



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA
CIBA-IPN, TLAXCALA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y
CONSTRUCCIÓN DE UNA INMUNOTOXINA (IT) DE CURCINA
OBTENIDA DE SEMILLAS DE *Jatropha curcas* L.**

T E S I S

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta

M.C. Lidia Patricia Jaramillo Quintero

Bajo la dirección de las doctoras:

ALMA LETICIA MARTÍNEZ AYALA (CIBA)

CYNTHIA ORDAZ PICHARDO (ENMH)

Tlaxcala, Enero 2015



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala siendo las 12:00 horas del día 5 del mes de Diciembre del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-Tlaxcala para examinar la tesis titulada:

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y CONSTRUCCIÓN DE UNA INMUNOTOXINA (IT) DE CURCINA OBTENIDA DE SEMILLAS DE *Jatropha curcas* L.

Presentada por el alumno:

JARAMILLO
Apellido paterno

QUINTERO
Apellido materno

LIDIA PATRICIA
Nombre(s)

Con registro:

B	1	0	1	1	3	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de: DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Alma Leticia Martinez Ayala

Dra. Cynthia Ordaz Pichardo

Dra. Martha B. Bibbins Martinez

Dra. Ma. Del Carmen Cruz López

Dr. Andrés Romero Rojas

Dra. Carmen M. Gurrola Diaz

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. David Guillermo Pérez Barwain





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala el día 07 del mes Enero del año 2015, la que suscribe Lidia Patricia Jaramillo Quintero alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro B101139, adscrito al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Alma Leticia Martínez Ayala y cede los derechos del trabajo intitulado "Evaluación de la actividad citotóxica y construcción de una inmunotoxina (IT) de curcina obtenida de semillas de *Jatropha curcas* L., al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección pjaramillo4@hotmail.com o alayala@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Lidia Patricia Jaramillo Quintero
Nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado.

Al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo otorgado a través de proyectos SIP.

Al personal académico, técnico y administrativo del CIBA-IPN por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A mis directores de tesis y a los miembros del comité de revisión por sus contribuciones para el desarrollo y mejora de esta investigación.

A la Dra. Alma Leticia Martínez Ayala, por las enseñanzas y el apoyo brindado para llevar a buen fin este proyecto. Por su amistad y gran calidad humana.

A la Dra. Martha D. Bibbins, por todo lo que me aportó durante mi estancia en el CIBA-Tlaxcala. Por su calidez y don de gente.

A los compañeros y doctores de todas las instituciones que me permitieron desarrollar este proyecto. Que al final se convirtieron en amigos para toda mi vida.

A Héctor, mi compañero de sueños, proyectos, y vida.....

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	
1. La especie <i>Jatropha curcas</i> L.....	3
1.1 Curcina.....	6
1.1.1 La curcina como proteína inactivadora de ribosomas (RIP)	7
1.1.1.1 Clasificación de las RIPs	10
1.1.1.2 Rutas de introducción de las RIPs en células de mamíferos.....	11
1.1.1.3 Citotoxicidad de las RIPs en células de mamíferos.....	13
1.1.2 Antecedentes de las funciones biológicas de curcina.....	15
2. Inmunotoxinas (ITs).....	20
2.1 Construcción química de las inmunotoxinas.....	26
2.1.1 Construcción de inmunotoxinas vía aminación reductiva.....	29
2.2 Ejemplos de inmunotoxinas obtenidas por conjugación química.....	31
3. Cáncer de mama.....	32
3.1 El receptor Her2.....	35
3.2 Inmunotoxinas contra el receptor Her2.....	38

II. JUSTIFICACIÓN.....	44
III. HIPÓTESIS.....	46
IV. OBJETIVOS.....	47
V. METODOLOGÍA	
ETAPA I: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CURCINA	
1. Material biológico	
1.1 Obtención de harina de semillas de <i>J. curcas</i> L.....	49
1.2 Anticuerpo monoclonal anti-Her2 (ErbB2/Her2).....	50
2. Obtención de extracto protéico.....	50
3. Purificación de curcina.....	51
3.1 Caracterización fisicoquímica e identificación de curcina.....	52
3.2. Determinación de actividad N-glicosidasa de curcina	55
ETAPA II: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE CURCINA	
4. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto citotóxico de curcina y de la inmunotoxina curcina:anti-Her2	
4.1 Activación, propagación y mantenimiento de las líneas celulares.....	56
4.2 Pruebas de citotoxicidad mediante la técnica de MTT	57
4.3 Cálculo de la CI_{50}	58
ETAPA III: CONSTRUCCIÓN DE LA INMUNOTOXINA (curcina:anti-Her2) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD CITOTÓXICA	
5. Obtención de anticuerpos contra curcina.....	58
6. Modelación <i>in silico</i> de curcina.....	59

7. Oxidación de curcina con periodato de sodio (NaIO ₄).....	60
8. Aminación reductiva de curcina oxidada con anti-Her2.....	60
9. Análisis de la inmunotoxina curcina:anti-Her2.....	61
9.1 Inmunodetección de curcina e inmunotoxina.....	61
9.2 Inmunocitoquímica en líneas celulares cancerígenas.....	61
9.3 Evaluación de la actividad citotóxica de la inmunotoxina (curcina:anti-Her2)....	62

VI. RESULTADOS

ETAPA I: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CURCINA

1. Información medicinal e identificación de <i>J. curcas</i> L.....	64
2. Extracción, purificación e identificación de curcina a partir de semillas de <i>J. curcas</i> L.....	65
3. Caracterización fisicoquímica e identificación de curcina.....	68
4. Determinación de actividad N-glicosidasa de curcina.....	70

ETAPA II: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE CURCINA

5. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto citotóxico de curcina en líneas celulares cancerígenas y sanas.....	71
--	----

ETAPA III: CONSTRUCCIÓN DE LA INMUNOTOXINA (curcina:anti-Her2) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD CITOTÓXICA

6. Obtención de anticuerpos contra curcina.....	74
7. Modelación <i>in silico</i> de curcina.....	74
8. Conjugación de curcina y anti-Her2 mediante aminación reductiva.....	76
8.1 Análisis de la inmunotoxina curcina:anti-Her2.....	78

9. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto citotóxico de la inmunotoxina curcina:anti-Her2 en líneas celulares cancerígenas y sanas.....	80
VII. DISCUSIÓN.....	83
VIII. CONCLUSIONES.....	101
IX. PERSPECTIVAS.....	102
X. REFERENCIAS.....	103
XI. ANEXOS.....	113

Lista de Tablas

		Págs
Tabla 1.	Clasificación taxonómica de <i>Jatropha curcas</i> L.....	3
Tabla 2.	Propiedades tóxicas de las RIPs.....	15
Tabla 3.	Estatus de los estudios clínicos de algunas ITs.....	25
Tabla 4.	RIPs tipo I usadas en la construcción de ITs.....	25
Tabla 5.	Inmunotoxinas obtenidas por conjugación química.....	32
Tabla 6.	Familia de receptores de factor de crecimiento epidermal: Componentes y ligandos.....	36
Tabla 7.	Inmunotoxinas desarrolladas para terapias dirigidas al receptor Her2/neu.....	43
Tabla 8.	Uso medicinal del piñoncillo (<i>J. curcas</i> L) en el municipio de Xicotepec de Juárez, Puebla.....	64
Tabla 9.	Rendimientos en las diferentes etapas para la obtención de curcina a partir de semillas de <i>J. curcas</i> L.....	65
Tabla 10.	Parámetros fisicoquímicos de curcina purificada a partir de pasta residual de <i>J. curcas</i> L.....	69
Tabla 11.	Péptidos generados mediante cromatografía líquida acoplada a espectroscopía de masas (LC-MS/MS) de curcina pura obtenida a partir de pasta residual de <i>J. curcas</i> L.....	70
Tabla 12.	Actividad citotóxica (CI ₅₀) de curcina y RTA en líneas de cáncer de mama MDA-MB-231, SK-BR-3 y en línea de tejido sano FIBROBLASTOS.....	73
Tabla 13.	Actividad citotóxica (CI ₅₀) de curcina , curcina bloqueada, anti-Her2 e inmunotoxina en líneas de cáncer de mama MDA-MB-231 y SK-BR-3, y en línea de tejido sano de FIBROBLASTOS.....	81

Lista de Figuras

		Págs
Figura 1.	Árbol, arbusto, fruto y semillas de <i>Jatropha curcas</i> L.....	4
Figura 2.	Distribución geográfica del cultivo de <i>Jatropha curcas</i> L en México en el año 2008.....	4
Figura 3.	Subproductos generados en el procesamiento industrial de <i>Jatropha curcas</i> L.....	6
Figura 4.	Actividad N-glicosidasa de las RIPs en el dominio S/R de la subunidad mayor de los ribosomas.....	8
Figura 5.	Esquema de los tres tipos de RIPs (<i>ribosome-inactivating protein</i>) según los dominios o cadenas funcionales que poseen. Los tres tipos mantienen el dominio N-glicosidasa, aunque en algún caso éste es procesado postraduccionalmente y está formado por más de una cadena polipeptídica.....	11
Figura 6.	Vías de introducción de ricina (A), saporina (B) y tricosantina (C) a células de mamíferos.....	12
Figura 7.	Mecanismo de acción de las ITs en la célula blanco.....	21
Figura 8.	Estructura química de entrecruzadores heterobifuncionales usados en la derivatización de los componentes de las ITs.....	28
Figura 9.	Reacción “aminación reductiva” o “alquilación reductiva” que permite la formación de enlaces nitrógeno-carbono-hidrógeno.....	30
Figura 10.	Conjugación anticuerpo-enzima mediante aminación reductiva.....	31
Figura 11.	Mortalidad por cáncer de mama y cáncer cérvico-uterino, tasa por 100,000 mujeres ajustada por edad. México 1955-2007.....	34
Figura 12.	Señales de transducción dependientes de los receptores de factores de crecimiento epidermal.....	37
Figura 13.	Estrategia experimental para la obtención de la inmunotoxina (IT) curcina:anti-Her2.....	49
Figura 14.	Ficha de identificación taxonómica de <i>Jatropha curcas</i> L No. de registro: 2011 IZTA.....	65

	Págs
Figura 15. SDS-PAGE del extracto T/A (T/A) obtenido por precipitación con Tris-HCl 50 mM pH 7.5 de la pasta residual de <i>J. curcas</i> L (MPM: marcador de peso molecular).....	66
Figura 16. Cromatografía de intercambio iónico en columna de SP-Sepharosa del extracto T/A proveniente de pasta residual de <i>J. curcas</i> L eluido con solución amortiguadora de fosfatos 5 mM, pH 7.0 y 1.0 M NaCl.....	67
Figura 17. Análisis SDS-PAGE de extracto T/A y fracciones obtenidas en cromatografía de intercambio iónico en SP y CM-Sepharosa a partir de pasta residual de <i>J. curcas</i> L (Gel de poliacrilamida al 12% en condición reductora y Tinción con plata).....	67
Figura 18. Cromatografía de intercambio iónico en columna de CM-Sepharosa de F2 (curcina cruda) eluida con solución amortiguadora de fosfatos 5 mM, pH 7.0 y gradiente de NaCl.....	68
Figura 19. Determinación por espectroscopía de masas del peso molecular de curcina purificada a partir de pasta residual de <i>J. curcas</i> L.....	68
Figura 20. Glicosilación de curcina en gel SDS-PAGE 12% reductor (Tinción método ácido peryódico-reactivo de Schiff).....	69
Figura 21. Actividad N-glicosidasa: ARN de embriones de <i>J. curcas</i> L se incubaron con 1 µg de curcina o 0.006 µg de cadena A de ricina (RTA), separados en gel de agarosa 1.2% en condiciones desnaturalizantes, y teñido con bromuro de etidio. Los símbolos '+' y '-' indican la presencia o ausencia del tratamiento con anilina ácida 1M pH 4.5, respectivamente. Carril 1: marcador de pares de bases; carril 2: ARN de embriones de <i>J. curcas</i> L; carril 3: ARN tratado con curcina sin tratamiento de anilina; carril 4: ARN tratado con curcina y anilina; carril 5: ARN tratado con RTA sin tratamiento de anilina; carril 6: ARN tratado con RTA y anilina. La flecha señala la banda correspondiente al α-fragmento liberado luego del tratamiento con anilina	

