration, for the activation of splenocytes by lipopolysaccharide (LPS) were determined. The lunasin peptide was found to have no significant effect on the viability of naïve or LPS-activated spleen lymphocytes. In the presence of lunasin an immunoglobulin isotype profile similar than that obtained in LPS activated splenocytes was observed. However, lunasin caused immunoglobulin switch to IgA, independently of the activation state of spleen cells. Taken together, the results of this work provided evidence of the potential of the lunasin peptide to modulate immunoglobulin isotype switch, particularly promoting IgA secretion by murine splenocytes.

1. INTRODUCCIÓN

Algunas proteínas además de brindar un aporte nutricional al organismo poseen secuencias de aminoácidos con actividad biológica, en muchos casos con efecto positivo en el organismo, estas secuencias aminoacídicas son conocidos como biopéptidos. Estos biopéptidos normalmente están conformados de 3 a 20 aminoácidos y son inertes cuando forman parte de una proteína, sin embargo cuando la proteína que los contiene sufre procesos como hidrólisis por enzimas digestivas o procesos químico como fermentación se activan.

En la actualidad se ha trabajado para aislar los diferentes biopéptidos a partir de su fuente de origen, la cual puede ser animal o vegetal, para un uso terapéutico, más de 1500 se han descrito hasta el día de hoy. La soya posee una gran variedad de metabolitos que poseen actividad biológica entre los cuales podemos encontrar los siguientes: isoflavonoides, saponinas e inhibidores de proteasa, y recientemente se ha descrito y estudiado un péptido de 43 aminoácidos de la fracción soluble en agua llamado lunasina. Además de la soya, donde se reportó inicialmente, posteriormente se ha demostrado la presencia de la lunasina en otros cereales. El péptido lunasina cuenta con nueve residuos de ácido aspártico (D) en el extremo C-terminal el cual le permite interacciones de hipoacetilación de la cromatina con inhibición de la acetilación, dicha modificación regula la expresión génica evitando la unión de factores de transcripción, además de contar con un motivo RGD, el cual es importante para el reconocimiento y adhesión celular. En el caso de la actividad antiinflamatoria, se ha descrito que el péptido lunasina disminuye la secreción de citocinas inflamatorias como: IL-1 β IL-6, INF- γ y el factor de necrosis tumoral, TNF- α , en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y en células RAW 264.7 estimuladas con LPS. En este trabajo, el objetivo fue estudiar la capacidad de la lunasina para estimular el cambio de isotipos de inmunoglobulinas en células de bazo de ratón BALB/c, los resultados de este trabajo amplían el conocimiento del potencial de este biopéptido para modular funciones biológicas.

2. ANTECEDENTES

El biopéptido lunasina

En 1987 Shoji Odani, Takehiko Koide y Teruo Ono, mediante los ensayos de cromatografía y el ensayo de degradación de Edman, descubrieron la presencia de un polipéptido en la soya el cual se conforma por 43 aminoácidos, este polipéptido se caracterizaba por presentar una alta cantidad de ácidos aspárticos en su carboxilo terminal la cual era 9 residuos, además presentaba una región de adhesión celular el cual se conformaba por tres aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD) (Odani *et al.* 1987).

En 1999 se determinó que el polipéptido conformado por 43 aminoácidos llamado lunasina conformaba parte de las proteínas soluble de la soya llamadas albuminas, estas proteínas tienen como característica regulan el crecimiento de la planta y presentar una alta cantidad de aminoácidos rico en azufre, presentando a la soya como un suplemento alimenticio acorde a la FAO (George *et al.* 1991).

La secuencia del péptido lunasina es la siguiente: SKWQHQQDS CRKQKQGVNLTPC-EKHIMEKIQG-RGD-DDDDDDDD (Fig. 1), y dicha secuencia se divide en cuatro regiones de acuerdo a su función. La primera región está conformada por los primeros 22 aminoácidos, esta región se desconoce su función hasta en la actualidad, se ha sugerido que puede modular la interacción con la histona 4, sin embargo esto todavía no se ha determinado, la segunda región está conformada por los aminoácidos 23 al 31, la cual presenta un estructura de hélice, permitiendo la interacción con las proteínas conservada de la cromatina, la tercera región está conformada por los aminoácidos 32-34 y es de suma importancia debido a que en esta región se presentan tres aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), los cuales son de suma importancia para el biopéptido lunasina debido a que le permite el reconocimiento y adhesión a las células mediante receptores de integrinas, estudio recientes sugieren que esta región es de suma importancia para su actividad anti-inflamatoria y cáncer, además se ha descrito que sin la presencia de esta región el biopéptido lunasina no interactúa con la células. Y por último la cuarta región está conformada por los aminoácidos 35- 43, la cual tiene como

función la unión a las histonas, mediante una interacción de carga debido a que el región posee una carga negativa y las histonas poseen una carga positiva llevando a cabo una complementariedad de cargas, además se sugiere que esta región también es importante para llevar a cabo su mecanismo epigenético. Se han descrito varias actividades biológicas entre las cuales se destacan su actividad anti-inflamatoria, antitumoral mediante la actividad epigenética.

Después de la determinación del péptido lunasina en la sección de las proteínas solubles de la soya llamada albumina, se optó por usar diversos solventes para su obtención como: etanol, agua y Tris/HCl, destacando el agua como mejor solvente para la obtención de dicha proteína. Posterior a esto se realizaron ensayos para determinar la presencia del péptido lunasina en otros cereales o plantas como: amaranto, trigo, centeno y cebada, sin embargo solo se presentaron secuencias parciales o secuencias similares, como el trigo, centeno y cebada, los cuales presentaron secuencias parciales de la secuencia del péptido lunasina, pero el amaranto presentó una secuencia similar al péptido mostrando tener las mismas características (Alaswad & Krishnan 2016).

Uno de los primeros experimentos realizados con el péptido lunasina fue transfectar a la cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) con la secuencia que la codifica para el péptido lunasina usando el plásmido DH5a, se observó que la transfección ayuda a la formación del septo Fts-Z para evitar elongaciones y crecimientos anormales en la bacteria, pero al momento de expresarse la secuencia completa esta presenta la eliminación de la cola de ácido aspártico. Al determinar que la secuencia del péptido lunasina presentaba un efecto positivo y que tenía la capacidad de regular el crecimiento celular en células procariontes (*E. coli*), se evaluó su efecto en células eucariotas, para lo que se usaron las líneas celulares: Hepa, 1c17, MCF-7 y C3H10T1/2, las cuales se transfectaron con la secuencia que expresa al péptido lunasina con el plásmido pEGFP-C1 y GFP para monitorear la expresión de la lunasina.

A las 48 h se determinó que la morfología de las tres líneas no fue afectada, pero el DNA cromosomal sí, mostrando fragmentación, esto se determinó mediante el ensayo Túnel, se observó que al cabo de las 72 h se presenta degradación de la membrana provocando lisis celular, esto se debe que el complejo del cinetocoro no se forma correctamente y los

microtúbulos no se adhieren a los centrómeros, llevando a un arresto en mitosis y, finalmente a la lisis celular. (Galvez, & Benito, 1999).

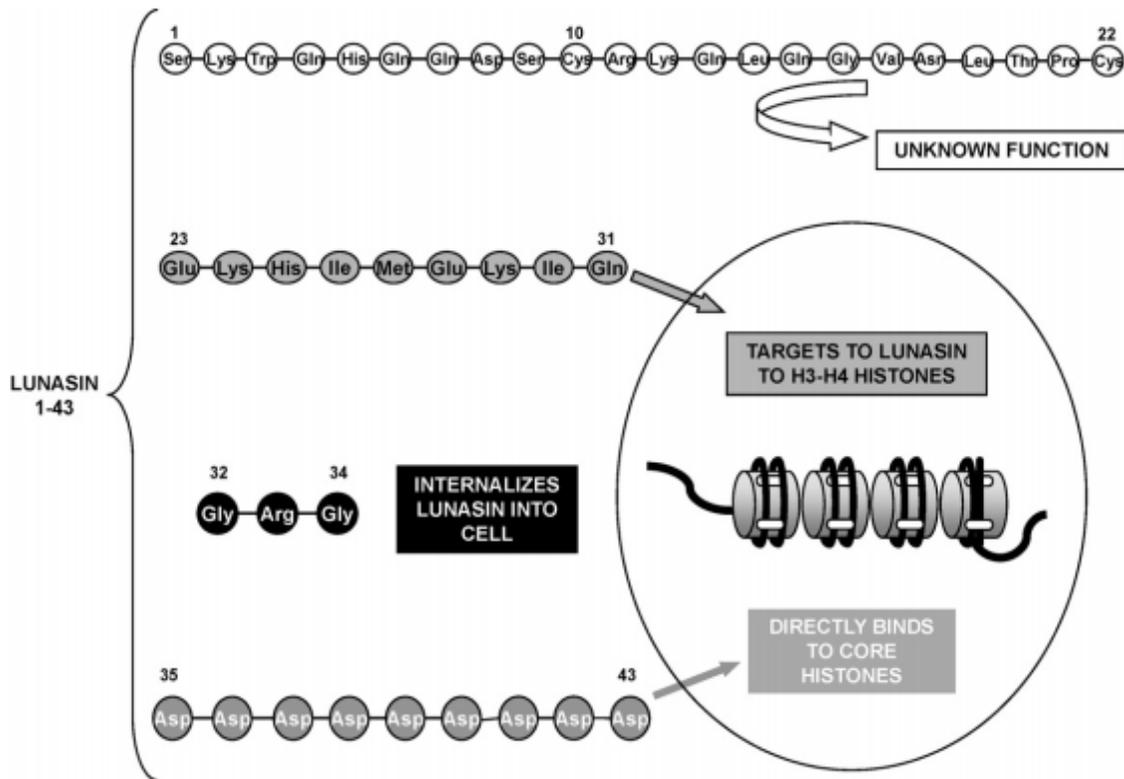


Figura 1. Secuencia del péptido lunasina obtenido de la soya. Se indican las funciones de las fracciones que lo componen. (Figura tomada de Hernandez-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO, 2009).