(característico de la actividad N-glicosidasa de las RIPs,
también llamado fragmento Endo).....71

Págs

- Figura 22.** Efecto citotóxico de curcina en las líneas celulares cancerígenas MDA-MB-231 (▲), SK-BR-3 (▲) y la línea sana de fibroblastos (▲). Las células fueron incubadas durante 24 h con diferentes concentraciones de curcina. La viabilidad se determinó por la técnica de MTT. Datos son media \pm DE de 3 a 5 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno.....72
- Figura 23.** Efecto citotóxico de la cadena A de la ricina (RTA) en las líneas celulares cancerígenas MDA-MB-231 (▲), SK-BR-3 (▲) y la línea sana de fibroblastos (▲). Las células fueron incubadas durante 24 h con diferentes concentraciones de curcina. La viabilidad se determinó por la técnica de MTT. Datos son media \pm DE de 3 a 5 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno.....73
- Figura 24.** Inmunodetección de curcina (SDS-PAGE 12%) detectada con anti-curcina policlonal obtenida en conejo y purificada en columna de Proteína A (dilución 1:250, revelado con 4-cloro-1-naftol).....74
- Figura 25.** Estructura tridimensional de curcina generada por el servidor I-TASSER a partir de la acceso ACO53803.1 del GenBank.....75
- Figura 26.** Gráfico de Ramachandran para el modelo 3D del acceso ACO53803.1 de curcina predicho por el servidor I-TASSER. Las regiones más favorecidas aparecen en color rojo, las zonas permitidas, poco permitidas y no permitidas son indicadas como zonas de colores amarillo, amarillo tenue y blanco, respectivamente.....76
- Figura 27.** Estructura 3D de curcina glicosilada con el oligosacárido GlcNAc2Man3Xyl en los residuos de asparagina en posiciones 266 y 274 generada con el software GlyProt.....76
- Figura 28.** Análisis SDS-PAGE 12% de curcina (carril 1) y curcina en diferentes etapas de la reacción de oxidación con NaIO₄ (carriles 2 a 5). MPM: Marcador de peso molecular.....77

	Págs
Figura 29. Prueba de Tollens aplicada a curcina oxidada con NaIO_4 (Espejo de plata).....	77
Figura 30. Análisis SDS-PAGE (gel 10%, no reductor) de la conjugación de Anti-Her2 y curcina. Carril 1: curcina oxidada con NaIO_4 ; carril 2: Anti-Her2 en solución amortiguadora de carbonatos; carril 3: inmunotoxina curcina:anti-Her2.....	78
Figura 31. Inmunodetección (gel 10%, no reductor) de curcina (carriles 1 y 2), anti-Her2 (carriles 3 y 4) e inmunotoxina (carriles 5 y 6), tratados con anti-curcina (carriles 1, 3 y 5) o con anti-IgG peroxidado de conejo (carril 2) o con anti-IgG peroxidado de ratón (carriles 4 y 6).....	78
Figura 32. Inmunocitoquímica aplicada en células cancerígenas MDA-MB-231 (Her2-) y SK-BR-3 (Her2+). Las células fueron tratadas con la inmunotoxina curcina:anti-Her2 (1:250) y reveladas con 3,3'-diaminobencidina (DAB).....	79
Figura 33. Efecto citotóxico de la inmunotoxina curcina:anti-Her2 en las líneas celulares cancerígenas MDA-MB-231 (■), SK-BR-3 (■) y la línea sana de fibroblastos (■). Las células fueron incubadas durante 24 h con diferentes concentraciones de inmunotoxina. La viabilidad se determinó por la técnica de MTT. Datos son media \pm DE de 3 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno.....	80
Figura 34. Mecanismo de reacción durante la oxidación de grupos hidroxilo vicinales con NaIO_4	94

RESUMEN

La curcina es una proteína inactivadora de ribosomas (RIP) que se encuentra en el endospermo de semillas de *Jatropha curcas*, es una enzima N-glicosidasa que actúa sobre el ARNr bloqueando la síntesis de proteínas, y generando efecto citotóxico en células de mamíferos a través de apoptosis; esta condición le permite constituir la porción tóxica de una inmunotoxina. Las inmunotoxinas son moléculas con potencial uso en terapias contra el cáncer debido a que están conformadas por un ligando asociado a tumores y una toxina; esto les permite unirse a receptores específicos en la superficie celular, ser internalizadas vía endocitosis y tener efectos tóxicos para eliminar solo a las células tumorales. El objetivo de este estudio fue construir una inmunotoxina a partir de curcina y un anticuerpo monoclonal contra Her2 mediante oxidación de azúcares y aminación reductiva. Her2 es un antígeno asociado al cáncer con gran potencial para el desarrollo de terapias dirigidas.

La curcina aislada de la torta residual de *Jatropha curcas* L mostró una masa molecular de 32.7 kDa, pl de 8.70 y 4.14% de azúcares. La actividad N-glicosidasa se determinó en ARNr de semillas de *Jatropha curcas* L, luego de incubación con esta RIP y tratamiento con anilina ácida; la presencia del fragmento Endo confirmó esta actividad enzimática. Los azúcares de curcina fueron oxidados con NaIO_4 y los aldehídos generados se aminoraron con el anti-Her2 bajo condiciones reductoras. La unión entre ambas proteínas fue comprobada y validada por análisis de inmunodetección.

Los efectos citotóxicos fueron evaluados *in vitro* en las líneas celulares de cáncer de mama SK-BR-3 (Her2+) y MDA-MB-231 (Her2-) y en fibroblastos. Los valores de CI_{50} para curcina fueron estadísticamente iguales ($p < 0.05$) para los cultivos cancerígenos, con valores de 15.5 ± 8.3 y 18.6 ± 2.4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente y diferentes respecto a fibroblastos (353.4 ± 41.9 $\mu\text{g/mL}$). Mientras que para la inmunotoxina fueron de 2.2 ± 0.08 $\mu\text{g/mL}$ para SK-BR-3, 147.6 ± 2.5 $\mu\text{g/mL}$ para MDA-MB-231 y 16.7 ± 2.8 $\mu\text{g/mL}$ para fibroblastos. Estos valores demostraron el efecto tóxico diferencial de la inmunotoxina hacia células Her2+ y Her2- ($p < 0.05$). La inmunotoxina fue siete veces más tóxica para la línea SK-BR-3 que la curcina y ocho veces menos tóxica para la línea MDA-MB-231. Estos resultados permiten concluir que la inmunotoxina construida por

curcina y un anticuerpo contra Her2 mediante aminación reductiva puede ser un candidato terapéutico contra el receptor Her2.

ABSTRACT

Curcin is a ribosome inactivating protein (RIP) that is found in *Jatropha curcas* seeds, it is an enzyme with N-glycosidase activity over rRNA and thus blocks protein synthesis; it has been shown that curcin has cytotoxic effects on mammalian cells through apoptosis, for this reason this protein could be part of “immunotoxins”. Immunotoxins are hybrid proteins composed of a tumor-specific ligand linked to a toxin that are used in cancer therapy. These chimeric molecules are attached to specific cell surface receptors and they are internalized by endocytosis, where the toxin affects some metabolic process and kills the tumour cells without affecting healthy cells. This study is focused to investigate if it is possible to build an immunotoxin from curcin and the anti-Her2 monoclonal antibody through sugar oxidation and reductive amination. This antigen is associated with cancer and is a potential target for developing these hybrid molecules.

Curcin isolated from seed cake of *Jatropha curcas* L had a molecular mass of 32.7 kDa, a pI of 8.70 and a total sugar content of 4.14%. N-glycosidase activity was determined using rRNA from seeds of *Jatropha curcas* L after curcin incubation and aniline acetate treatment; the presence of the Endo fragment confirmed their enzymatic activity. The sugars on curcin were oxidized with NaIO₄ and the aldehydes groups were aminated with the anti-Her2 under reducing conditions. The binding between both proteins was tested using SDS-PAGE, immunoblotting and immunocytochemistry.

The *in vitro* cytotoxic effect of curcin and the immunotoxin was assessed on breast cancer cell lines SK-BR-3 (Her2+) and MDA-MB-231 (Her2-) and fibroblasts. IC₅₀ values for curcin were statistically equivalent ($p < 0.05$) for both cancer cultures, with values of $15.5 \pm 8.3 \mu\text{g/mL}$ and $18.6 \pm 2.4 \mu\text{g/mL}$ respectively, but they were different respect fibroblasts ($353.4 \pm 41.9 \mu\text{g/mL}$). While to the immunotoxin was $2.2 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$ for SK-BR-3, $147.6 \pm 2.5 \mu\text{g/mL}$ for MDA-MB-231 and $16.7 \pm 2.8 \mu\text{g/mL}$ for fibroblasts. These values showed the differential toxic effect of the immunotoxin to Her2+ and Her2- cells ($p < 0.05$). The immunotoxin was seven times more toxic to the SK-BR-3 than curcin and eight times less toxic to the MDA-MB-231. It was concluded that the immunotoxin

composed of curcin and an antibody against Her2 that was constructed by reductive amination could be a therapeutic candidate against Her2+ cancer.

INTRODUCCIÓN

La torta residual que se genera como subproducto del procesamiento industrial de semillas de *J. curcas* L para la obtención de aceite, representa el 40% del total de la semilla y esta constituida por proteínas en un 60%, entre las que destaca la curcina.

La curcina es una enzima clasificada como proteína inactivadora de ribosomas (RIP), cuyo mecanismo de acción consiste en romper la unión glicosídica entre la adenina (A₄₃₂₄ en el RNA ribosomal de hígado de rata) y la ribosa de la subunidad 28S del RNA ribosomal. La acción evidente de las RIPs es causar la muerte de los organismos que atacan, entre los que destacan virus, bacterias y hongos. Sin embargo, presentan uso potencial en agricultura y medicina, en este último caso destaca de forma importante su uso en la construcción de inmunotoxinas (ITs).

Las ITs, son una clase de moléculas híbridas constituidas por un agente selectivo celular y una sustancia tóxica de origen biológico, de tal forma que se conjugan en un solo compuesto citotóxicidad y especificidad. Las patologías que pueden tratarse con ITs son todas aquellas basadas en la existencia de células enfermas con moléculas distintivas específicas en su superficie celular (diana) y que están ausentes o en menor concentración en la superficie de las células sanas, mecanismo acuñado desde hace 100 años por Paul Ehrlich como “bala mágica”, y que tiene como gran ventaja que se evitan o disminuyen los daños a las células normales o sanas.

En el diseño y construcción de las ITs destacan tres factores importantes, el ligando de reconocimiento celular, generalmente un anticuerpo monoclonal, la porción tóxica y el mecanismo o reacción que permitirá la unión entre ambos.

Existen un gran número de moléculas que podrían servir como blancos de reconocimiento de las ITs, unos de estos es el receptor Her2 o factor de crecimiento epidermal ErbB2, que se sobreexpresa en el cáncer de mama Her2+ y que se asocia con un comportamiento clínico agresivo y de poca respuesta a tratamiento quimioterapéuticos convencionales. Ya existen en la clínica y en la investigación

anticuerpos monoclonales dirigidos a este receptor, y aun cuando han generado muy buenos resultados todavía se presentan pacientes resistentes a este tipo de medicamentos.