Sistema inmunológico e indicadores de la respuesta inmune humoral

El sistema inmune está conformado por una serie de órganos entre los cuales destacan: timo, bazo, ganglios linfáticos, entre otros y un conjunto de células entre las cuales se encuentran: linfocitos B y T, células fagocíticas, células NK, células presentadoras de antígenos y células polimorfonucleares, los cuales se encargan de proteger al organismo de agentes infecciosos como bacterias y virus. El sistema inmune se divide en inmunidad innata que es la primera línea de defensa ante los patógenos y se caracteriza por usar componentes físicos y químicos del organismo además de no ser específica ni de generar una memoria, además de su amplia

variedad de inmunoglobulinas e inmunidad adaptativa que es una respuesta más específica y como característica tiene la formación de memoria, sin embargo este tipo de respuesta es activada una vez que los patógenos sobrepasa el sistema inmune humoral (Nicholson 2016; Marshall *et al.* 2018; Chaplin 2010)

Existen diversos indicadores para medir la activación o regulación del sistema inmunológico en diferentes condiciones fisiopatológicas por compuestos con actividad biológica,. La respuesta celular se puede evaluar mediante algunos indicadores como activación celular, actividad citotóxica y regulación de la población Th1 y Th2, además de la proliferación de células mononucleares Para la respuesta inmune innata se han empleado como indicadores: la regulación de la producción de citocinas por células dendríticas y macrófagos, además de medir la actividad fagocítica en macrófagos, activación de células presentadoras de antígeno como células dendríticas, debido a que son esenciales para la activación de la respuesta inmune adaptativa y células NK. Además de medir activación en células NK se ha determinado su actividad citotóxica, además de la determinación del cambio de isotipo de inmunoglobulinas. (Mao 2019; Nedumpun 2019; Hernández-Ledesma *et al.* 2009; Tung 2014)

Efecto del péptido lunasina en la respuesta inmune

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa ante los patógenos, esta defensa se conforma por barreras físicas como la piel y mucosas, químicas como pH presente en el estómago y componentes celulares como: células asesinas naturales NK (del inglés, Natural Killer) células fagocíticas y células B. Un componente característico de esta respuesta es su capacidad de reconocer una amplia varia de antígeno lo cual se debe a su amplio repertorio de inmunoglobulinas que se secretan una vez que es activada y diferenciada las células B (Kindt *et al.*, 2007). Bajo ciertas condiciones el sistema inmune puede verse comprometido volviendo al hospedero vulnerable, por ejemplo por infecciones parasitarias, bacterianas o en cáncer, casos en los que la función de los linfocitos se ve afectada por tratamientos como la quimioterapia, sin embargo, hay compuestos como el biopéptido lunasina que puede

restaurar la respuesta celular o potenciar otros compuestos para la activación de la respuesta inmune.

Esto se observó en la células NK las cuales al ser sometidas a una combinación de citocinas de la IL-2 e IL-12 en presencia del biopéptido lunasina presentaron un incremento del 20% en la activación una mayor producción la cantidad de granzimas y perforinas, mientras que en las células NK que fueron sometidas solo a la combinación de IL-2 e IL-12 el porcentaje de activación fue menor, un 3%, por lo que concluyeron que el biopéptido lunasina puede actuar en sinergia con citocinas de activación, además de requerir una menor concentración para su activación (Chang 2014; Gessner 1993).

También se ha observado que el péptido lunasina es capaz de estimular en el sistema inmune innato, esta actividad se observó en células dendríticas, las cuales al ser tratadas con el biopéptido lunasina mostraron tener una activación similar a los tratamientos con la endotoxina bacteriana lipopolisacárido (LPS) 1 $\mu\text{g/mL}$, mostrando una mayor expresión del receptor CD86 y menor de CD40 al compararse con el tratamiento con LPS, además se ha visto que tiene capacidad de actuar como adyuvante para mejorar la respuesta inmune celular antitumoral (Tung *et al.* 2014).

Actividad anti-inflamatoria de la lunasina

La inflamación es una respuesta que es mediada por el sistema inmune que se desencadena ante la presencia de un compuesto extraño como patógenos al entrar al organismo, esta respuesta tiene como función la eliminación del compuesto extraño mediante activación de la respuesta celular, la cual es mediada por la secreción de citocinas. Esta respuesta si no es controlada puede desencadenar una respuesta aguda y posteriormente una respuesta crónica en la cual puede presentar daño en el tejido o región donde se desencadenó la respuesta inmune, por lo que en la actualidad se ha buscado nuevos compuestos de para modular dicha respuesta evitando así un daño en la persona. Un de esto compuestos de estos compuesto es el biopéptido lunasina el cual se ha descrito con la capacidad de modular compuesto que regula o activan la respuesta inflamatoria.

Se han realizado estudios para medir la actividad anti-inflamatoria del péptido lunasina frente a compuestos endógenos, usando para ello la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 estimuladas con 1 mg/mL LPS en conjunto del biopéptido lunasina en diferentes concentraciones y diferentes regiones del biopéptido. Se observó que la concentración mínima de lunasina para observar disminución de la secreción de citocinas inflamatorias es de 20 μ M. Sin embargo, se observó que la concentración máxima para disminuir la secreción de citocinas inflamatorias es 200 μ M, con la que se observa una reducción en la secreción de algunas citocinas, como la IL-6 (23%) y TNF- α (37%), además se evaluó si cada una de las regiones que conforman al biopéptido lunasina pueden disminuir la inflamación por separado o solo en conjunto, sin embargo se obtuvo que las regiones individuales no tuvieron efecto sobre los niveles de la citocinas inflamatorias, por lo que son necesarias las cuatro regiones para llevar a cabo la actividad anti-inflamatoria (Hernández-Ledesma, Hsieh, & de Lumen, 2009). Estudios recientes han descrito que el biopéptido lunasina inhibe precursores de la activación de la respuesta inflamatoria por la vía canónica de NF- κ B (Hernández-Ledesma *et al.* 2009).

Además se ha estudiado el efecto de la lunasina en algunas enfermedades que involucran procesos inflamatorios mediados por citocinas pro-inflamatorias, los cuales son capaces de dañar tejidos u órganos, tal es el caso de la artritis reumatoide, una enfermedad autoinmune ocasionada por la liberación de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 e IL-8 por fibroblastos, las cuales son inducidas para su secreción por la citocina IL-1 β también producidas por los fibroblastos, produciendo así la inflamación de la membrana sinovial. Se ha investigado el efecto *in vitro* del péptido lunasina en artritis reumatoide en muestras de pacientes del hospital de Tongji (Wuhan, China). Con el tratamiento a 200 μ M se observó disminución de la secreción de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-8 y del MMP-3, inducidas por la IL-1 β , observándose resultados a concentraciones mayores a 10 μ M. Además de esta actividad anti-inflamatoria, se observó que el tratamiento con lunasina a una concentración de 200 mM durante un lapso de 48 h, era capaz de inducir apoptosis de los fibroblastos sinoviales por la vía de la caspasas 3 y Bax, suprimiendo así la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2. (Jia *et al.* 2015). Además, se ha observado que la lunasina inhibe la vía de activación de NF-

κ B mediante la unión de la integrina α V β 3, la cual es mediada por la región RGD (Cam & Mejia, 2012).

Debido a los antecedentes de la lunasina como regulador de los procesos inflamatorios ante antígenos como LPS o en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide *in vitro*, se investigó su efecto ante una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias como el asma, la cual es provocada por una amplia gama de citocinas y células inmunes, pero que en la mayoría de los casos tiene su origen en la respuesta desregulada de células T cooperadoras tipo 2 (Th2), dando como resultado una inflamación eosinofílica crónica en las vías respiratorias. Para medir el efecto de la lunasina se empleó un modelo *in vivo* en el cual se implementaron dos modelos de asma, uno con Ova (el cual es mediado por Th2) y el otro con LPS. En el modelo de asma inducido por Ova, el péptido lunasina contrarresta el efecto de la OVA, dando como resultado una disminución en activación de eosinófilos y una disminución del gen *Fizz1*, el cual es importante en la enfermedad inflamatoria dado que promueve la expresión de α -SMA y del colágeno tipo 1 los cuales son factores para la remodelación de las vías respiratorias en los modelos de asma y además disminuye la secreción de IL-4 provocada por OVA de 185 pg/mL a 70 pg/mL. Por otra parte, en el modelo de LPS se obtuvieron los mismos resultados, una disminución en activación de eosinófilos y una disminución de la expresión del gen *Fizz1*, además se determinó su efecto sobre células de ganglios linfáticos tratadas con OVA, obteniendo una disminución de 0.5 ng/mL a 2.5 ng/mL de IL-4. (Yang *et al.* 2015)

Actividad del péptido lunasina en cáncer

El cáncer es una de las principales enfermedades que causa una gran mortalidad a nivel mundial esto se debe a su actividad metastásica, la cual le permite extenderse a otros órganos e invadirlos, provocando una alta tasa de mortalidad a nivel mundial, algunos de estos son: pulmón (1,76 millones de muertes) colorrectal (862 000 muertes) estómago (783 000 muertes) Hígado (782 000 muertes) mama (627 000 muertes) acorde a la Organización Mundial de la Salud (2018). Sin embargo, se ha determinado que algunos alimentos que contienen compuesto bioactivos que brindan un beneficio extra aparte de nutrir al organismo,

uno estos alimentos es la soy, cuyo consumo en algunos países de Asia como Japón, Corea e Indonesia, está asociado a menor incidencia de algunos tipos de cáncer como mama, próstata, pulmones, vejiga, así como enfermedades cardiovasculares y osteoporosis, de acuerdo a estudios epidemiológicos (Wang, Murphy 1994, Hernández-Ledesma & de Lumen 2008).

Estos beneficios han sido asociados con la actividad de algunos metabolitos secundarios, entre los cuales están: inhibidores de proteasa Bowman-Birk (BBI), hexafosfato de inositol (ácido fítico), β -sitosterol, saponinas e isoflavonoides. Los más estudiados de los metabolitos ya mencionado con anterioridad son los inhibidores de proteasa Bowman-Birk (BBI) y los isoflavonoides. El BBI es un inhibidor de la serina proteasa, posee la capacidad de inhibir la tripsina y la quimiotripsina, posee actividad anti-tumoral y quimiopreventiva en pulmones y el tracto gastrointestinal. Los isoflavonoides son fotoquímicos que se sintetizan a partir de productos del ácido shikimico y las vías de malonilo en la fusión de un fenilpropanoide con tres residuos de malonil CoA, se ha visto que su consumo está asociado a disminución en el riesgo de padecer cáncer de próstata y cáncer de mama, además pueden estimular la activación de caspasas 3 y regula la apoptosis por las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL. En estudios *in vivo* se ha observado que evita evita la trombogénesis en arterias enfermedad cardiovascular, e incluso brinda protección contra enfermedades coronarias disminuyendo los lípidos en sangre (McCue & Shetty 2004). Y por último, la lunasina, la cual posee actividad epigenética para regular el ciclo celular, además de regular vías importantes para la proliferación en cáncer como FAK y la vía Akt, encargada de regular la expresión de la metaloproteinasas.

El cáncer de mama es de una enfermedad con mayor mortalidad, los primeros ensayos con el biopéptido lunasina se realizaron en una línea tumoral de cáncer de mama, la MDA-MB-231, la cual fue tratada con lunasina a una concentración de 75 μ M, y se observó una inhibición de un 17 a 19 % en la acetilación de la Histona 4 (H4) en las posiciones H4-Lys 8 y H4-Lys 12, mientras que en la Histona 3 (H3) se observó una inhibición del 30.2 % en la posición de Lys-9, 14. Se ha visto que los procesos de acetilación y desacetilación pueden ser controlados por la lunasina, lo cual sugiere un uso potencial de la misma para tratar

enfermedades a nivel genético como el cáncer de mama. (Hernández-Ledesma, Hsieh, & De Lumen, 2011).