Una manera de asegurar mejor respuesta a las terapias con anticuerpos monoclonales es combinándolos con sustancias que ataquen algún proceso metabólico importante para el desarrollo de la célula cancerosa; dentro de las sustancias tóxicas con este potencial destacan las proteínas inhibidoras de ribosomas (RIPs) como la curcina.

En esta investigación se planteó la construcción de una inmunotoxina cuya porción de reconocimiento celular es un anticuerpo monoclonal anti-Her2 y la parte tóxica es la proteína inactivadora de ribosomas curcina proveniente de la pasta residual desechada durante el proceso de extracción del aceite de *Jatropha curcas* L.

I. ANTECEDENTES

1. La especie *Jatropha curcas* L.

Jatropha curcas L, especie donde se encuentra la RIP curcina, es una oleaginosa que pertenece a la familia Euphorbiaceae y cuya clasificación taxonómica se presenta en la Tabla 1. Aunque esta planta se considera nativa de América tropical, ahora se encuentra distribuida en amplias zonas tropicales y subtropicales de América, Asia y África.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Jatropha curcas* L (Pabón, 2009).

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Euphorbiales
Familia	Euphorbiaceae
Género	Jatropha
Especie	<i>Jatropha curcas</i>
Nombre Científico	<i>Jatropha curcas</i> L.

Jatropha curcas L es una planta perenne caducifolia cuyo ciclo productivo se extiende de 45 a 50 años. Es de crecimiento rápido y con una altura normal de 2 a 3 m. El grosor del tronco es de 14 a 18 cm con crecimiento desde la base en distintas ramas. La corteza es blanco grisácea que exuda un látex translúcido lechoso. Las hojas son simples, alternas y en forma de corazón, con bordes lisos que normalmente forman de 3 a 7 lóbulos acuminados, poco profundos y grandes con pecíolos largos de 10 a 15 cm y de igual ancho. El haz es verde mientras que el envés es verde claro, glabro o con pelillos finos. Las inflorescencias, de color amarillo o amarillo-verdoso, se forman en posición terminal y en las axilas formadas entre hojas y ramas. Tanto las flores masculinas como las femeninas se forman en la misma planta y son pequeñas (6-8 mm). Cada inflorescencia rinde un manojito de aproximadamente 10 frutos ovoides, cuyo desarrollo necesita 90 días, siendo cápsulas drupáceas verdosa-amarillenta y carnosas, café oscuro o negro y dehiscentes cuando se secan. La fruta produce tres almendras negras, cada una de aproximadamente 2 cm de largo y 1 cm de diámetro. Las semillas

contienen un aceite no comestible que se puede utilizar directamente para aprovisionar de combustible lámparas y motores de combustión o se puede transformar en biodiesel. Además se usan para fabricar jabones y extraer colorante (Pabón, 2009) (Figura 1).



Figura 1. Árbol, arbusto, fruto y semillas de *Jatropha curcas* L.

En México se le conoce como piñón, piñoncillo, tempate, coquito, piñón botija, pistache mexicano, sikil-te, ahsti, entre otros; se localiza de forma silvestre en Sonora, Tamaulipas, Sinaloa, Puebla, Morelos, Veracruz, Oaxaca, Quintana Roo, Yucatán; y en menor proporción en los estados de Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Edo. de México, Hidalgo, Guerrero, Tabasco y Chiapas (Figura 2) (Martínez-Herrera, 2006).

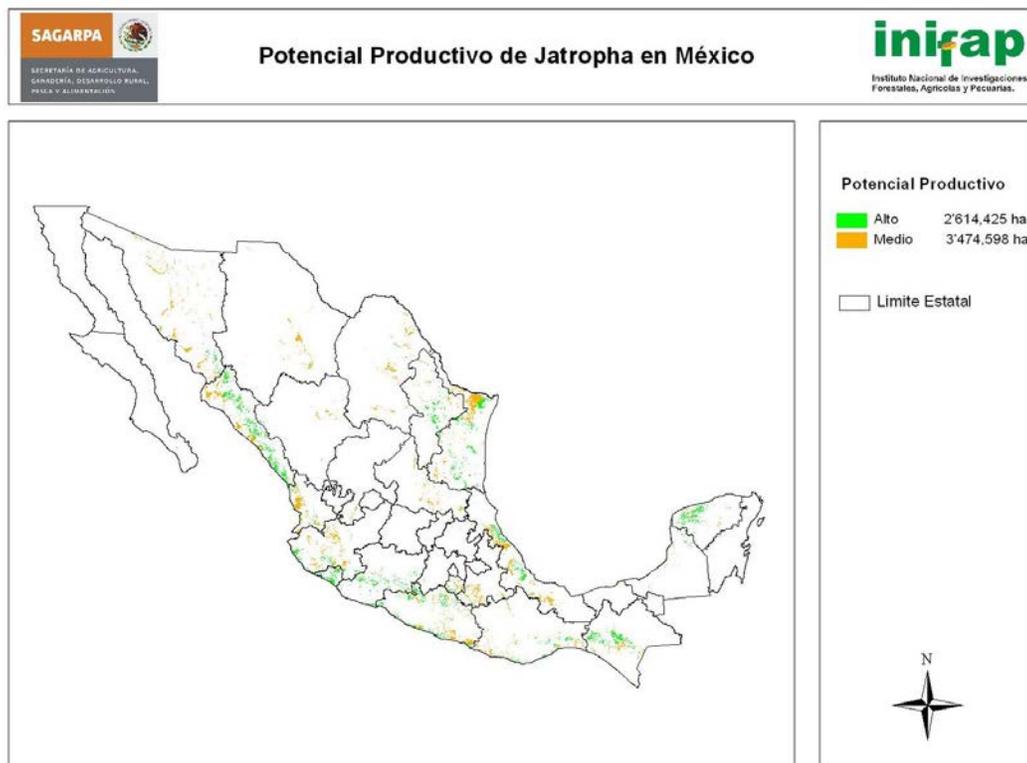


Figura 2. Distribución geográfica del cultivo de *Jatropha curcas* L en México en el año 2008 (INIFAP, 2010).

Es una planta muy bien adaptada a crecer en condiciones áridas y semiáridas, e incluso en terrenos muy pobres en nutrientes, por lo que se ha usado para prevenir la erosión del suelo o para regenerarlo.

Se han reportado múltiples usos de *Jatropha curcas* L en la medicina tradicional, ya sea como infusiones de tallo u hoja, pero principalmente por el consumo del fruto y la semilla. Entre las afecciones que cura se mencionan la disentería crónica, dolores abdominales, anemia, enfermedades urinarias, fiebres, reumatismo, ictericia, eczema, gonorrea, enfermedades de la mucosa bucal, entre otras. Los frutos tostados se usan como purgantes, el látex se usa para dolor de dientes y como antihemorrágico, mientras que el jugo de las hojas se aplica en casos de fiebre, por lo que se ha resumido que presenta propiedades antiinflamatorias, antiparasitarias y antihemorrágicas (Nayak y col., 2009; Pabón, 2009).

Existen casos de envenenamiento en seres humanos causados por el consumo de semillas de *J. curcas* L, cuyos síntomas incluyen vértigo, vómito, diarrea y en general irritación gastrointestinal, en casos extremos se ha llegado a la muerte. La toxicidad que tienen sus semillas, se debe a la presencia de inhibidores de tripsina, saponinas, ácido fítico, ésteres de forbol y lectinas (Makkar y col., 2009; Lin y col., 2010).

Actualmente las semillas de *J. curcas* L han recibido especial atención por su uso en la producción de biodiesel, tal procesamiento requiere en primer lugar la extracción del aceite contenido en las semillas, ya sea por medio de prensado mecánico o mediante extracción química. En ambos casos se generan varios subproductos (Figura 3), entre los que destaca la torta o pasta residual, la cual es rica en proteína (58-60% de proteína cruda base torta residual) y con un nivel de aminoácidos esenciales, excepto lisina, que le dan un importante valor como alimento para animales, siempre y cuando no presente toxicidad o haya pasado por un proceso de detoxificación (SAGARPA, 2008; SEMARNAT, 2008; Makkar y col., 2009).

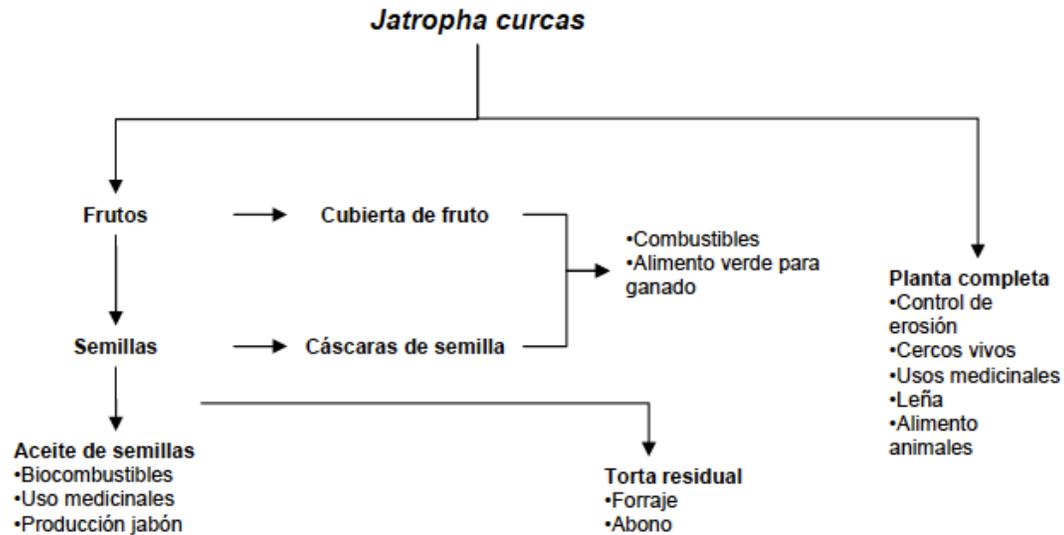


Figura 3. Subproductos generados en el procesamiento industrial de *Jatropha curcas* L (SEMARNAT, 2008).

Aunque el aceite de *J. curcas* L es más valioso que la pasta residual, esta última puede ser usada nuevamente desde el punto de vista biotecnológico, ya que es fuente de una proteína llamada curcina con fuerte actividad enzimática que permite su aplicación en la eliminación de virus, bacterias, hongos o de células de mamíferos, por su efecto citotóxico (Devappa y col., 2010).

1.1 Curcina

Una proteína presente en la semilla madura de *J. curcas* L, y por lo tanto en la pasta residual, es la curcina (considerada como lectina), la cual fue aislada, identificada y nombrada por primera vez en 1914 por Felke.

Wehmer (1913), Schwarting (1963) y Stirpe (1976) asociaron a la curcina con ricina y abrina, proteínas tóxicas de *Ricinus communis* y *Abrus precatorius*, respectivamente. Posterior comparación de la secuencia de aminoácidos de curcina con ricina y tricosantina reveló que existe una similitud del 54% y 57%, respectivamente. Por otro lado, los aminoácidos del sitio activo de la cadena A de la ricina y de la tricosantina también fueron encontrados en curcina en las posiciones correspondientes, con la única excepción de la Gln-173 que aparece como Glu-163 en curcina (Lin y col., 2003; Luo y col., 2006; Lin y col., 2010; Devappa y col., 2010).

En 1993 Barbieri reportó que la curcina es una toxoalbúmina del tipo de proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) tipo I, de cadena simple, y fue Lin (2003) quien aisló esta proteína a partir de semillas de piñón procedente de Sichuan en China, y determinó su actividad enzimática de N-glicosidasa sobre ARN ribosomal al tratar la subunidad 28S del ARN ribosomal de hígado de rata (Lin y col., 2010).

Se ha establecido que la curcina es una toxoalbúmina de 28 a 30 kDa en dos isoformas, una de ellas caracterizada por poseer peso molecular de 28.2 kDa y que se encuentra en el endospermo de semillas maduras, mientras que la otra presenta peso molecular de 30 kDa y aparece sólo bajo condiciones de estrés en las hojas de la planta (Qin y col., 2005; Lin y col., 2010).

Desde 2003, Lin y cols. encontraron que la curcina mostró efecto inhibitorio en la síntesis de proteínas en líneas celulares de mamíferos y concluyen que esto se debe a su actividad N-glicosidasa. Sin embargo, investigaciones realizadas en 2012 (Zhao y col.) y en 2014 (Mohamed y col.) concluyen que la exposición de células, tanto sanas como cancerígenas, a la RIP curcina induce apoptosis y necrosis. La característica de inducir muerte celular programada coloca a la curcina como una enzima con claras aplicaciones farmacológicas debido a su actividad antitumoral, pesticida y antifúngica.

1.1.1 La curcina como proteína inactivadora de ribosomas (RIP)

La curcina, al ser una proteína inactivadora de ribosomas (RIP), es capaz de dañar de forma específica e irreversible estos organelos al remover uno o más residuos de adenina, y de esta forma inhibir la síntesis de proteínas (Stirpe y col, 2006; Parente y col., 2008; de Virgilio y col., 2010).

La acción enzimática de las RIPs, tanto de una como de dos cadenas, provoca la hidrólisis del enlace N- β -glucosídico entre la adenina y la ribosa del nucleósido A₄₃₂₄ de la porción 28S del ARN ribosomal de la subunidad 60S de los ribosomas de mamíferos. Esta adenina se localiza en el dominio universalmente conservado sarcina/ricina (S/R) de la fracción mayor del ribosoma, el cual interactúa con el factor de elongación 2 (EF-2) en eucariotes y con el factor de elongación G (EF-G) en procariotes. La adenina liberada

permanece en el bucle del ARN ribosómico altamente conservado que se presenta en ribosomas de mamíferos, hongos, plantas y bacterias. Aunque se ha establecido este enlace como el principal punto de ataque de las RIPs, existe evidencia de que también pueden depurinar otros polinucleótidos, por esta razón se han llamado adenina polinucleótido glicosilasas o APG (Figura 4) (Barbieri y col., 1997; Hwu y col., 2000; Stirpe y col., 2006; de Virgilio y col., 2010; Ferreras y col., 2011).

La consecuencia evidente de esta acción es que se interrumpe la interacción del factor de elongación EF2 con la subunidad 60s del ribosoma, bloqueando de esta manera el paso de translocación de los aminoácidos de la región aminoacil a la peptidil y por lo tanto evitando la elongación de la cadena polipeptídica.

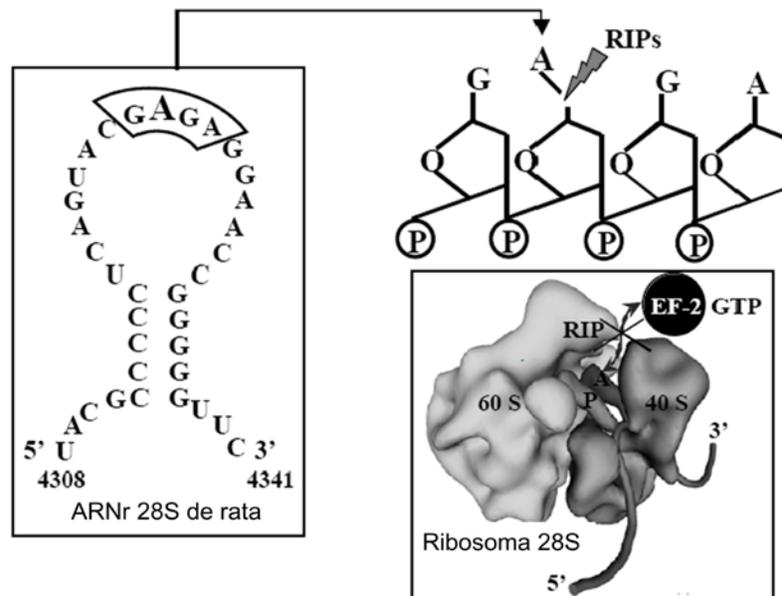


Figura 4. Actividad N-glicosidasa de las RIPs en el dominio S/R de la subunidad mayor de los ribosomas (Stirpe y col., 2006).

Debido a esta acción, las RIPs son clasificadas oficialmente como enzimas ARNr N-glicosidasas con clave EC 3.2.2.22 (Stirpe y col., 2006).

Además de la actividad N-glicosidasa, las RIPs pueden presentar otros efectos, tales como quitinasa, DNAasa, lipasa, con actividad topológica sobre el ADN, inhibitoria de la integrasa del virus de inmunodeficiencia humano (HIV) y de superóxido dismutasa (Ferreras y col., 2011).

Aunque las RIPs están ampliamente distribuídas en la naturaleza y se han encontrado en algunas bacterias, un alga (*Laminaria japonica*), y hongos, la mayor cantidad se da en el reino vegetal, donde pueden estar presentes en uno o más tejidos de la planta, e incluso en más de una forma. La ricina por ejemplo, esta presente sólo en las semillas de *Ricinus*, mientras que la saporina se encuentra en varias formas en todos los tejidos de *Saponaria officinalis*. Se han aislado 79 RIPs de origen vegetal, destacando las familias phitolacaceae, cucurbitaceae, euphorbiaceae, poaceae y del superorden cariophylales. Entre las RIPs cabe destacar además de la ricina, a las saporinas, las PAP, la tricosantina o sustancia GLQ223, nigrina y ebulina, por sus aplicaciones en terapia para seres humanos (Girbés, 2000; Stirpe y col., 2006; de Virgilio y col., 2010).

A pesar de que el mecanismo de acción de las RIPs es idéntico, distintos estudios han demostrado su especificidad hacia diferentes sustratos ribosomales. La ricina por ejemplo es muy activa contra ribosomas de mamíferos, pero muestra muy poca actividad contra ribosomas del trigo. Esta especificidad enzimática sugiere que la interacción RIP-ribosoma depende de la conformación ribosomal del organismo afectado (Park y col., 2004).

Aunque no se ha precisado un papel biológico exclusivo para las RIPs, el hecho de que se produzcan de forma estacional y que pueden ser inducidas por la presencia de ácido jasmónico o ácido absícico generados por estrés, condiciones de crecimiento desfavorables, infecciones virales, contaminación microbiana o senescencia, ha permitido postular que participan en el mecanismo de defensa química de las plantas contra predadores, hongos y virus, y que algunas RIPs intervienen en la senescencia vegetal (Ferrerías y col., 2011).

Respecto al mecanismo de acción de las RIPs como arma de defensa de las plantas, se ha propuesto que éstas son sintetizadas como proteínas inactivas en la matriz de la pared celular, y que entran al sitio de infección en el citoplasma junto con el patógeno, en donde inactivan los ribosomas e inhiben así la multiplicación del patógeno. Sin embargo, existen estudios que recalcan la acción directa de las RIPs sobre los ribosomas de bacterias y hongos patógenos de plantas (Park y col., 2004).

Más allá del papel que juegan las RIPs como mecanismo de defensa en las plantas, se ha demostrado que son capaces de inducir apoptosis o muerte celular programada en líneas celulares humanas (Narayanan y col., 2004). Esta característica ha permitido plantear la posible aplicación biomédica de las RIPs en enfermedades tales como cáncer, SIDA y enfermedades autoinmunes. Sin embargo, existen otros posibles usos biotecnológicos de estas enzimas, entre los que destacan la explotación de su actividad antiviral y antimicrobiana, tanto en forma nativa como en organismos genéticamente modificados (Ferrerías y col., 2011).

1.1.1.1 Clasificación de las RIPs

Las RIPs se clasifican de acuerdo a su estructura y a los genes que las codifican, en tres grandes grupos:

- RIPs tipo 1, se caracterizan por poseer sólo una cadena polipeptídica con punto isoeléctrico alcalino (pH 8-10) y de peso molecular entre 25 y 32 kDa, que puede estar unida a carbohidratos. Sin embargo, se han encontrado algunas que poseen dos cadenas polipeptídicas más pequeñas unidas mediante interacciones no covalentes.
- RIPs tipo 2, son proteínas heterodímeras, la cadena A con actividad enzimática y la cadena B con propiedades de lectina específica a galactosa, cuyos pesos moleculares son de 26 a 33 y de 28 a 38 kDa, respectivamente. Ambas cadenas se encuentran unidas mediante enlaces disulfuro e interacciones secundarias. La cadena lectina B se une a azúcares de la superficie de células eucarióticas y media el transporte retrogrado de la cadena A hacia el citosol, donde realiza su actividad enzimática. Muchas RIPs de este tipo son altamente tóxicas.
- RIPs tipo 3, se encuentran sólo en el género *Poaceae*, e incluyen a la proteína b-32 del maíz y a la JIP60 proveniente de la cebada. La característica principal de este tipo de RIPs es la de contar con porciones

peptídicas relacionadas estructuralmente a la proteína inductora de jasmonato de 60 kDa de la cebada (JIP60); esta JIP60 tiene un dominio amino terminal relacionado a la cadena A de las RIPs tipo II, unido a un dominio carboxiterminal con función desconocida. Estas RIPs se sintetizan como precursores inactivos que requieren procesamiento proteolítico para llegar a su forma activa (Figura 5) (Girbés, 2000; Lin y col., 2003; Stirpe y col., 2006; Parente y col., 2008; de Virgilio y col., 2010).

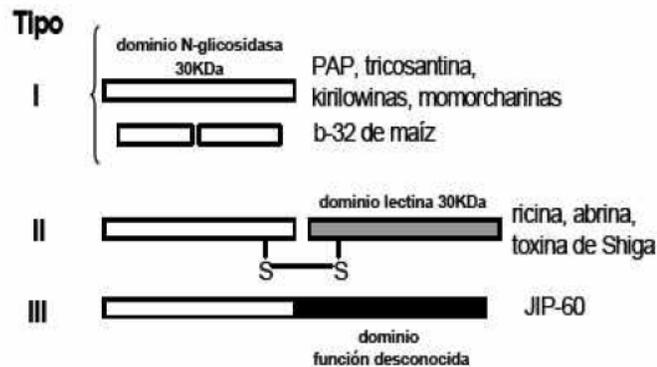


Figura 5. Esquema de los tres tipos de RIPs (*ribosome-inactivating protein*) según los dominios o cadenas funcionales que poseen. Los tres tipos mantienen el dominio N-glicosidasa, aunque en algún caso éste es procesado postraduccionalmente y está formado por más de una cadena polipeptídica (Reyes, 2008).