En otros estudios realizados *in vitro* se estudió el efecto de la lunasina sobre dos líneas celulares con diferentes receptores de integrinas como la líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7, se encontró que la lunasina tiene un efecto citotóxico mayor en MDA-MB231 que en la línea MCF-7, mediante el ensayo de la herida se determinó que la lunasina a una concentración entre 0-20 μ inhibe la migración de MDA-MB-231 y MCF-7, además por el ensayo de invasión usando cámara Transwell se determinó que la lunasina disminuyó el número de células invasoras en las células MCF-7 y MDA-MB-231, esto en un rango de concentración de 10-20 μ M del péptido. Por otro lado, mediante zimografía en gelatina y *Western blot*, se determinó la presencia de la metaloproteinasas MMP, en este estudio se midió MMP-2/-9, en la línea celular de MCF-7 la lunasina redujo la expresión de MMP-9, y no afecto MMP-2. Por otro lado, en la línea celular MDA-MB-231 tratada con lunasina se observó disminución de ambas MMP-2/-9. En ambas líneas, la lunasina inhibió la fosforilación de FAK, evitando así la formación de complejo FAK-Src, esta vía es de importancia dado que es responsable de inhibir la invasión y migración en ambas células, además atenúa la fosforilación de Akt and ERK las cuales están relacionadas con la disminución de la secreción de la MMP. Esta regulación sucedió mediante la interacción del biopéptido lunasina con el receptor $\alpha\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$, el cual es una proteína transmembranal llamada integrinas. (Jiang *et al.* 2016).

El melanoma es uno de los tipos de cáncer más agresivos, representa aproximadamente el 80% de todas las muertes relacionadas con el cáncer de piel, y la metástasis de melanoma maligno se puede encontrar con frecuencia en el cerebro, los ganglios linfáticos, el tracto gastrointestinal, el hígado y, con mayor frecuencia, los pulmones. El melanoma alberga una población celular conocida como células iniciadoras de cáncer (CIC) la cuales tienen como función favorecer el crecimiento de las células tumorales, esta naturaleza heterogénea melanoma maligno además le confiere resistencia a tratamientos como quimioterapia y la radiación. (Shidal 2016; Shidal *et al.* 2017).

Debido al desarrollo de mecanismos tumorales de resistencia a los tratamientos convencionales una opción es la evaluación de nuevas moléculas, sintéticas o naturales, uno de esas moléculas es el biopéptido lunasina, para el cual se ha descrito actividad biológica diversa, sin embargo una de las que más resalta es su actividad antitumoral, ya que inhibe la proliferación celular mediante mecanismos epigenéticos, además de inhibir factores que favorecen la migración y metástasis como la tirosina cinasa (Fak) en células de cáncer de mama. Por ello, se ha evaluado el efecto del biopéptido lunasina sobre melanoma maligno. Para ello, se usaron las células A 375, una línea tumoral de melanoma maligno de humano, se determinó mediante microscopia un aumento del receptor $\alpha V\beta 3$ transmembranal, el cual le permite a la lunasina interactuar con la célula, además se determinó que el tiempo de integración de la lunasina al núcleo de la célula es de un rango de 4 a 24 h y que esta interacción aumenta la población de células en fase G1. (Shidal 2016; Shidal *et al.* 2017).

También se ha estudiado la capacidad antimetastásica de la lunasina, para esto se usó el modelo tumoral B16-F10 en ratones, los cuales fueron tratados con el biopéptido lunasina, se observó que los tumores de ratones tratados con lunasina mostraban una reducción significativa en comparación con el grupo control, también se observó una menor activación en FAK y AKT. Y que este mecanismo es mediado por la interacción del dominio RGD con el receptor transmembranal $\alpha V\beta 3$ de la célula. Debido a su especificidad y su alta afinidad por la células tumorales, minimizando el daño a los demás tipos celulares es un posible candidato para terapia antitumoral (Shidal 2016; Shidal *et al.* 2017).

Se ha determinado que el biopéptido lunasina además de poseer una alta selectividad para reconocer su blanco por reconocimiento de marcadores, tiene el potencial de utilizarse como tratamiento alternativo en líneas celulares que son resistentes a los tratamientos convencionales, tal es el caso del cáncer de colon humano KM12L4. Se ha determinado que la actividad del biopéptido lunasina se correlacionó con la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$, deteniendo las células en el ciclo celular en la fase G2 y llevando a muerte por vía mitocondrial mediante la activación de caspasas iniciando por caspasa-9 que condujo a la activación de la caspasa-3 para una muerte extrínseca, permitiendo usar al biopéptido lunasina en casos donde se desarrolla resistencia a la quimioterapia. En la línea celular HT-29, se observó que las células tratadas con el biopéptido lunasina presentan un aumento del

77% en la actividad de la caspasa3 en comparación con las células no tratadas. En conclusión, la lunasina estimuló la apoptosis en HT-29 mediante la activación de las vías mitocondriales apoptóticas (Díaz de Mejía 2011 y 2010)

Además de la lunasina, la soya contiene el inhibidor de proteasas Bowman-Birk (BBI), ambos se encuentran de manera conjunta en el llamado inhibidor de proteasas Bowman-Birk (BBIC). Por lo que se realizaron estudios para medir su actividad biológica, primero se midió su bioactividad frente a compuesto carcinogénicos como 7,12 dimetil-benza-antraceno (DMBA) en la línea celular de fibroblastos de ratón NIH-3T3, y se observó que el péptido lunasina era más eficiente contra compuesto carcinogénicos, reduciendo la formación de células cancerosas en un 73% mientras que el BBI mostró un 60% de inhibición usando la misma concentración, 100nM. Posteriormente se mediría su actividad reductora de la incidencia del tumor y su generación, este estudio se realizó *in vivo* con ratones desnudos implantando subcutáneamente células de cáncer de mama MDA-MB-23, al transcurso de siete semanas se observó que el péptido lunasina logró disminuir en un 38% la incidencia tumoral al usar una dosis de 20 mg/kg, mientras que en los animales tratados con BBI se observó una menor incidencia, 57% usando una dosis de 20 mg/kg. Esto demuestra que el péptido lunasina posee la capacidad de actuar como quimioprotector frente a agentes carcinógenos y ayuda a disminuir la incidencia tumoral (Jeong *et al.* 2010).

Además interactuar con el receptor de integrinas $\alpha V\beta 3$, se ha determinado que el péptido lunasina interactúa con otro tipo de receptores de integrinas como $\alpha 5\beta 1$, la cual es expresada por la línea celular KM12L4, también ha sido demostrado que el péptido lunasina ya se encuentra presente en el citoplasma de la célula a las 24 horas y a las 72 h ya se ubica en el núcleo de la célula. La interacción de lunasina con las integrinas fue determinada mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación, y la ubicación mediante microscopía. Posteriormente, se se estudio el efecto de la lunasina sobre la vía FAK cinasa de adhesión focal, la cual es importante para la progresión tumoral, para esto se usó la línea celular KM12L4 y otras dos líneas celulares más de cáncer de colon, RKO y HCT-116, y se encontró que *in vitro* la lunasina inhibe FAK en un 28%, 39% y 60%, en las líneas RKO, HCT-116 y KM12L4, respectivamente a la concentración de 10 μ M.

En la línea celular RKO la lunasina a una concentración de 10 μM inhibió la migración celular en un 33% en comparación al control, sin embargo este efecto fue menor al de la doxiciclina 5 μM . (Dia de Mejia, 2011).

Posterior a los resultados obtenidos se determinó el efecto combinado de la lunasina con oxaliplatino, sobre líneas de cáncer de colon. El oxaliplatino es un fármaco a base de platino, el cual se usa para tratamiento contra la metástasis provocada por el cáncer de colon, este fármaco es considerado como tratamiento para inhibir la metástasis en hígado, provocado por el cáncer colon, sin embargo este debe presentar en combinación a otro, dado a que por si solo su efecto es mínimo. Se midió la actividad antimetastásica de la lunasina y el oxaliplatino en un modelo *in vivo* de cáncer colorectal con metástasis hepática con la línea celular KM12L4, para el tratamiento se administró la lunasina (diariamente 4 mg/kg por peso diario) y del oxaliplatino (5 mg/kg por peso y 2 veces por semana) por 28 días, la combinación de ambos tratamientos. El péptido lunasina mostró efecto reductor, sin embargo, se obtuvo mejor resultado solo con oxaliplatino, pero el uso combinado de ambos tratamientos mostró tener un mayor efecto. Además, en cortes histológicos del tejido de tumor en hígado se observó una disminución de PCNA, lo que indica un aumento en la muerte de las células que forman la masa tumoral, de 32% con lunasina, 60% con oxaliplatino y 86% en el tratamiento combinado de lunasina con oxaliplatino, (Dia de Mejia, 2011).

Además, se demostró que la lunasina potencia el efecto del oxaliplatino ya que su efectividad es mayor en el tratamiento combinado que el tratamiento individual con el oxaliplatino y la lunasina por separado, dicho efecto se alcanza mediante la reducción de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y el aumento de la expresión de la proteína apoptótica Bax (Dia de Mejia, 2011).

Mecanismo de acción de la lunasina

La evidencia disponible en cuanto a los mecanismos moleculares que previenen el cáncer por la lunasina apunta a una regulación epigenética a través de la inhibición de la acetilación de histonas. Las histonas son proteínas que conforman parte importante en el material genético conocido como ADN, están formadas principalmente por los aminoácidos arginina y lisina,

los cual pueden sufrir modificaciones post-traduccionales como acetilación, metilación, fosforilación, desacetilación y otros. De estas modificaciones, se ha visto que el proceso de acetilación es de gran importancia en enfermedades como el cáncer. Esta modificación es controlada por procesos de desacetilación, los cuales son clave en la regulación de este mecanismo epigenético (Minucci & Pelicci, 2006).

Se ha visto que los procesos de acetilación y desacetilación pueden ser controlados por la lunasina, lo cual sugiere un uso potencial de la misma para tratar enfermedades a nivel genético como el cáncer de mama. En un estudio *in vitro* la línea celular MDA-MB-231 fue tratada con lunasina a una concentración de 75 mM, y se observó una inhibición de un 17 a 19 % en la acetilación de la Histona 4 (H4) en las posiciones H4-Lys 8 y H4-Lys 12, mientras que en la Histona 3 (H3) se observó una inhibición del 30.2 % en la posición de Lys-9, 14. Este efecto inhibitor de las lunasina sobre residuos específicos de lisina de las histonas es muy prometedor en la búsqueda de nuevas terapias contra el cáncer de mama (Hernández-Ledesma, Hsieh, & De Lumen 2011).

Región RGD de la lunasina

El tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD) es una secuencia de suma importancia en el péptido lunasina el cual se describió su secuencia en residuos de la proteína fibronectina el cual tiene una función de mediar la unión celular. El motivo RGD no solo es exclusivo de esta proteína si no que este residuo puede presentarse en muchas otras proteínas y su función puede varia dependiendo de las proteína. Este motivo RGD reconoce receptores específicos de superficie de membrana llamados integrinas, el tripéptido y compuestos similares al RGD, además de proporcionar información sobre los mecanismos fundamentales de la adhesión celular, son agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento de enfermedades como la trombosis y el cáncer.

Otras actividades del péptido lunasina

Se ha visto que el péptido lunasina tiene actividad anti-oxidativa. Esta actividad se observó en un ensayo *in vitro* basado en la actividad inhibidora de la oxidación del ácido linoleico en el cual se mide el nivel de peróxido durante la etapa inicial de oxidación de lípidos, durante

la oxidación del ácido linoleico, se forman peróxidos y se oxida Fe^{2+} a Fe^{3+} , este cambio tiene una absorbancia máxima 500 nm. De acuerdo a este ensayo, la lunasina inhibe la oxidación del ácido linoleico y actúa como un carroñero de radicales libres (Hernandez-Ledesma *et al.* 2009).

También se ha determinado que el biopéptido lunasina posee una actividad quimioprotectora contra sustancias carcinógenas como el 3-metilcolantreno (MCA), esta actividad se estudió *in vitro* en la línea celular de fibroblastos de ratón NIH-3T3, donde se observó que el rango de concentración con mayor eficacia del péptido era entre 500 y 1000 nM, la citotoxicidad observada en las células tratadas con el 3-MCA fueron de un 40 y 72%, respectivamente, adicionalmente el péptido mostró capacidad inhibitoria de la acetilación de la Histona 3 en un 77 % y de la Histona 4 un 70 %, a una concentración de 1000 nM, este mecanismo podría usarse como quimio preventivo a nivel epigenético previniendo la transformación de células normales a cancerígenas (Maldonado-Cervantes *et al.* 2010).

En otros ensayos con la lunasina, se determinó su efecto coadyuvante con otros compuestos con la misma actividad, tal fue el caso con el ácido anacárdico el cual está presente en la cáscara de la nuez de la india (*Anacardium occidentale*) y presenta actividad biológica similar a la lunasina como: anti-inflamatoria, anti-oxidativa y anticáncer, esta última mediada por un mecanismo epigenético, el cual inhibe la enzima acetiltransferasa de histona (HATs) evitando continuar replicación y haciendo un arresto mitótico. El tratamiento combinado de ácido anacárdico 75 μ M y lunasina a 10 μ M demostró tener un efecto mayor en la inhibición del crecimiento en línea celular MDA-MB-23, mientras que los tratamientos por separado mostraron tener el mismo efecto, además de esto se determinó que la combinación de ambos mostró una fragmentación del núcleo. Además se observó que el ácido anacárdico frenó la población celular en la fase G-1 disminuyendo la población de la fase S, para posteriormente inducir a la célula a apoptosis. Además, se observó que la combinación de ambos tratamientos inducía una regulación hacia abajo de cinasas y ciclinas dependientes de las cinasas CCNE1, CDK2 y CDK4, las cuales son de importancia debido a que promueven las transiciones del ciclo celular de la fase G-1 a la fase S. Y por último el tratamiento solo

con ácido anacárdico incrementó la expresión de caspasa-8 (CASP8), BCL2 y BAX indicadores apoptóticos (Hsieh *et al.* 2011).

Cambio de isotipos de inmunoglobulinas

Las células B se caracterizan por la secreción de glicoproteínas llamadas inmunoglobulinas las cuales cumplen un papel muy importante en la respuesta inmunológica, estas inmunoglobulinas pueden presentarse en la superficie de las células B como inmunoglobulinas de superficie que sirven como receptores de antígenos (BCR), o ser secretadas en el espacio extracelular donde su principal función es la unión de los antígenos para llevar a cabo su neutralización y eliminación del patógeno el cual puede ser mediado por una opsonización o la activación del complemento. Para llevar a cabo la secreción de estas inmunoglobulinas es necesario la activación de las células B, la cual puede ser mediada por dos vías, una dependiente de células T (inmunidad adaptativa), en esta vía la célula B es incapaz de llevar su activación con la ayuda de células T cooperadores para su activación la cual es mediada por los receptores tipo BCR o la vía dependiente de células T la cual puede ser mediada por la presencia de algunos antígenos como lipopolisacárido (inmunidad innata) la cual es mediada por los receptores tipo Toll, ambas formas de activación de las células B dan como resultado la diferenciación de las células B en células plasmáticas, las cuales son las encargadas de la producción de inmunoglobulinas y las células B de memoria las cuales facilitarán la eliminación del patógeno si se vuelve a presentar, esta activación para producción de inmunoglobulinas se comienza a presentar después de 24 h de la exposición con el antígeno. En la Figura 2 se muestra la vía de activación de las células B por BCR o receptores tipo Toll. (Jeong *et al.* 2010).

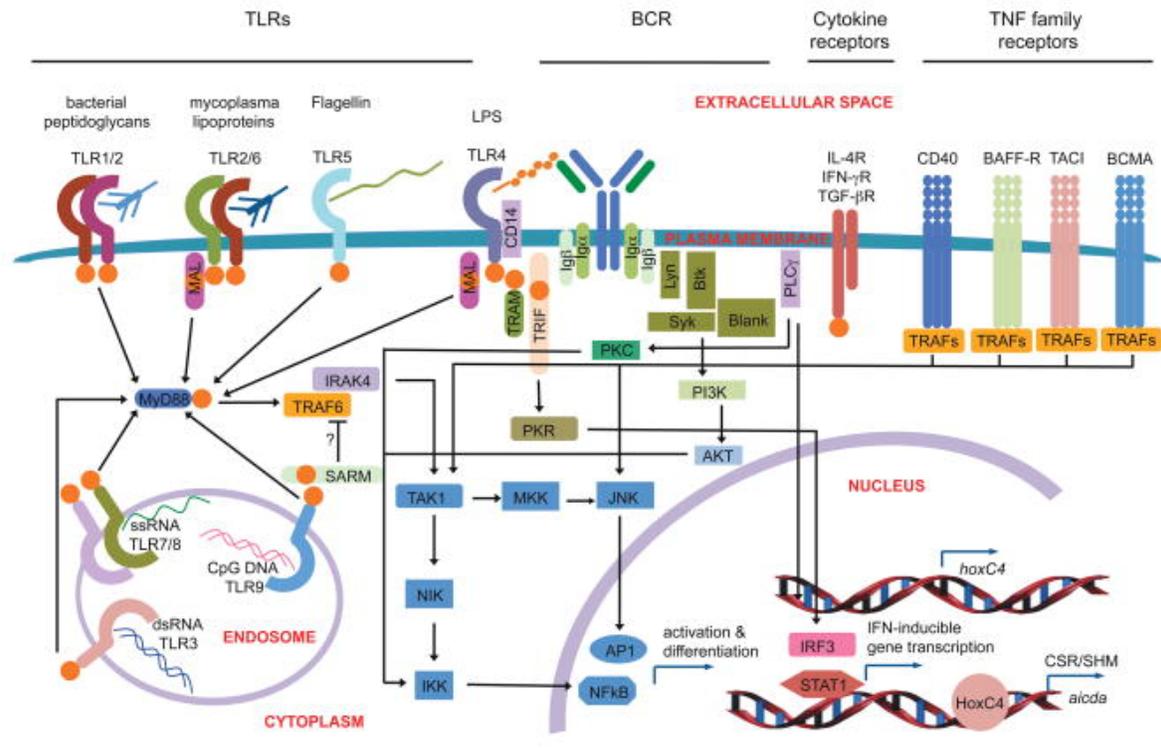


Figura 2. Vías de activación de las células B mediada por la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. (Jeong *et al.*, 2010).

La alta especificidad y afinidad de las inmunoglobulinas por reconocer a un patógeno en específico es debido a su amplio repertorio isotipos que presenta, este repertorio tiene como requisito previo la activación de la célula B, lo que requiere un estímulo antigénico, lo que desencadenará el proceso de reordenamiento genético para el cambio de isotipos de inmunoglobulina, los cambios son primero: recombinación de conmutación de clase (CSR), en donde hay un reordenamiento de los genes presentes de las células B para la formación de las cadenas de las inmunoglobulinas VDJ (cadenas pesadas) y VJ (cadenas ligeras) y después una hipermutación somática (SHM) en donde se introducen mutaciones puntuales y dilecciones para la obtención de una inmunoglobulina específica para el estímulo recibido, además se ha determinado que la enzima citidina desaminasas AID es requerida en los procesos de hipermutación somática (SHM) como para la recombinación de cambio de clase (CSR), en el cual se ha visto que regula la expresión de los diferentes isotipos de

inmunoglobulinas. En la Figura 3 se presenta el reordenamiento molecular de anticuerpos para el cambio de isotipo (Jeong *et al.*, 2010).

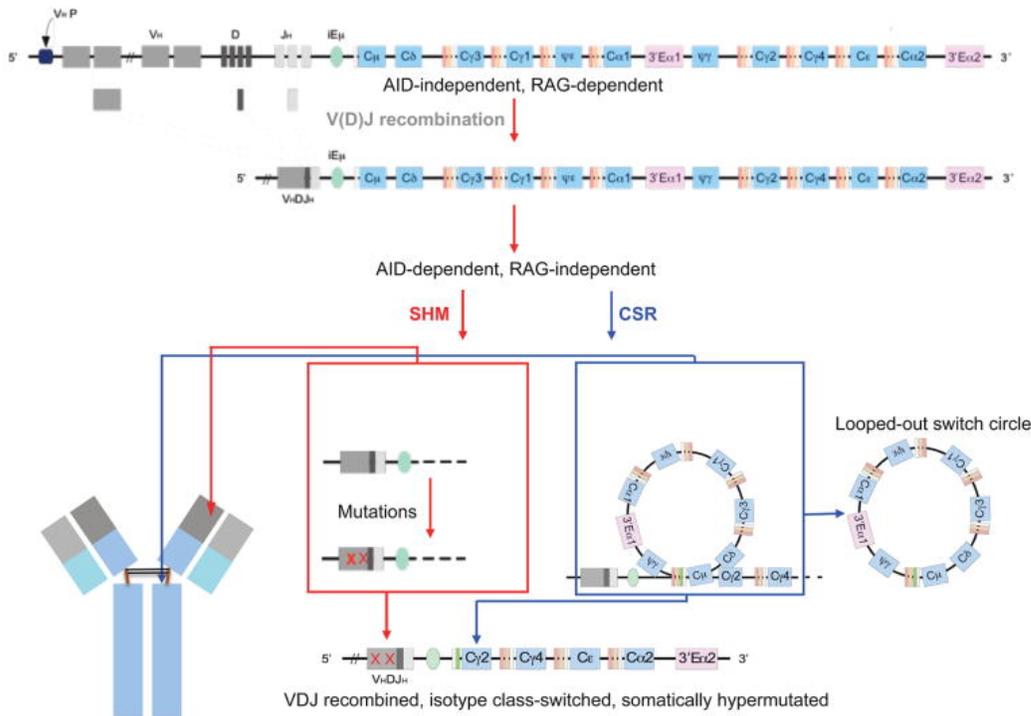


Figura 3. Mecanismo molecular del cambio de isotipo de inmunoglobulina mediado por recombinación de conmutación de clase (CSR) y hipermutación somática (SHM) (Jeong *et al.*, 2010).