1.1.1.2 Rutas de introducción de las RIPs en células de mamíferos

La entrada de las RIPs a las células de mamíferos es a través de endocitosis mediada por receptores. En el caso de la ricina, y en general para todas las RIPs tipo II, la cadena B con actividad de lectina reconoce los residuos de galactosa presentes en la membrana citoplasmática, mientras que las RIPs tipo I lo hacen mediante alguno de los receptores de la familia de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Una vez que la RIP es endocitada, inicia su transporte retrógrado desde el aparato de Golgi hacia el retículo endoplásmico (RE), donde el enlace disulfuro entre las dos subunidades de las RIPs tipo II se rompe mediante reducción, liberando de esta forma la cadena A, la cual presenta la actividad enzimática. Cabe señalar que los mecanismos de translocación han sido bien establecidos para las RIPs tipo II, mientras que para las RIPs tipo I no se han dilucidado totalmente, de hecho se establece que esta característica de no contar con un receptor de membrana específico, explica que su citotoxicidad sea baja y por ende sus valores de

CI₅₀ estén en el rango micromolar, mientras que para las RIPs tipo II es en el orden nanomolar (Olmo y col., 2001; Narayanan y col., 2004).

La cadena A de la ricina interactúa con los lípidos de la membrana del RE que están cargados negativamente y esto provoca su desdoblamiento parcial, seguido por el subsecuente transporte hacia el citosol mediante la vía de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD), mecanismo que puede incluir interacción con las proteínas Sec61p, la α -manosidasa I (EDEM) y el complejo ubiquitina ligasa Hrd1p. En el citosol, la cadena A de la ricina retoma su conformación tridimensional original con la ayuda de la proteína Hsc70 y por lo tanto se activa su función enzimática (Figura 6) (Nielsen y col., 2001; Wang y col., 2011).

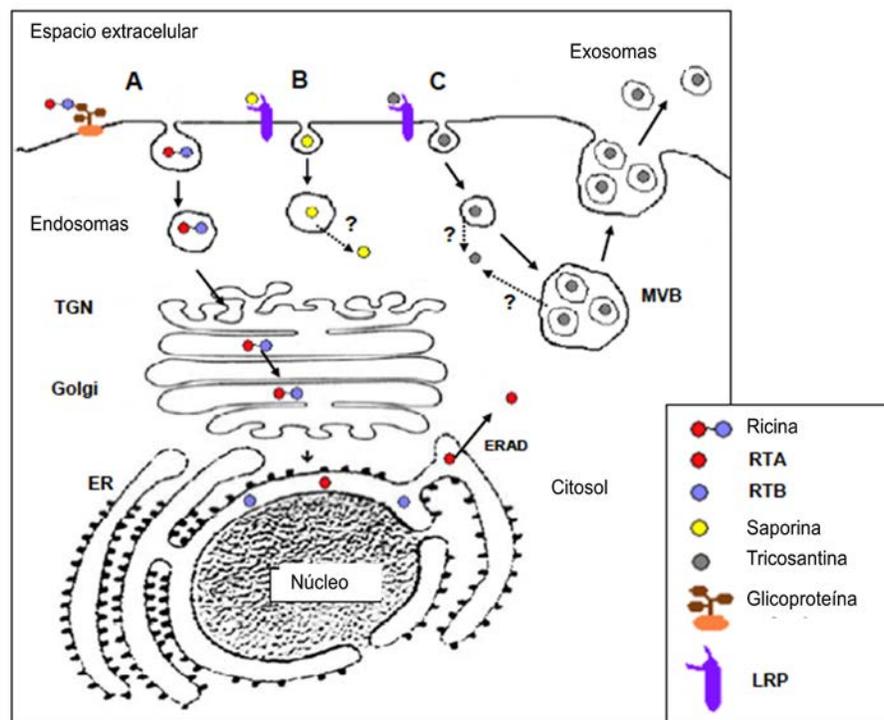


Figura 6. Vías de introducción de ricina (A), saporina (B) y tricosantina (C) a células de mamíferos. TGN: aparato de Golgi trans; ER: retículo endoplásmico; ERAD: degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico; MVB: cuerpo multivesicular; RTA: cadena A de ricina; RTB: cadena B de ricina; LRP: proteína receptor de lipoproteínas de baja densidad (de Virgilio y col., 2010).

En el caso de las RIPs tipo I, el análisis por microscopía electrónica realizado por Bolognesi y col. (2012) concluyó que la endocitosis de la saporina-S6 en células HeLa fue mediante vesículas no-cubiertas y que el movimiento al citosol es independiente de la vía del aparato de Golgi, sin embargo se ha encontrado esta RIP en varios

compartimentos celulares (RE, aparato de Golgi y núcleo) por lo que se plantea que su entrada se da por diferentes caminos (Polito y col., 2013).

1.1.1.3 Citotoxicidad de las RIPs en células de mamíferos

La citotoxicidad de las RIPs ha sido ampliamente documentada en células de mamíferos, donde se ha evidenciado que a nivel celular inducen el mecanismo de muerte celular programada o apoptosis, y en grandes dosis pueden causar necrosis.

Los mecanismos a través de los cuales se induce la apoptosis han sido ampliamente estudiados en ricina (RIP tipo II), modecina, toxina de la difteria y exotoxina de *Pseudomonas*, reportándose en todos ellos el involucramiento de varias caspasas, serina proteasas y cambios en el ADN genómico, por lo que se sugiere que el efecto de las RIPs sobre ADN y ARN contribuyen al daño celular. Sin embargo, se ha reportado que junto con la inactivación ribosomal generada por ricina, se ha presentado disminución en los niveles de ATP y NAD⁺, mientras que con abrina se provocó la inactivación de proteínas antioxidantes, factores que también influyeron en la muerte celular. En el caso particular de abrina se plantea que la apoptosis se presenta después de que se ha inactivado la síntesis de proteínas y que la muerte celular es dependiente de caspasa-3 pero independiente de caspasa-8, además de que se provoca daño en el potencial de membrana mitocondrial y producción de especies reactivas de oxígeno (Narayanan y col., 2004; Stirpe y col., 2006).

Estudios recientes han sugerido que la inhibición de síntesis proteica no es suficiente para que las RIPs induzcan muerte celular, ya que resultados experimentales han evidenciado que la inhibición de la respuesta al desdoblamiento proteico (UPR) causada por la ricina y la cadena A de la misma también provoca muerte celular e incluso en mayor medida que la inhibición de la síntesis proteica (de Virgilio y col., 2010; Wang y col., 2011).

La respuesta al desdoblamiento proteico (UPR) es un mecanismo de señalamiento enzimático del RE que aparece para restaurar la homeostasis de éste en condiciones de estrés, y por lo tanto para evitar la apoptosis; la UPR incrementa por un

lado la transcripción de chaperonas y enzimas de doblamiento localizadas en el RE para acelerar la eficiencia en el arreglo conformacional de las proteínas, y por el otro inhibe la traducción de proteínas generales para evitar la acumulación de las mismas en el lumen del RE.

Wang y cols. (2011) evaluaron el efecto de la cadena A de la ricina y de la ricina completa en la UPR en la línea celular de epitelio de mama de bovino MAC-T y en la de cáncer cervical HeLa, encontrando que estas proteínas inhiben diferentes vías de la UPR, lo que permite a las RIPs causar la muerte mediante un mecanismo independiente a la inhibición de la síntesis proteica, efecto que también se ha encontrado en levaduras donde los procesos antes mencionados están desacoplados.

Aunque hay resultados que no establecen una correlación directa entre inhibición de síntesis de proteínas y apoptosis, se ha sugerido que la muerte celular programada puede ser activada por RIPs debido a que éstas inhiben la traducción de proteínas constitutivas requeridas para mantener la adecuada permeabilidad mitocondrial, tales como los factores antiapoptóticos Bcl-2 (Olmo y col., 2001; Narayanan y col., 2004).

La investigación de la IT recombinante construida con la RIP gelonina mostró claramente que la muerte celular inducida por esta proteína no fue por la vía apoptótica ni por necrosis, en su lugar se evidenció que la citotoxicidad en la línea celular SK-OV3 fue por autofagia (Cao y col., 2009).

De forma particular para curcina, Mohamed y col. (2014) encontraron que esta proteína provocó una gran cantidad de cambios en la estructura y el metabolismo de las células incubadas con 100 µg/mL de esta RIP durante 72 h; entre los cambios más importantes se encontraron: disfunción mitocondrial, aumento en el número de especies reactivas de oxígeno, degeneración nuclear, desestabilización estructural/mecánica y supresión de los mecanismos de defensa, que en conjunto provocaron apoptosis y necrosis.

De estos resultados se deduce entonces que la muerte celular causada por las RIPs se debe a varios mecanismos y no sólo a la inhibición de la síntesis proteica.

En la Tabla 2 se presenta la citotoxicidad de los tres tipos de RIPs para líneas celulares *in vitro* y ratones, se observa claramente que hay una gran variabilidad en los valores de CI_{50} y DL_{50} , lo cual se debe a las diferentes características de las células, de las RIPs y del mecanismo de citotoxicidad en cada caso.

Tabla 2. Propiedades tóxicas de las RIPs (Stirpe, 2004).

RIPs	ESTRUCTURA	PESO MOLECULAR (kDa)	INHIBICIÓN SÍNTESIS PROTEICA (CI_{50} nM)		TOXICIDAD PARA RATONES (DL_{50} , mg/Kg)
			LISADO RETICULOSITO DE CONEJO	CÉLULAS HeLa	
TIPO I	Una cadena	26-32	<0.01-4.0	170->3300	0.95-44
TIPO II	Dos cadenas	60-65	43-88	0.0003-1.7	0.0017-0.008
TIPO III	Dos cadenas	56-63	0.6->100	0.54->15000	1.4->40

CI_{50} : Concentración inhibitoria al 50%

DL_{50} : Dosis letal media

kDa: kilodaltons

1.1.2 Antecedentes de las funciones biológicas de curcina

Uno de los primeros trabajos donde purificaron y evaluaron la actividad de curcina fue realizado por Stirpe y col. en 1976, quienes determinaron el efecto del extracto crudo y de diferentes fracciones obtenidas de semillas de esta especie en la síntesis proteica en lisados de reticulocitos de conejo y sobre ratones. Sus resultados mostraron que las fracciones y el extracto crudo presentaron efecto inhibitorio diferente, ya que mientras la curcina cruda y la fracción I fueron tóxicas en tejidos *in vivo*, la fracción II generó mayor inhibición en tejidos *in vitro*.

En el 2003 Lin y cols., evaluaron el efecto antitumoral de la curcina sobre varias líneas celulares cancerígenas. En este estudio se determinó que la curcina tuvo un efecto de inhibición de síntesis proteica superior a otras RIPs, tales como la saporina y la tricosantina. Además encontraron que la curcina no presentó efectos tóxicos sobre células normales de pulmón humano (MRC) y células HeLa (cáncer cérvico-uterino), y que la secuencia de aminoácidos entre esta proteína y la cadena A de ricina presentó una homología del 54%. Finalmente concluyen que la curcina tiene un efecto antitumoral

con valores de CI_{50} de 0.23 mg/L para la línea SGC-7901 (cáncer gástrico), de 0.66 mg/L para la línea Sp2/0 (mieloma de ratón) y de 3.16 mg/L para una línea de hepatoma humano. Con estos resultados concluyen por un lado que el efecto antitumoral de curcina esta relacionado con la actividad de N-glicosidasa y por otro, que el hecho de que esta proteína presenta aminoácidos azufrados como la cisteina, la hacen una molécula adecuada para la construcción de inmunotoxinas mediante conjugación química.