Estudios preliminares en el laboratorio

Previamente, en este laboratorio se estudió la actividad inmunomoduladora del péptido lunasina sobre linfocitos de timo, ganglios y bazo, provenientes de ratones sanos de la cepa BALB/c y de ratones en dos condiciones patológicas, portadores del linfoma murino L5178 Y-R, e infectados con *Helicobacter pylori*. Se estudiaron también secreción de citocinas y determinación de isotipos de inmunoglobulinas por linfocitos de bazo activados con LPS. También se determinó la actividad citotóxica de la lunasina sobre células del linfoma L5178Y-R, en sus formas ascítica, sólida (subcutánea) e *in vitro*. Encontramos que la lunasina por si sola no estimula la respuesta proliferativa de linfocitos sanos, sin embargo, actúa de forma sinérgica con el mitógeno concanavalina A, amplificando la respuesta

proliferativa de linfocitos de animales sanos y linfocitos provenientes de animales en condiciones de infección. No se observó actividad anti-inflamatoria de la lunasina a la concentración probada sobre linfocitos de bazo activados con LPS, a diferencia de lo reportado para macrófagos. Sin embargo, si se detectaron isotipos de inmunoglobulinas propios de una respuesta ante un antígeno bacteriano en linfocitos de bazo pre-tratados con lunasina y posteriormente activados con LPS (Pérez-Limón 2018). En este trabajo esperamos confirmar las observaciones hechas previamente.

3. JUSTIFICACIÓN

El descubrimiento de compuestos inmunomoduladores es de gran interés, el biopéptido lunasina posee ya valor biotecnológico y comercial, ampliar lo que se conoce sobre su potencial de modulación biológica incrementaría este valor, además de su interés como potencial terapéutico y como herramienta en la investigación. El cambio de isotipo de inmunoglobulinas en linfocitos B es una función de interés cuya modulación con objetivos terapéuticos no ha sido tan estudiada como las funciones de linfocitos T, pero que representa una opción terapéutica de interés.

4. HIPÓTESIS

El péptido lunasina modula el cambio de isotipo de inmunoglobulinas en células de bazo de ratón BALB/c.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar *in vitro* el potencial del péptido lunasina para modular el cambio de isotipo de inmunoglobulinas en células de bazo de ratón BALB/c.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar el efecto de la activación por lipopolisacárido sobre la viabilidad de células de bazo de ratón BALB/c.
- 2.- Evaluar el efecto del péptido lunasina sobre la viabilidad en células de bazo de ratón BALB/c vírgenes y activadas mediante lipopolisacárido
- 3.- Determinar el efecto del péptido lunasina sobre el cambio de isotipo de inmunoglobulinas secretadas por células de bazo en proliferación, vírgenes y activadas con LPS

6. MÉTODOS

6.1 Modelo animal

Se emplearon ratones machos de la cepa BALB/c, de 9 a 12 semanas de edad, proporcionados por el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.), los cuales se alojaron en jaulas microventiladas con acceso a agua y alimento ad libitum con un ciclo luz/oscuridad de 12 h (6AM-6PM), una temperatura ambiental controlada de 26°C y humedad relativa de 45 %. Todos los procedimientos de trabajo con los animales fueron evaluados y revisados por el Comité Interno de Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Departamento de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. El proyecto cuenta con la clave de registro CEIBA-2018-024.

6.2 Péptido lunasina

El péptido lunasina se adquirió de la compañía GenScript (Nanjing, China), sintetizado con una pureza mayor al 90%. Se almacenó a una temperatura de -20 °C hasta su uso.

6.3 Obtención de células de bazo de ratón

Las células de bazo se obtuvieron por la técnica de perfusión. Para ello, se sacrificaron por a los animales por dislocación. La perfusión del bazo se realizó con PBS estéril usando una jeringa estéril, este procedimiento se hizo entre 5 a 6 veces hasta eliminar la coloración roja del bazo para recuperar la mayor cantidad de células. Posteriormente se recuperaron las células en solución en un tubo estéril de 15 mL.

6.4 Obtención de células mononucleares de bazo de ratón

La obtención de células mononucleares de bazo, se obtuvieron mediante un gradiente de Ficoll. Para lo cual, las células en solución previamente obtenidas del bazo se colocaron en sobre el gradiente de Ficoll en tubos con 15 mL. Enseguida se llevó a centrifugar a 400 g durante 30 min y se puso en 0 el freno. Posteriormente se recuperó el anillo de las células mononucleares usando una micropipeta y se pasaron a un tubo 15 mL estéril, en la cual se resuspendió con PBS estéril y se tomó una alícuota para realizar el conteo celular usando el azul tripán y cámara de Neubauer para ajustar a una densidad necesaria para los ensayos.

6.5 Estandarización de reactivos

Lipopolisacárido (LPS)

Se determinó la concentración necesaria de LPS para inducir un aumento en la proliferación en células de bazo, para ello se trataron con 1, 25 y 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ por 24, 48 y 72 h. Posteriormente se determinó la proliferación por el ensayo de CFSE y la viabilidad por el ensayo de calceína AM.

Lunasina

Se determinó la concentración óptima del péptido lunasina para aumentar la viabilidad en células de bazo y/o disminuir la cantidad necesaria de LPS para aumentar la viabilidad de células de bazo, por lo que cultivos de células de bazo se trataron con lunasina a las concentraciones de 6.25, 12.5, 25 y 50 μM , en presencia o ausencia de LPS, posteriormente se determinó la proliferación por el ensayo de CFSE y la viabilidad por el ensayo de calceína AM.

6.6 Ensayo de viabilidad con calceína AM

Una vez que las células cumplieron con el tiempo de incubación con cada uno de los tratamientos, se recuperó el sobrenadante de cada pozo en forma individual en tubos de 0.6 μL que se centrifugaron a 1600 rpm por un lapso de 10 minutos para posteriormente recuperar el pellet celular, una vez que se decantó el sobrenadante, se resuspendió el pellet celular con 100 μl de calceína AM, incubando por un lapso de 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, después se lavaron en PBS 1X centrifugando a las condiciones ya mencionadas para eliminar el exceso del marcaje, por último se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con PBS 1x.

6.7 Determinación de isotipos de inmunoglobulinas en células de bazo de ratón.

Después de haber determinado las concentraciones óptimas de proliferación y tiempo con los diferentes concentraciones de LPS y el biopéptido lunasina en las células de bazo, posteriormente se realizó el tratamiento combinado y al pasar el tiempo óptimo se recuperaron los sobrenadantes para determinar los diferentes isotipos de inmunoglobulinas IgA, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG, IgM por medio de citometría de flujo usando el Kit Mouse Immunoglobulin Isotyping (BD Accuri C6; Becton- Dickinson Biosciences, Ann Arbor, MI, USA).

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la distribución de los datos obtenidos, una vez analizado los datos y tras ser ajustados a una distribución continua, se empleó la prueba *t* de Student para evaluar la significancia estadística de las diferencias entre las medias de cada grupo. Para el análisis se utilizó el software IBM SPSS Statistics for Windows, versión 20.0 (IBM Corp. in Armonk, NY).

7. RESULTADOS

7.1 Efecto del LPS sobre la viabilidad de cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratón BALB/c, obtenidos por el método de perfusión y analizados por el ensayo MTT

Para el ensayo de MTT se calculó el índice de viabilidad tomando como el 100% de viabilidad la absorbancia del control no tratado, a partir de esto se determinó que la viabilidad de los linfocitos de bazo aumenta dependiendo de la concentración y tiempo de exposición al LPS. A las 48 h se observa que aumenta el índice de viabilidad a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS, la cual es mayor en comparación con las demás concentraciones usadas, pero este aumento no es estadísticamente diferente ($p = 0.107$) cuando se compara con la viabilidad observada en el control y el resto de las concentraciones usadas. A las 72 h se observa que la concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ muestra un ligero aumento no significativo ($p = 0.012$) en el índice de viabilidad en comparación con el control y a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ este aumento es similar. A las 96 h el índice de viabilidad disminuye ligeramente en los cultivos tratados con la concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin embargo, en las otras concentraciones esta viabilidad no cambia, encontrando que no hay diferencia significativa entre el efecto de las concentraciones de LPS utilizadas ($p = 0.275$). Por último, a las 120 h, se observó que a la concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el índice de viabilidad es más alto en comparación con las demás concentraciones y con su respectivo control, sin embargo dicha diferencia no es significativa ($p = 0.191$).

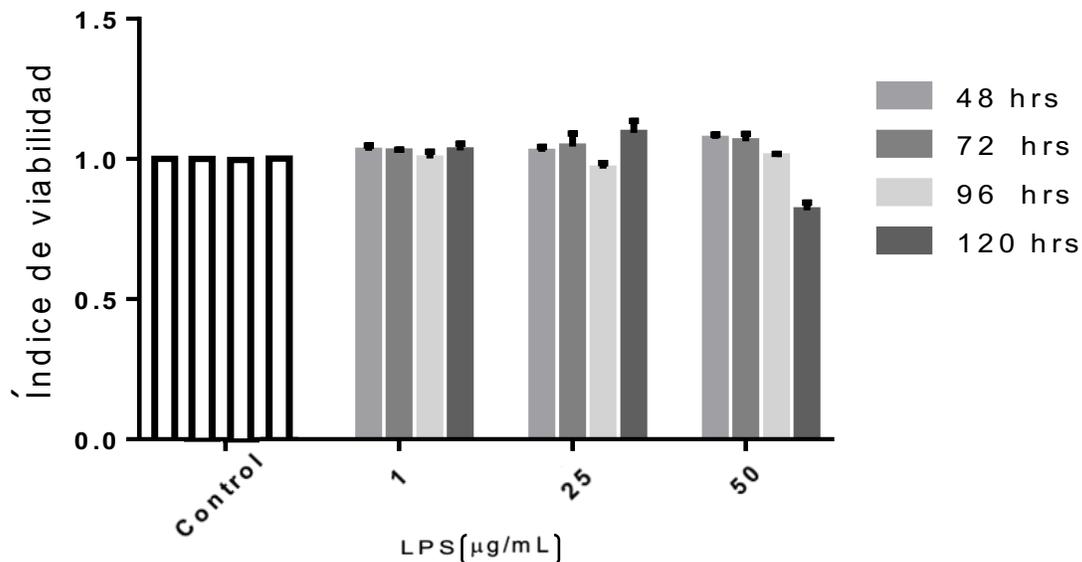


Figura 4. Efecto del LPS sobre el índice de viabilidad de linfocitos de bazo de ratón BALB/c determinado con el ensayo MTT. Se determinó la viabilidad de cultivos primarios de células mononucleares de bazo obtenidas por el método de maceración y tratadas con diferentes concentraciones de LPS (1, 25 y 50 µg/mL) durante 48, 72, 96 y 120 h. Los resultados representan la media± el error estándar de 3 repeticiones en 3 réplicas.

7.2 Efecto del LPS sobre la viabilidad de cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratón BALB/c, obtenidos por el método de maceración por el ensayo de calceína-AM

En los cultivos primarios de linfocitos de bazo obtenidos por el método de maceración, se observó que la viabilidad obtenida por este método es de aproximadamente de 30%, una importante pérdida de la viabilidad de los linfocitos de bazo, sin embargo, esta viabilidad aumenta al someter el cultivo primario de linfocitos de bazo a un estímulo como el LPS, tal como se muestra en la Figura 5. A las 48 h se observa que la concentración de 25 µg/mL de LPS aumenta significativamente ($p = 0.002$) la viabilidad celular en comparación a su control y en comparación con la demás concentraciones. Este aumento es significativo en comparación con la concentración de 1µg/mL ($p = 0.0059$) y no es significativo en comparación a la concentración de 50 µg/mL. A las 72 h se encontró un aumento altamente significativo ($p = 0.0001$) a las concentraciones de 25 y 50 µg/mL en comparación con su control y con la concentración de 1 µg/mL, pero no hay diferencia significativa entre estas

concentraciones. Y por último a las 96 h y 120 h se observa un efecto similar en ambas, la viabilidad aumenta significativamente en comparación con sus controles, pero no hay diferencia significativa entre las concentraciones usadas.