Este mismo grupo de investigadores (2003b), integran el gen de curcina en la cepa de *E. coli* M15 mediante el vector pQE-30 y encuentran que la curcina recombinante es capaz de inhibir la síntesis proteica en sistemas *in vitro*. Establecen una CI_{50} de 0.19 ± 0.01 nM para la curcina nativa y de 0.32 ± 0.04 nM para la curcina recombinante en la inhibición de la síntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo

Por otro lado, Luo y cols. (2006), obtuvieron curcina recombinante en *E. coli* cepa M15 y evaluaron la actividad antitumoral y antivírica en condiciones *in vitro*. Entre sus aportaciones destacan el establecimiento de métodos de purificación y renaturalización de la curcina recombinante obtenida. Finalmente encontraron que concentraciones de 5 μ g/mL y superiores de la proteína recombinante inhibieron el crecimiento de células tumorales NCL-H446 (cáncer de pulmón), SGC-7901 y S180 (cáncer gástrico) de forma dosis dependiente, y que su morfología se asemejó a células en proceso de apoptosis, mientras que no hubo efecto sobre el virus de estomatitis vesicular. También concluyen que la inhibición del crecimiento celular fue un poco mayor para la proteína recombinante que para la proteína nativa en las tres líneas celulares cancerígenas probadas.

Lin y cols. (2010), realizaron una investigación detallada de curcina y determinaron un peso molecular de 28.2 kDa, pl de 8.54, y contenido de azúcares neutrales de 4.91%, entre otros análisis. Respecto a los efectos citotóxicos establecieron una CI_{50} de 0.42 nM en lisados de reticulocitos de conejo, con una actividad hematoaglutinante en concentraciones mayores a 7.8 mg/L, una DL_{50} de 104.737 ± 29.447 mg /kg en ratones cuando la aplicación fue vía oral y de 67.20 ± 10.445 mg/kg si

se administró por vía parenteral. Respecto a su estructura determinan la secuencia amino terminal de 32 aminoácidos y señalan que dentro de su estructura secundaria tiene un 22.3% en forma α -hélice, 43.5% en β -hélice plegada y 34.2% de colas y esquinas azarosas.

Las investigaciones realizadas por el grupo de trabajo de Qin, tuvieron como objetivo principal evaluar la producción de curcina en *J. curcas* L bajo diferentes condiciones de estrés. En su estudio del 2005 determinaron el efecto de los tratamientos con polietilenglicol (PEG), de temperaturas de 4°C/50°C e infección con diferentes especies de hongos, en la expresión del gen que codifica para la producción de curcina, analizando diferentes órganos de la planta y bajo condiciones *in vivo*.

Sus resultados mostraron que bajo condiciones de estrés se generó una molécula de curcina diferente a la encontrada en endospermo de semilla, de hecho la llamaron curcina 2, la cual presentó un peso molecular de 32 kDa y apareció sólo en hojas. Con estos resultados sugieren que la expresión diferencial de curcina 2 se puede deber a la diferente sensibilidad o especificidad de cada órgano hacia los tratamientos y que por lo tanto la producción de estas RIPs fue activada por las condiciones estresantes con diferente intensidad en cada tipo de órgano evaluado. Finalmente concluyen que la presencia de una curcina diferente, curcina 2, bajo condiciones de PEG, temperatura y hongos permitirá el estudio de las proteínas del estrés.

Una vez que se determinó la aparición de curcina 2 en hojas y por efecto de estrés en *J. curcas* L, se evaluó el promotor de curcina 2 en tabaco transgénico infectado con virus del mosaico de tabaco (TMV) y con el hongo patógeno *Rhizoctonia solani*, encontrándose que sólo las plantas de tabaco que expresaron curcina 2 presentaron efectos reducidos para ambas infecciones. Este resultado plantea que la curcina es un candidato potencial dentro de las estrategias de resistencia a patógenos en organismos transgénicos (Huang y col., 2008).

En el año 2009 Qin y cols., continuaron con el estudio de la producción de curcina pero ahora en tabaco transgénico, con el objetivo de investigar los patrones de expresión de esta proteína en diferentes estados de desarrollo de la semilla. Finalmente

concluyeron que el promotor fue activo en el endospermo del embrión de tabaco, y que la actividad fue iniciada en el estado de corazón durante el desarrollo embrionario.

Con estos antecedentes, este mismo grupo de trabajo (2009b) realizó un estudio para definir los promotores que determinan la expresión de curcina en función del tipo de tejido y del tipo de estrés inducido, en plantas de tabaco transgénicas. Los resultados comprobaron que la curcina encontrada en hojas de *J. curcas* L bajo diferentes condiciones de estrés es diferente a la que aparece en endospermo de semilla. Finalmente concluyen que la producción de curcina varía en función del tejido y tipo de estrés, lo que demuestra que esta especie tiene la capacidad de adaptarse y que esta RIP tiene funciones más extensas, como la de actuar como cofactor o factor de señalización en la regulación de la expresión.

En Tailandia, Kittikajhon y cols. (2009), establecieron un método de purificación de curcina y evaluaron su efecto antimicrobiano contra 31 cepas de bacterias y hongos patógenos a seres humanos. De sus resultados concluyen que la proteína aislada por medio de precipitación ácida fue curcina con peso molecular de 29 kDa y con actividad N-glicosidasa evaluada en ARNr mediante electroforesis en gel PAGE-urea bajo condiciones desnaturalizantes. Con la extracción ácida obtuvieron un rendimiento de $8.2 \times 10^{-4}\%$ de proteína parcialmente purificada, que inhibió el crecimiento de 11 cepas bacterianas siendo más evidente este efecto sobre *Staphylococcus epidermis* ATCC12228 y *Bacillus subtilis* ATCC6633 con una concentración mínima inhibitoria de 78.1 µg/mL para ambas cepas. Esto plantea el uso de pasta de semilla de *J. curcas* L como fuente natural de curcina con propiedades antimicrobianas.

El trabajo de tesis realizado en el Instituto Nacional de Tecnología de Rourkela en la India por Sandeep en 2011, evalúa y predice la estructura de la curcina y la orientación de la misma en su interacción con las proteínas receptoras del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y de la rapamicina en mamíferos (mTOR) mediante modelamiento computacional. Los estudios *in silico* realizados identifican las regiones de curcina que pueden interactuar con las proteínas evaluadas y permiten evidenciar la actividad antitumoral de esta enzima. Es de recalcar que este autor enfatiza la

necesidad de basar el modelamiento en estudios *in vivo* y/o clínicos, ya que lo que se presenta fue determinado con estudios de curcina bajo condiciones *in vitro*.

En 2012, Zhao y cols., establecen que las propiedades antitumorales de curcina son posiblemente debidas a la inducción de muerte celular por apoptosis. Su investigación indica que a concentraciones de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de curcina, se inhibió por arriba de un 40% el crecimiento de células de sarcoma-180 de ratón luego de siete días de tratamiento y medición de la viabilidad celular con la prueba de MTT. La evidencia de apoptosis fue obtenida mediante microscopia de fluorescencia con naranja de acridina en células tratadas con curcina y por citometría de flujo.

El efecto antitumoral *in vitro* de curcina recombinante fue estudiado por DanDan y cols. en 2012. En este trabajo se indujo la expresión de curcina en *E.coli* y se evaluaron sus efectos de inhibición en el crecimiento de células cancerígenas A549 (cáncer de pulmón), HepG2 (cáncer de hígado) y HeLa (cáncer cérvico-uterino), obteniendo valores de CI_{50} de 92.246 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 691.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y sin efecto significativo, respectivamente.

Los estudios del grupo de Lin, Zhao y de Zheng han mostrado que la curcina inhibe la proliferación de células tumorales y promueve la apoptosis en las mismas, lo que le permite ser un agente anticancerígeno. Sin embargo, esta citotoxicidad afecta por igual a células tumorales y normales, por lo que la búsqueda de portadores que puedan dirigir a la curcina hacia las células enfermas resulta un campo de estudio con alto potencial. En el trabajo de investigación realizado por Zheng y cols. (2013), se fusionaron las proteínas curcina y la TfRBP9 (péptido que se une al receptor de transferrina) en *E. coli*; sus resultados de inmunofluorescencia, citometría de flujo e inhibición celular mostraron que la inmunotoxina curcina-TfRBP9 tuvo mayor citotoxicidad en las células que sobrepresaron el receptor TfR que en las células normales, concluyendo que el péptido TfRBP9 aumentó de forma significativa y dirigida los efectos de curcina hacia las células tumorales HepG2; además concluyen que esta inmunotoxina indujo mayor porcentaje de células en apoptosis que la curcina sola (Zhen y col., 2013).

La curcina ha sido también conjugada con nanopartículas de oro previamente PEGiladas y unidas a folato y a un anticuerpo de transferrina con el objetivo de que sean de doble blanco hacia gliomas. La curcina presentó efectos tóxicos tales como presencia de especies reactivas de oxígeno y desestabilización de la mitocondria y del citoesqueleto en las células cancerígenas, mientras que la nanopartículas de oro tuvieron excelentes propiedades de ablación fototérmica, lo que permitió eliminar por completo y de forma precisa las colonias de cáncer (Mohamed y col., 2014).

2. Inmunotoxinas (ITs)

El uso de anticuerpos monoclonales (Mab) contra varias enfermedades, entre ellas el cáncer, ha extendido su uso de la fase experimental hacia la fase clínica debido a su éxito como terapias dirigidas; lo cual se debe a características muy especiales en estos productos como son los anticuerpos humanizados, los conjugados droga-anticuerpo (ADC) y las inmunotoxinas (ITs) (Pennel y col., 2002).

Las inmunotoxinas son agentes terapéuticos catalogadas como moléculas híbridas, ya que tienen en su conformación un agente selectivo celular y una sustancia tóxica de origen biológico, de tal forma que se conjugan en una sola molécula el efecto citotóxico y la especificidad. Una vez que el agente selectivo reconoce y se une a su receptor, la inmunotoxina es endocitada y transferida vía endosomas hacia el lisosoma o al aparato de Golgi. En este lugar se da la separación de la porción tóxica, por reacciones redox principalmente, para realizar entonces su efecto citotóxico específico (Figura 7) (Rustamzadeh y col., 2003; Choudhary y col., 2011; Teicher y col., 2011).

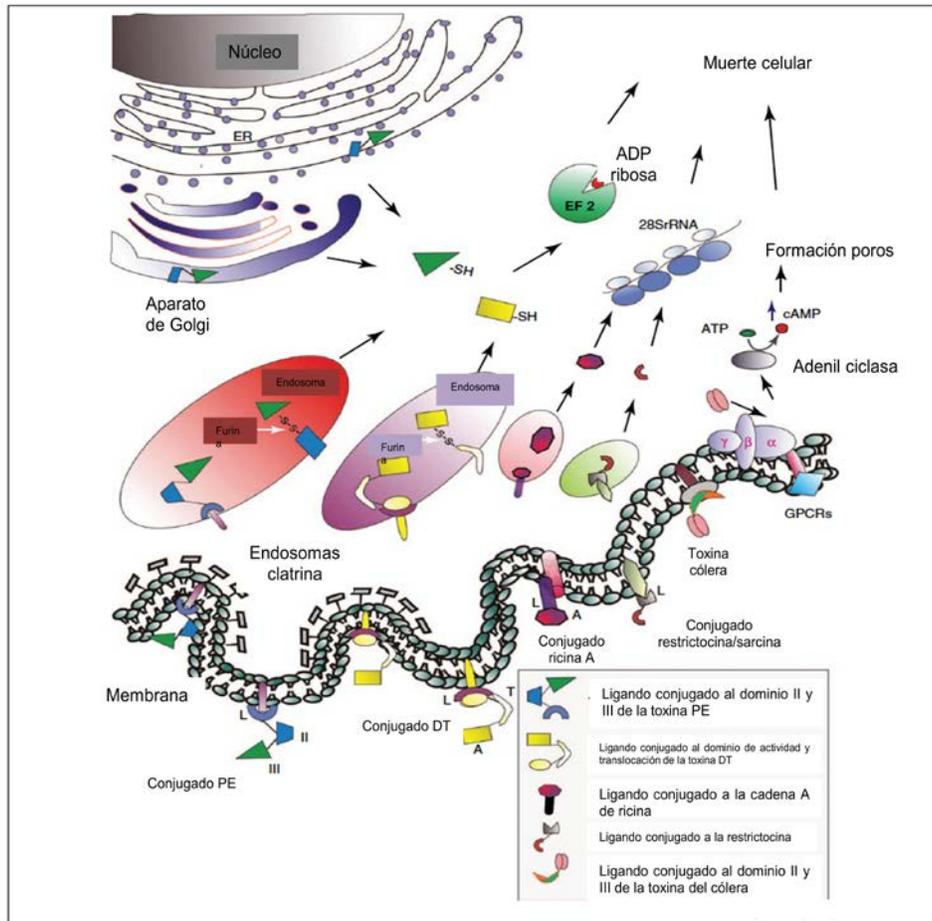


Figura 7. Mecanismo de acción de las ITs en la célula blanco. GPCRs: Receptores acoplados a proteína G (Choudhary y col., 2011).

El ligando que provee la acción selectiva y la propiedad de internalización puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo. Las toxinas pueden ser de origen bacteriano como la exotoxina de *Pseudomona* (PE) o la toxina de la difteria (DT), o de origen vegetal, tales como la ricina, saporina, gelonina, curcina, entre otras, cuya característica en común es que pertenecen a las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs).

El gran progreso de los anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de tumores se da por la identificación de blancos específicos en las células cancerígenas. El blanco molecular ideal debe cumplir varias características, entre las que destacan: (1) ser esencial en la patogénesis y/o progresión del tumor, (2) no ser esencial para el funcionamiento del órgano hospedero, (3) debe sobreexpresarse de forma estable y homogénea en las células tumorales, pero no en células normales, y (4) debe encontrarse en cantidad mínima en forma soluble para evitar su rápida eliminación.

Por otro lado, se deben cumplir las siguientes características generales: La inhibición de este blanco debe conducir a una respuesta clínica en los pacientes, se debe tener la capacidad de medir de forma reproducible el blanco o diana molecular en muestras clínicas y se debe contar con la capacidad de seleccionar pacientes con base en la presencia de la diana.

Las ventajas de las inmunotoxinas sobre la quimioterapia son la liberación selectiva de sustancias tóxicas a los tumores, reduciendo de esta manera la toxicidad sistémica y aumentando la potencia del ataque. Por otro lado, se ha establecido que una RIP puede inactivar 200 ribosomas/EF2 por minuto, de tal forma que una molécula de IT puede eliminar una célula tumoral mientras que un agente quimioterapéutico requiere cantidades del orden de 10^4 - 10^5 moléculas (Rustamzadeh y col., 2003; Choudhary y col., 2011).

Desde el punto de vista histórico, la evolución en la construcción de las ITs puede dividirse en tres etapas. La primera generación de inmunotoxinas, desarrollada hace 35 años, fue obtenida por acoplamiento químico entre toxinas intactas o con propiedades de especificidad atenuadas y anticuerpos monoclonales. Esta unión se realizó con ayuda de reactivos que permitieron la formación de puentes disulfuro o tioeter entre el anticuerpo y la RIP correspondiente. Aunque estas ITs provocaron la regresión de tumores de pacientes con linfoma, de forma general fueron ineficientes debido a que se presentó alta heterogeneidad en su composición, baja estabilidad, falta de ataque a tumores sólidos debido a su tamaño tan grande, pero sobretodo falta de especificidad (Bonomi, P.D. 2006; Pastan y col., 2007; Choudhary y col., 2011; Dosio y col., 2011).

Entre las RIPs que han sido conjugadas a anticuerpos monoclonales, y que se usaron en la primera generación de ITs, destacan la gelonina, saporina, proteína antiviral (PAP), briodina, momordina, diantina, momorcorchina, tricoquirina, lufina, restrictocina, α -sarcina, entre otras (Dosio y col., 2011).

A partir de que aparecieron estas primeras ITs, se llevaron a cabo estudios tanto bioquímicos como cristalográficos de las toxinas, lo cual evidenció la estructura y función

de las mismas y permitió establecer la presencia de dominios discretos y con diferentes funciones, lo cual dió origen a la segunda generación en el diseño y construcción de las ITs (Pastan y col., 2007).

Las ITs de segunda generación también fueron construidas mediante acoplamiento químico entre anticuerpos monoclonales y toxinas, pero estas últimas fueron modificadas en sus dominios de unión celular. Aunque estas nuevas ITs mejoraron en su especificidad, el problema de heterogeneidad persistió; ejemplo de RIPs que conformaron ITs de este tipo fueron la saporina, gelonina, PAP y la cadena A de la ricina deglicosilada (dgA) (Pastan y col., 2007; Choudhary y col., 2011).

La eliminación o modificación de dominios de unión celular en las sustancias tóxicas se ha aplicado ampliamente en las toxinas de origen bacteriano, en la de *Corynebacterium diphtheria* o de la difteria (DT) y en la exotoxina de *Pseudomonas aureginosa* (PE), provocando con ello la obtención de proteínas que sólo presentan el dominio catalítico y en algunos casos el de translocación, lo que ha permitido incrementar la especificidad hasta 10,000 veces (Dosio y col., 2011).

La RIP de origen vegetal que ha sido ampliamente manipulada es la ricina, y aunque en esta RIP tipo II se ha eliminado o se ha bloqueado la cadena B, el dominio de unión celular, no se ha eliminado del todo el problema de especificidad y toxicidad.

Las ITs de tercera generación se construyen mediante técnicas de ADN recombinante, lo que garantiza especificidad y penetración, reduciendo además el costo y la complejidad en su proceso de construcción. El dominio de la toxina que tiene la propiedad de unirse a la célula es removido genéticamente y la toxina así modificada es fusionada a un ligando o con elementos de ADN que codifican para la porción Fv de un anticuerpo determinado, de tal forma que la unión entre ambos componentes es mediante un enlace peptídico. Los fragmentos variables de la cadena pesada y de la cadena ligera del resto del anticuerpo se pueden unir genéticamente (scFv) o mediante uniones disulfuro (dsFv). Estas nuevas ITs presentan problemas de inmunogenicidad, toxicidad no específica e inestabilidad (Choudhary y col., 2011).

La mayoría de las ITs recombinantes que se tienen actualmente en estudios clínicos usan DT o PE, debido a que las toxinas bacterianas son mucho más fáciles de producir en *E. coli* que las toxinas de origen vegetal, además que han mostrado mayor actividad y menor cantidad de efectos secundarios en seres humanos (Dosio y col., 2011).

Dos nuevos tipos de ITs están emergiendo recientemente, las inmunotoxinas biespecíficas, donde se busca el ataque combinado y simultáneo a dos células diana o blanco, de tal manera que se incrementa la eficacia y la especificidad. El otro tipo está buscando moléculas citotóxicas de origen humano, como pueden ser las proteínas proapoptóticas o las RNAasas, con el objetivo de disminuir la inmunogenicidad (Choudhary y col., 2011).

La evaluación del efecto citotóxico de las ITs es analizado *in vitro* en líneas celulares tumorales que sobreexpresan los receptores del anticuerpo, mientras que *in vivo* se prueba en modelos de ratón con tumores positivos al receptor y con muestras de tumores de pacientes positivos. En la Tabla 3 se presenta una lista de inmunotoxinas que actualmente se encuentran en diferentes fases en estudios clínicos (Choudhary y col., 2011; Dosio y col., 2011).

De acuerdo a Barbieri y cols. (2000), aunque la RIP más usada para la construcción de ITs es la cadena A de la ricina, las RIPs tipo I presentan mayores ventajas para esta aplicación, entre éstas destacan el hecho de que son más estables, más simples y más seguras al realizar la preparación, y algunas veces generan conjugados más activos. En la Tabla 4 se listan las RIPs tipo I usadas en la preparación de ITs, destacando de todas ellas la saporina.

Tabla 3. Estatus de los estudios clínicos de algunas ITs (Bonomi, P.D. 2006; Choudhary y col., 2011; Dosio y col., 2011).

INMUNOTOXINA	ANTÍGENO	TOXINA	ENFERMEDAD	FASE CLÍNICA	COMPAÑÍA
ONTAK	IL-2R	DT	T-CLL, B-CLL, NHL	APROBADO	EISAI
BL22	CD22	PE	LEUCEMIA DE CÉLULAS PILOSAS, B-CLL, NHL	II	NCI
LMB-2	CD25	PE	NHL, LEUCEMIA	II	NCI
CAT-8015	CD22	PE	CLL, PLL, SLL	II	MEDIMMUNE
COMBOTOX	CD19/CD22	dgA	LEUCEMIAS	I	ABIOGEN
HuM-195/rGel	CD33	r-Geloina	LEUCEMIAS	I	TARGA THER.
MR1-1	EGFRvIII	PE	CÁNCER SÓLIDOS	I	IVAX CORP.
SS1P; CAT-5001	MESOTELINA	PE	CÁNCER SÓLIDOS	II	NCI
ZEMAB	HER-2	PE	CÁNCER MAMA	I	NOVARTIS
RFT-5dgA	IL-2R	dgA	LINFOMAS	II	UTSMC
CINTREDEKIN BESUDOTOX	IL13R	PE	CÁNCER MAMA	III	INSYS

DT: Toxina difteria; PE: Exotoxina *Pseudomonas*; dgA: Cadena A de la ricina deglicosilada; T-CLL: Leucemia linfocítica crónica células T; B-CLL: Leucemia linfocítica crónica células B; NHL: Linfoma no-Hodgkin; PLL: Leucemias proliferativas; SLL: Linfoma linfocítico; CLL: Leucemia linfocítica crónica.

Tabla 4. RIPs tipo I usadas en la construcción de ITs (Barbieri y col., 2000).

RIP de la cebada
Briodina (<i>Bryonia cretica</i>)
Diantina (<i>Dianthus caryophyllus</i>)
Gelonina (<i>Gelonium multiflorum</i>)
Lufina (<i>Luffa cylindrica</i>)
Momordina (<i>Momordica</i>)
Proteína antiviral de phitolaca (PAP) (<i>Phytolacca americana</i>)
Saporina (<i>Saponaria officinalis</i>)
Tricoquirina (<i>Trichosantes kirilowii</i>)
Tricosantina (<i>Trichosantes kirilowii</i>)

Hasta ahora, la mayoría de los éxitos clínicos con inmunotoxinas han sido obtenidos en el tratamiento de tumores hematológicos. Los obstáculos para tratar tumores sólidos incluyen la pobre penetración a la masa tumoral y el desencadenamiento de la respuesta inmune a la toxina (inmunogenicidad), lo cual limita el número de ciclos o tratamientos que puedan ser aplicados al paciente. Actualmente se están diseñando estrategias para superar estas limitaciones, tales como unir moléculas de polietilenglicol (PEG) o liposomas a la inmunotoxina, combinar el tratamiento con sustancias químicas que dañen los vasos sanguíneos alrededor del

tumor y se reduzca así la alta presión intersticial que impide la entrada de las ITs, remoción de epítopes en la porción tóxica de la IT (epítopes para células B y T), disminución del tamaño del anticuerpo, uso de anticuerpos humanizados o toxinas de origen humano, principalmente (Pennell y col., 2002; Bonomi, P.D. 2006; Shan y col., 2013).

2.1 Construcción química de las inmunotoxinas

En la unión de los componentes de una IT se debe asegurar que el enlace sea covalente y estable bajo condiciones *in vivo*, de tal forma que solo se rompa intracelularmente para asegurar que se regenera el agente activo y que su acción se presenta; además se deben construir con métodos simples y eficientes que no comprometan los sitios activos tanto del anticuerpo como de la enzima tóxica (Barbieri y col., 2000; Fakas y col., 2010; Dosio y col., 2011).