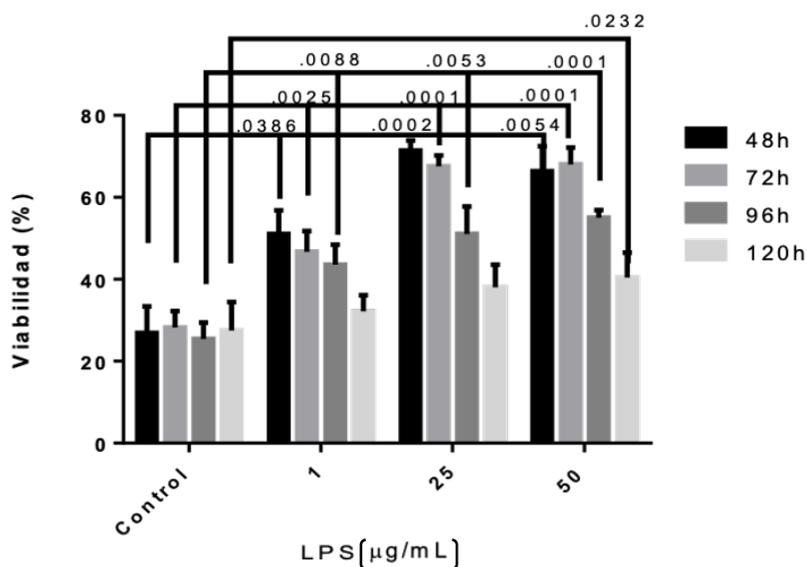


Figura 5. Efecto del LPS sobre el porcentaje de viabilidad de linfocitos de bazo de ratón BALB/c determinado con el método de calceína AM. Se determinó la viabilidad de cultivos primarios de células mononucleares de bazo obtenidas por el método de maceración y tratadas con diferentes concentraciones de LPS (1, 25 y 50 µg/mL) durante 48, 72, 96 y 120 h. Los resultados representan la media± el error estándar de 2 repeticiones en 2 réplicas.

7.3 Efecto del LPS sobre la viabilidad de cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratón BALB/c, obtenidos por el método de perfusión, por el ensayo de calceína-AM

Mediante el método de calceína-AM se encontraron variaciones en la viabilidad de linfocitos de bazo de forma dependiente del tiempo y la concentración de LPS usada. A las 48 h se encontró un aumento significativo en la viabilidad de linfocitos de bazo tratados con la concentración de 25 µg/mL de LPS en comparación al control y en comparación con la

concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS. Por su parte, al evaluar el efecto de la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS no se encontró diferencia significativa. A las 72 h se observó un patrón similar, una disminución en la viabilidad al comparar con el control, sin embargo, esta pérdida de viabilidad se recupera cuando las células son tratadas con LPS a las concentraciones de 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, este incremento es significativo cuando se compara contra el control.

Con respecto a los tratamientos con duración de 96 h y 120 h se presentó lo mencionado anteriormente, una pérdida en la viabilidad que se recupera cuando las células son tratadas con LPS a 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De acuerdo a lo cual, la concentración óptima para inducir aumento en la viabilidad es de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, efecto que se observa dentro las primeras 72 h, después de ese tiempo la viabilidad recae.

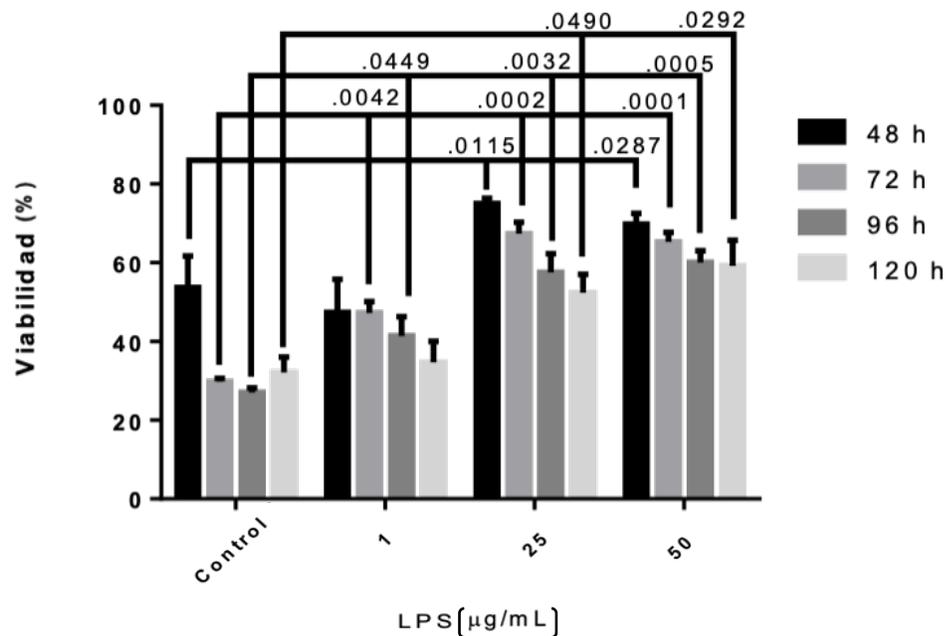


Figura 6. Efecto del LPS sobre la viabilidad linfocitos de bazo de ratón BALB/c obtenidos por el método de perfusión. Se evaluó la viabilidad de cultivos primarios de células mononucleares de bazo tratadas con diferentes concentraciones de LPS (1, 25 y 50 μM) durante 48, 72, 96 y 120 h, la cuantificación se realizó utilizando citometría de flujo con calceína-AM como marcador de viabilidad. Los valores corresponden a la mediana \pm error estándar de 2 repeticiones y 2 réplicas *in vitro*.

7.4 Efecto del péptido lunasina en la viabilidad de cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratón BALB/c.

Se observó que a partir de las concentraciones de 12.5, 25 y 50 μM la viabilidad celular fue marginalmente más alta, sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas. La viabilidad de las células tratadas con lunasina 25 μM fue significativamente mayor ($p= 0.0046$) con respecto a las células tratadas con LPS $\mu\text{g/mL}$.

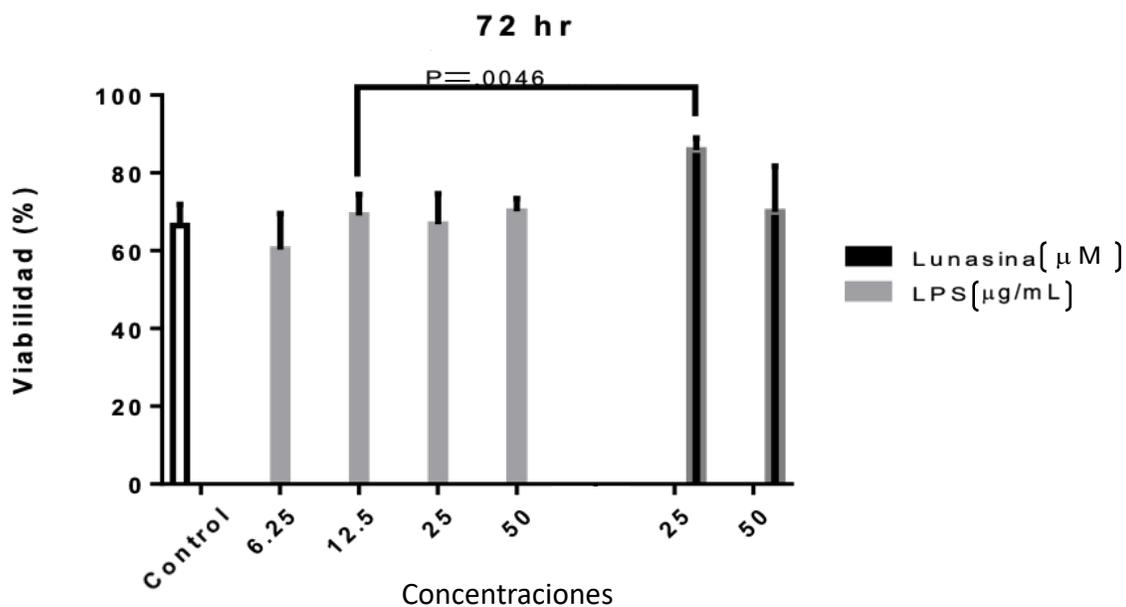


Figura 7. Curva dosis-respuesta de linfocitos de bazo de ratón de la cepa BALB/c tratados con péptido lunasina. Cuantificación del porcentaje de viabilidad de células monoculares de bazo tratados con diferentes concentraciones de lunasina (6.25, 12.5, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$) mediante citometría de flujo usando calceína-AM como marcador a las 72h de tratamiento. Se muestra la viabilidad de los linfocitos de bazo, tratados a diferentes concentraciones del péptido lunasina a las 72 h. Los datos corresponden a la mediana \pm error estándar.

7.5 Efecto del tratamiento del péptido lunasina en conjunto con LPS y en la viabilidad de cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratón BALB/c

Se observó que en la combinación de 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS con 6.25 y 12.5 μM del péptido lunasina, se observó una viabilidad menor con 87.48 % y un 83.86 % respectivamente para cada concentración del péptido lunasina y en la combinación de LPS a 1 $\mu\text{g/mL}$ con 25 y 50 μM del péptido lunasina se encontraron valores de 98.66 % y 97.75 %, muy semejantes al control y sin significancia.

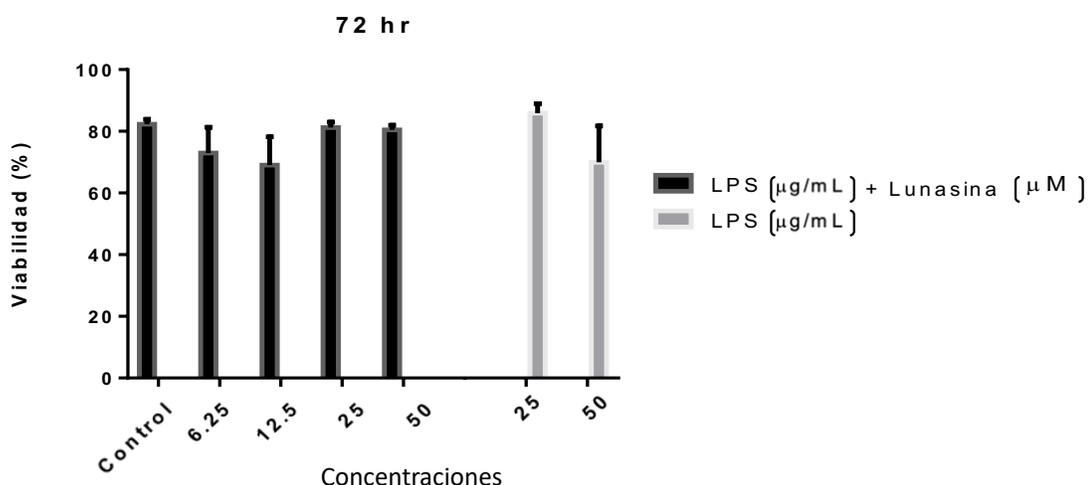


Figura 8. Curva dosis-respuesta de linfocitos de bazo de ratón de la cepa BALB/c tratados con péptido lunasina. Los resultados muestran la viabilidad de los linfocitos de bazo, tratado con LPS a 1 $\mu\text{g/mL}$ en conjunto a diferentes concentraciones del péptido lunasina a las 72h, mediante citometría de flujo usando calceína-AM como marcador. Los datos corresponden a la mediana \pm error estándar.

7. 6 Efecto del biopéptido lunasina sobre cambio de isotipos de inmunoglobulina en sobrenadantes de cultivo primario de bazo

En la Tabla 1 se observa que los tratamientos de lunasina, LPS y la combinación de ambos muestran resultados indeterminados en su gran mayoría para el cambio de isotipo de inmunoglobulinas que presentan la cadena lambda.

En la Tabla 2 se observa que en cultivos de linfocitos de bazo activados con LPS se encuentran los isotipos IgM, IgG2b e IgG1. Por su parte, en los sobrenadantes de linfocitos de bazo vírgenes y activados con LPS y tratados con lunasina se encontraron similitudes y algunas diferencias, en estos perfiles se detectaron IgM, IgA, IgG2b, IgG2a e IgG1. La comparación con los isotipos generados por la activación con LPS sugiere que la lunasina dirige el cambio de isotipo hacia IgA e IgG2a. En el caso de la IgA encontrada en los cultivos de linfocitos activados y tratados con lunasina podría deducirse que la presencia se debe a la lunasina, y no es un efecto combinado, ya que en los cultivos de células de bazo activadas con LPS no se encontró este isotipo. En los sobrenadantes de los cultivos control sin tratamiento se encontraron los isotipos IgM, IgA e IgG1.

Tabla 1. Análisis cualitativo de isotipos de inmunoglobulinas de cadena Kappa (κ) en sobrenadantes de linfocitos de bazo de ratones de la cepa BALB/c.

B) Tratamientos	kappa κ						
	IgE	IgM	IgA	IgG3	IgG2b	IgG2a	IgG1
Control	-	+	+	-	-	-	+
Lunasina 6.25 μ M	-	+	-	-	-	-	+
Lunasina 12.5 μ M	-	+	+	-	+	+	+
Lunasina 25 μ M	-	+	+	-	+	+	+
Lunasina 50 μ M	-	+	-	-	-	-	+
Control LPS	-	+	-	-	-	+	-
Lunasina 6.25 μ M + LPS 1 μ g/mL	-	+	+	-	(+/-)	-	+
Lunasina 12.5 μ M + LPS 1 μ g/mL	-	+	+	-	+	+	+
Lunasina 25 μ M + LPS 1 μ g/mL	-	+	+	-	+	+	+
Lunasina 50 μ M + LPS 1 μ g/mL	-	+	+	-	+	+	+
LPS 25 μ g/mL	-	+	-	-	+	-	+
LPS 50 μ g/mL	-	+	-	-	+	(+/-)	+

*Los resultados se expresan como presente (+) ausente (-) e indeterminado (+/-) de los isotipos de inmunoglobulinas encontrados en cultivos de 72 h bajo diferentes tratamientos. Los resultados corresponden a 2 repeticiones y 2 réplicas *in vitro*.

8. Discusión

El estudio del cambio de isotipo de inmunoglobulinas se ha realizado principalmente en ensayos *in vitro*, en cultivos de linfocitos de bazo, o de células B purificadas. En cultivos *ex vivo* es posible inducir la activación *in vitro* de estas células con mitógenos que actúan sobre receptores de reconocimiento de patrones, como el LPS que activa la expresión de IgG3 (Kracker & Radbruch, 2004). Esta activación estimula la proliferación de estas células y prolonga su viabilidad, ambos eventos son requisito para que ocurra el fenómeno de recombinación genética que da origen a los varios isotipos de inmunoglobulinas, aún más, se ha demostrado que la aparición de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas está relacionada con el ciclo de división celular (Hodgkin et al., 1996), en el contexto de la exposición de las células B activadas a diferentes citocinas (Tangye et al., 2002), por ejemplo, se ha demostrado que el IFN-gamma tiene un papel importante en esta modulación (Deenik et al., 2005).

Dado que para el éxito de estos ensayos es importante la viabilidad celular, el método de aislamiento de los linfocitos B debe tomarse en cuenta. Para este estudio se utilizaron dos técnicas para la obtención de los linfocitos de bazo, ambas mecánicas; perfusión y otra maceración, esta última es recomendada en la literatura para la obtención de los linfocitos de bazo (Waymouth, 1974). Al comparar la viabilidad celular obtenida con ambas técnicas, se observó que los cultivos obtenidos por la técnica de maceración presentaron viabilidad menor a 30 por ciento, mientras que los cultivos obtenidos con la técnica de perfusión presentaron una mayor viabilidad, hasta un 60 por ciento, el doble que la viabilidad obtenida por el método de maceración. Aunque ambas técnicas son mencionadas en la literatura por su utilidad en la obtención de cultivo primario de células a partir de tejidos (Aronowitz et al., 2015), para la obtención de células de bazo la técnica usualmente empleada es la maceración, especialmente para la obtención de los linfocitos B mediante selección negativa, sin embargo esta técnica tiene una importante desventaja dado que afecta la viabilidad de la población celular, por la forma agresiva de aislar las células, algo que puede constatarse en los datos mostrados en este estudio. Por otro lado, la técnica de perfusión es menos agresiva que la

técnica de maceración y se puede obtener una mejor viabilidad, dado no se aplica ninguna fuerza mecánica para su obtención. Esta técnica además se puede complementar con el aislamiento mediante gradiente de densidad (Lu *et al.*, 2020)

Por su parte, para el análisis de viabilidad se utilizaron dos técnicas: el ensayo de MTT, un ensayo colorimétrico en el cual las células reducen una sal de tetrazolio a formazán, y el ensayo de calceína-AM, un compuesto hidrofóbico que tiene la facilidad de cruzar la membrana celular y llegar a citoplasma donde la actividad esterasa de la célula eliminará el grupo diéster del calceína, dando como resultado fluorescencia. Se encontraron diferencias en los resultados de viabilidad celular obtenidos mediante estos ensayos, y esto se debe a su principio, en el caso del ensayo de MTT se mide la actividad metabólica respiratoria celular lo cual es una medida indirecta, a partir de un valor de absorbancia se estima el número de células viables, debido a esto, los resultados obtenidos por el ensayo de MTT son relativos, no una medida de viabilidad absoluta, estos resultados pueden verse afectados por cambios en la actividad metabólica inducidos por el propio tratamiento a evaluar. Por su parte, el ensayo de calceína-AM permite determinar la viabilidad de cada célula a partir de la fluorescencia emitida después de haber eliminado el grupo éster de la calceína por actividad esterasa de la célula (Tenopoulou *et al.*, 2007; Stoddart, 2011), por lo que se obtienen valores de viabilidad más confiables en comparación con el ensayo de MTT

En cuanto al efecto del péptido lunasina sobre la viabilidad de los linfocitos de bazo, los resultados indican un efecto marginal sobre este indicador, carente de significancia al ser comparado con el control. Este resultado podría atribuirse a dos factores; que la concentración usada fue muy baja, o una menor expresión de los receptores con los que interactúa el péptido lunasina. Sin embargo, en el caso de la concentración usada, previamente se ha determinado que el tratamiento *in vitro* de células RAW 264.7 con concentraciones hasta 100 μM de lunasina, no induce un aumento significativo de viabilidad al ser comparado con su control (Hernandez-Ledesma *et al.*, 2009), resultado similar al obtenido en este trabajo.

Otro factor a considerar es la densidad de las integrinas en la matriz extracelular, ya que es mediante estos receptores que la lunasina interactúa con la célula a través de su región RGD y esta interacción es fundamental para la viabilidad celular (Bertoni, *et al.*, 2018), esto se ha visto en dos estudios previos; en las líneas celulares MDA-MB-231, MFC-7 y KM12L4 se determinó que la lunasina modula la viabilidad por la vía Fak, cuya activación es modulada por la interacción de las integrinas con la región RGD (Jiang *et al.*, 2016), mientras que en un modelo de estrés oxidativo en la línea celular RAW 264.7 se observó que la lunasina aumenta significativamente la viabilidad celular (Indiano-Romacho *et al.*, 2019). Otro de los factores a considerar es que de acuerdo a la literatura la activación de Fak está asociada a un aumento en la expresión de las integrinas en las células, lo cual permite una mayor interacción y mayor señal para modular la vía Fak, la cual puede inactivarse para disminuir la viabilidad celular en condiciones patológicas de cáncer, por el contrario, también puede activarse para aumentar la viabilidad bajo condición de estrés oxidativo, este mecanismo se puede sugerir de acuerdo a la literatura.

En cuanto al cambio de isotipo de inmunoglobulinas, se obtuvieron perfiles para tres condiciones; en respuesta a la activación con LPS, en presencia de lunasina, y en cultivos de linfocitos de bazo activados con LPS y tratados con lunasina. Los resultados confirman observaciones realizadas en un estudio previo (Pérez-Limón, 2018) si bien persisten limitaciones para la interpretación de los resultados debido al tipo de ensayo y las características de la generación de isotipos de anticuerpos, que discutiremos un poco más adelante. En cuanto a la técnica de detección de los isotipos, se utilizó un ensayo comercial para detección de inmunoglobulinas en sobrenadantes de cultivos, este análisis es cualitativo, no cuantitativo, solo detecta la presencia de diferentes isotipos en la muestra.

En todas las condiciones de cultivo se detectaron las inmunoglobulinas IgM, e IgG1, las cuales son secretadas normalmente y se encuentran habitualmente en circulación en el organismo, mientras que las inmunoglobulinas IgG2b e IgG2a que se encontraron en los sobrenadantes de células tratadas con LPS y en el tratamiento combinado con lunasina son secretadas para defender al organismo contra patógenos mediante el proceso de opsonización o fijación del complemento para la eliminación del patógeno. Por último, en sobrenadantes

de linfocitos de bazo tratados con lunasina se encontró el isotipo IgA, así como en los cultivos de linfocitos activados con LPS 1 µg/ml y tratados con lunasina en las 3 concentraciones evaluadas. El isotipo IgA está asociado a la inmunidad de mucosas y previamente ya habíamos observado este efecto (Pérez-Limón, 2018).

Se observó también similitud entre el perfil de isotipos presente en el tratamiento con lunasina y el perfil de isotipos obtenido en células tratadas con LPS, esto podría deberse a que la lunasina es capaz de inducir una respuesta de activación similar al LPS, induciendo la secreción de IFN-gamma y otras citocinas (Vazquez *et al.*, 2015), sin embargo en nuestro estudio dicha activación es menor a la inducida por el tratamiento con el LPS. Por otra parte, este isotipo podrían ser el resultado de modulación a nivel epigénético por la lunasina dado que esta inhibe la acetilación en las histonas 3 y 4 (Jeong *et al.*, 2007), se ha visto que la acetilación de la histona 3 potencia el cambio de isotipo IgA (Kaminski & Stavnezer, 2006)

9. Conclusión

En conjunto, los resultados indican que el péptido lunasina no tiene efecto sobre la viabilidad de linfocitos de bazo de ratón BALB/c vírgenes o activados con LPS, pero si modula el cambio de isotipo de inmunoglobulinas secretadas por los linfocitos de bazo hacia el isotipo IgA cuando han sido activados con LPS.



No. Registro
CEIBA-2018-024

Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal

Dr. Moisés Armides Franco Molina
Presidente

Dr. Diana Caballero Hernández
Secretario

Vocales

M.C. MVZ. Daniel Julio Eguiarte Lara

Dr. Gabino Adrián Rodríguez Almaraz

Dr. Roberto Mercado Hernández

Miembros Externos

Dr. José González Salinas

Lic. Cinthya Galván Pinelo
(Campaña de adopción y socorro animal A.C.)

Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas, (CEIBA) de la UANL

Para: Dra. Diana Elia Caballero Hernández

Fecha de aprobación: 14 de junio de 2019

Título: Estudio del Efecto inmunomodulador del biopéptido lunasina: respuesta humoral y celular

El presente es referencia para el protocolo de investigación mencionado en la parte superior.

En la deliberación de este comité, los procedimientos de dicha aplicación conformada por las reglas y el reglamento interno con los temas de uso animal. La aprobación se otorga durante un año.

Sin más por el momento, le reitero la seguridad de mi más atenta y distinguida consideración.

San Nicolás de los Garza, Nuevo León, a 15 de junio de 2019

Dr. Moisés Armides Franco Molina
Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas (CEIBA)

LITERATURA CITADA

- Arakawa H, Hauschild J, Buerstedde JM. Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science*. 2002 Feb 15;295(5558):1301-6.
- Aronowitz, J. A., Lockhart, R. A., & Hakakian, C. S. (2015). Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *SpringerPlus*, 4, 713. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1509-2>
- Bhandari D, Rafiq S, Gat Y, Gat P, Waghmare R, Kumar V. 2020. A review on bioactive peptides: Physiological functions, bioavailability and safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 26(1):139-50.
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S33-S40.
- Cam, A., & de Mejia, E. G. (2012). RGD-peptide lunasin inhibits Akt-mediated NF- κ B activation in human macrophages through interaction with the α V β 3 integrin. *Molecular nutrition & food research*, 56(10), 1569-1581.
- Ceccacci E & Minucci S. (2016). Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: lessons from leukaemia. *British Journal of Cancer*, 114(6), 605-611.
- Chang HC, Lewis D, Tung CY, Han L, Henriquez SM, Voiles L, Lupov IP, Pelloso D, Sinn AL, Pollok KE, de Lumen BO, Li F, Blum JS, Srivastava S, Robertson MJ. (2014). Soy peptide lunasin in cytokine immunotherapy for lymphoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(3), 283–295.
- Chaplin D. D. (2010). Overview of the immune response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S3–S23. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980
- Daliri, E. B. M., Lee, B. H., & Oh, D. H. (2018). Current trends and perspectives of bioactive peptides. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(13), 2273-2284.
- Daliri, E. B., Oh, D. H., & Lee, B. H. (2017). Bioactive Peptides. *Foods (Basel, Switzerland)*, 6(5), 32. doi:10.3390/foods6050032
- Dia, V. P., & de Mejia, E. G. (2010). Lunasin promotes apoptosis in human colon cancer cells by mitochondrial pathway activation and induction of nuclear clusterin expression. *Cancer letters*, 295(1), 44-53

- Dia, V. P., & de Mejia, E. G. (2011). Lunasin potentiates the effect of oxaliplatin preventing outgrowth of colon cancer metastasis, binds to $\alpha 5\beta 1$ integrin and suppresses FAK/ERK/NF- κ B signaling. *Cancer letters*, 313(2), 167-180.
- Espinosa-Ramos, D., Caballero-Hernández, D., Gomez-Flores, R., Trejo-Chávez, A., Pérez-Limón, L. J., de la Garza-Ramos, M. A., ... & Rodriguez-Padilla, C. (2019). Immunization with a Synthetic *Helicobacter pylori* Peptide Induces Secretory IgA Antibodies and Protects Mice against Infection. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2019.
- Galbas M, Porzucek F, Woźniak A, Słomski R, & Selwet M. (2013). Isolation of low-molecular albumins of 2S fraction from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Acta Biochimica Polonica*, 60(1), 107-110.
- Gessner, A., Blum, H. y Röllinghoff, M. (1993). Regulación diferencial de la expresión de IL-9 después de la infección con *Leishmania major* en ratones susceptibles y resistentes. *Inmunobiología* , 189 (5), 419-435.
- Hernández-Ledesma B, & Ben O. (2008). Lunasin: a novel cancer preventive seed peptide. *Perspectives in medicinal chemistry*, 2, 75.
- Hernández-Ledesma, B., Hsieh, C. C., & Ben, O. (2009). Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 390(3), 803-808.
- Hernández-Ledesma B, Hsieh CC & de Lumen BO. (2011). Relationship between lunasin's sequence and its inhibitory activity of histones H3 and H4 acetylation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(7), 989-998.
- Hodgkin PD, Lee JH, Lyons AB. B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number. *Journal of Experimental Medicine*. 1996 Jul 1;184(1):277-81.
- Indiano-Romacho, P., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., & Hernández-Ledesma, B. (2019). Multifunctionality of lunasin and peptides released during its simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 125, 108513.
- Jeong HJ, Jeong JB, Kim DS, de Lumen BO. Inhibition of core histone acetylation by the cancer preventive peptide lunasin. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007 Feb 7;55(3):632-7.

- Jia S, Zhang S, Yuan H, & Chen N. (2015). Lunasin inhibits cell proliferation via apoptosis and reduces the production of proinflammatory cytokines in cultured rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *BioMed Research International*, 2015.
- Jiang, Q., Pan, Y., Cheng, Y., Li, H., Liu, D., & Li, H. (2016). Lunasin suppresses the migration and invasion of breast cancer cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2/-9 via the FAK/Akt/ERK and NF- κ B signaling pathways. *Oncology reports*, 36(1), 253-262.
- Kaminski DA, Stavnezer J. Stimuli that enhance IgA class switching increase histone 3 acetylation at S α , but poorly stimulate sequential switching from IgG2b. *European Journal of Immunology*. 2007 Jan;37(1):240-51.
- Kindt, TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Inmunología de Kuby*. Sexta Edición, 2007. Editorial MacGraw-Hill
- Kracker S, Radbruch A. Immunoglobulin Class Switching. *InB Cell Protocols 2004* (pp. 149-159). Humana Press.
- Lu Y, Fu C, Xia C, Ma S. A method for separation and purification of mouse splenocytes by density gradient centrifugation. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2020 Sep 25:1-7.
- Maldonado-Cervantes E, Jeong, H J, León-Galván F, Barrera-Pacheco A, De León-Rodríguez A, de Mejia EG & de la Rosa APB. (2010). Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells. *Peptides*, 31(9), 1635-1642.
- Mao, R., Wu, L., Zhu, N., Liu, X., Liu, R., & Li, Y. (2019). Naked Oat (*Avena nuda* L.) Oligopeptides: Immunomodulatory Effects on Innate and Adaptive Immunity in Mice via Cytokine Secretion, Antibody Production, and Th Cells Stimulation. *Nutrients*, 11(4), 927.
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 14(Suppl 2), 49. doi:10.1186/s13223-018-0278-1
- Nedumpun, T., Techakriengkrai, N., Thanawongnuwech, R., & Suradhat, S. (2019). Negative immunomodulatory effects of type 2 porcine reproductive and respiratory

- syndrome virus (PRRSV)-induced interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) on porcine innate and adaptive immune functions. *Frontiers in Immunology*, 10, 579.
- Nicholson L. B. (2016). The immune system. *Essays in biochemistry*, 60(3), 275–301. doi:10.1042/EBC20160017
- Pérez-Limón LJ, 2018. Actividad inmunomoduladora del péptido lunasina en modelos murinos de infección y cáncer. Tesis de licenciatura. San Nicolás de los Garza. Universidad Autónoma de Nuevo León
- Rutherford-Markwick, K. J. (2012). Food proteins as a source of bioactive peptides with diverse functions. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S149-S157.
- Saadi, Sami, Nazamid Saari, Farooq Anwar, Azizah Abdul Hamid, and Hasanah Mohd Ghazali. "Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications." *Biotechnology Advances* 33, no. 1 (2015): 80-116.
- Shidal, C., Al-Rayyan, N., Yaddanapudi, K., & Davis, K. R. (2016). Lunasin is a novel therapeutic agent for targeting melanoma cancer stem cells. *Oncotarget*, 7(51), 84128–84141. doi:10.18632/oncotarget.11554
- Shidal, C., Inaba, J. I., Yaddanapudi, K., & Davis, K. R. (2017). The soy-derived peptide Lunasin inhibits invasive potential of melanoma initiating cells. *Oncotarget*, 8(15), 25525.
- Swanson CA, Mao BL, Li JY, Lubin JH, Yao SX, Wang JZ, Cai SK, Hou Y, Luo QS & Blot WJ. (1992). Dietary determinants of lung-cancer risk - results from a case-control study in Yunnan province, China. *International Journal of Cancer*, 50(6), 876-880.
- Tangye SG, Ferguson A, Avery DT, Ma CS, Hodgkin PD. Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. *The Journal of Immunology*. 2002 Oct 15;169(8):4298-306.
- Tung CY, Lewis DE, Han L, Jaja M, Yao S, Li F, Chang HC. (2014). Activation of dendritic cell function by soy peptide lunasin as a novel vaccine adjuvant. *Vaccine*, 32(42), 5411–5419.
- Tung, C. Y., Lewis, D. E., Han, L., Jaja, M., Yao, S., Li, F., & Chang, H. C. (2014). Activation of dendritic cell function by soy peptide lunasin as a novel vaccine adjuvant. *Vaccine*, 32(42), 5411-5419.

- Vazquez MI, Catalan-Dibene J, Zlotnik A. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine*. 2015 Aug 1;74(2):318-26.
- Wang H & Murphy P. (1994). Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(8), 1666-1673.
- Yang, X., Zhu, J., Tung, C. Y., Gardiner, G., Wang, Q., Chang, H. C., & Zhou, B. (2015). Lunasin alleviates allergic airway inflammation while increases antigen-specific Tregs. *PloS One*, 10(2).

RESUMEN BIOGRÁFICO

Luis Jerónimo Pérez Limón

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: ACTIVIDAD MODULADORA *IN VITRO* DEL PÉPTIDO LUNASINA EN
CÉLULAS DE BAZO DEL RATÓN BALB/C

Campo de Estudio: Inmunología

Datos Personales: Nacido en Torreón, Coahuila el 5 de enero
1993, hijo de Jerónimo Pérez Gutiérrez y Esther Limón Reboloso

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido
Químico Bacteriólogo Parasitólogo