En la mayoría de las técnicas para construir inmunotoxinas por síntesis química se requiere que el Mab y la RIP sean derivatizados con reactivos bifuncionales que actúen como conectores entre ambos componentes, y que además cumplan con el objetivo de introducir grupos funcionales idóneos para formar un enlace disulfuro o uno tioeter entre ellos, además de que actúen como espaciadores entre las moléculas y mejoren el arreglo y disponibilidad espacial entre estos grupos. Las técnicas de unión requieren primero la inserción de un grupo tiol libre sobre una proteína (RIP) y segundo, la modificación de la proteína portadora (Mab) para introducir un grupo que reaccione selectivamente con estos tioles. En la mayoría de los casos, los reactivos que introducen grupos tiol reaccionan con los grupos amino, formando uniones amida o amidina. Los grupos amino son reactivos, abundantes y generalmente es posible modificar algunos de ellos sin disminuir la actividad biológica de la proteína (Barbieri y col., 2000; Farkas y col., 2010).

Hasta el día de hoy no se cuenta con un método de modificación universal para proteínas, por lo que se han desarrollado diferentes protocolos de derivatización, la mayoría basados en la formación de enlaces covalentes. Como es bien sabido, la reactividad química de las proteínas depende de los aminoácidos presentes en sus

cadenas laterales, de los residuos en su porción amino y carboxiterminal, y de su conformación tridimensional. En este sentido, las cadenas laterales cruciales para inducir reacciones químicas son el grupo γ -carboxil del ácido glutámico, el grupo β -carboxil del ácido aspártico, el grupo tiol de la cisteína y el grupo ε -amino de la lisina, todos ellos con alto poder nucleofílico (Farkas y col., 2010; Dosio y col., 2011).

En la Figura 8 se muestran algunos compuestos conectores que se han usado en la construcción de ITs; entre ellos destaca el SPDP (N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato), el cual reacciona con los residuos amina (del grupo amino terminal y de las lisinas) de la proteína, de tal forma que es insertado un grupo disulfuro reactivo. Este grupo disulfuro puede entonces reaccionar con un grupo tiol presente en el otro componente de la IT, el cual puede ser introducido a la molécula con el compuesto 2-iminotiolano, o generado mediante reducción de enlaces disulfuro internos con 1,4-disufanilbutanoi-2,3-diol o N,N'-dimetil-N,N'-bis(mercaptoacetil)hidrazina. Si alguna de las proteínas ya cuenta dentro de su estructura con grupos sulfhidrilo, ya no será necesario derivatizarla (Farkas y col., 2010; Dosio y col., 2011).

Otros entrecruzadores son el SATA (S-(N-succinimidil)tioacetato) y el SMPT ((N-succinimidiloxicarbonil)-1-metil-1-(2-piridilditio) tolueno) que insertan grupos sulfhidrilo y disulfuro respectivamente, mientras que el SMCC (N-succinimidil 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato) y el MBS (m-maleimido-benzoil N-hidroxisuccinimida ester) introducen enlaces tioéter entre las partes que unen. Con el objetivo de mantener la carga positiva de grupos lisil en la RIP derivatizada, y por lo tanto preservar su potencia, se usan reactivos como el 2-IT (2-iminotiolano). Los procedimientos usuales enfatizan la derivatización del Mab con SDPT y de la RIP con 2-IT, de tal forma que el conjugado se genere mediante una reacción de intercambio tiol-disulfuro (Barbieri y col., 2000; Dosio y col., 2011).

Otro aspecto que se considera para mantener la estabilidad de la IT *in vivo* es el uso de reactivos de entrecruzamiento de gran volumen estérico alrededor de las uniones disulfuro, lo cual garantiza la protección de este enlace de un posible ataque nucleofílico (Dosio y col., 2011).

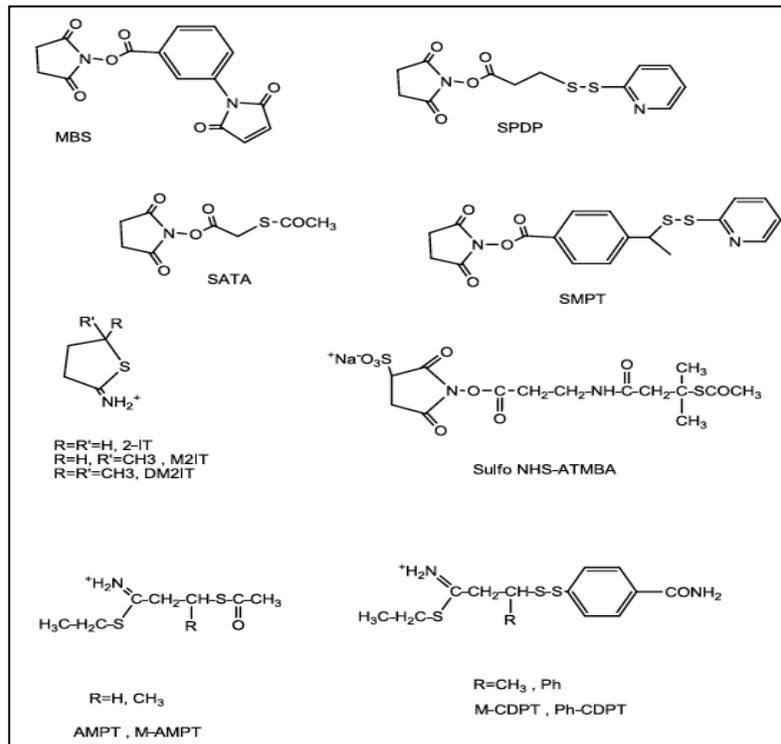


Figura 8. Estructura química de entrecruzadores heterobifuncionales usados en la derivatización de los componentes de las ITs.

MBS: Ácido; 3-maleimidobenzoico ester N-hidroxisuccinimida; SPDP: N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato; SATA: S-(N-succinimidil) tioacetato; SMPT: N-succinimidiloxycarbonil)-1-metil-1-(2-piridilditio) tolueno; 2-IT: 2-iminotiolano; SULFO NHS-ATMBA: sulfosuccinimidil N-(3-(acetiltio)-3-metilbutiril-beta-alanina; AMPT/M-AMPT: Tioimidatos. (Dosio y col., 2011).

La modificación de proteínas, ya sea Mab o RIP o el conjugado, usualmente genera una mezcla de especies, tanto por el sitio de modificación como por el número de grupos introducidos; es evidente que es de gran importancia conocer el grado de modificación con el fin de maximizar el rendimiento de las especies conjugadas deseadas. Es por esto que en los protocolos se plantea seguir paso a paso la metodología y mantener la relación molar entre Mab:RIP para asegurar los grados de derivatización y por lo tanto alcanzar el mayor rendimiento de IT (Barbieri y col., 2000).

Respecto a la RIP, esta debe ser previamente extraída y purificada, por lo que se debe seleccionar la especie vegetal e identificar perfectamente el órgano que la presenta. Las operaciones generales de extracción consisten en la homogenización del tejido, la extracción de la RIP por algún tipo de precipitación, seguida de centrifugación, diálisis y cromatografía en columna para obtenerla lo más pura posible. Finalmente se deben realizar la mayor cantidad de pruebas de identificación de la RIP en cuestión, lo

que incluye determinaciones de parámetros fisicoquímicos, pero sobretodo de actividad enzimática, resaltando en este caso la actividad N-glicosidasa y la inhibición de la síntesis proteica (Barbieri y col., 1997; Girbés, 2000).

Resulta claro que es necesario verificar la actividad biológica del Mab y de la RIP de forma individual, pero sobretodo cuando ya están unidas en la inmunotoxina. Por último se debe analizar la actividad de la IT bajo condiciones *in vitro* y/o *in vivo* (Girbés, 2000).

El gran inconveniente de la conjugación de proteínas mediante entrecruzadores es la necesidad de derivatizar ambas moléculas, lo que provoca heterogeneidad en los productos y posibilidad de la pérdida de actividad en estas proteínas, es por esto que la búsqueda de técnicas de unión entre el Mab y la RIP de forma directa resulta muy prometedora.

2.1.1 Construcción de inmunotoxinas via aminación reductiva

Los carbohidratos, las glicoproteínas y la mayoría de los anticuerpos pueden ser activados para su conjugación mediante la oxidación de grupos hidroxilo vicinales con periodato. Esta reacción genera de forma muy eficiente grupos aldehídos reactivos para su subsecuente unión con moléculas conteniendo grupos amino vía aminación reductiva.

La aminación reductiva es uno de los métodos más populares para la preparación de glicoconjugados, especialmente a partir de monosacáridos y oligosacáridos no protegidos. Los grupos aldehído y cetona reaccionan con aminas, hidracinas, hidracidas u oximas, para formar iminas inestables o bases de Schiff, bajo condiciones de pH alcalino. Estos intermediarios relativamente lábiles son estabilizados por reducción a aminas secundarias vía cianoborohidruro de sodio o borohidruro de sodio, siendo el primero el más recomendable debido a su especificidad para reducir bases de Schiff y no grupos aldehídos. El mecanismo de la reacción involucra la condensación de los grupos carbonilo y amino para formar una carbinolamina seguida por una deshidratación

y formación de un ion imino que es reducido a un grupo amina (Figura 9) (Baxter y col., 2004; Farkas y col., 2010).

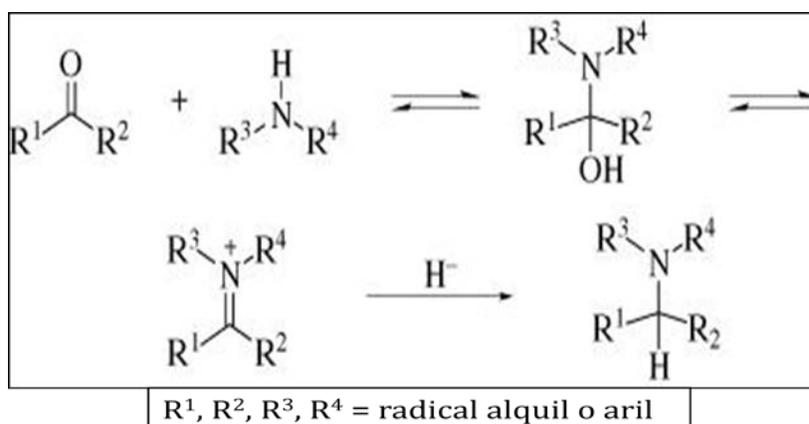


Figura 9. Reacción “aminación reductiva” o “alquilación reductiva”, que permite la formación de enlaces nitrógeno-carbono-hidrógeno (Baxter y col., 2004).

Una forma de oxidar selectivamente a los monosacáridos es regulando la concentración del periodato de sodio en el medio de reacción. Se plantea que en presencia de 1 mM de este compuesto, sólo los ácidos siálicos son oxidados en sus grupos hidroxilo adyacentes, generando así dos moléculas de formaldehído y un grupo aldehído saliente. Mientras que concentraciones iguales o mayores a 10 mM pueden oxidar el resto de los azúcares en sus grupos hidroxilo vicinales. El uso de periodato de sodio requiere condiciones de obscuridad para evitar la hidrólisis de este compuesto, y tiempos de reacción entre 15 y 30 minutos para evitar pérdida de la actividad de las proteínas involucradas en la oxidación.

Cabe recalcar que el pH afecta la eficiencia del entrecruzamiento y el tamaño del conjugado anticuerpo-enzima formado. A pH fisiológico la formación de la base de Schiff es más lenta y se forman conjugados de bajo peso molecular, sin embargo, a pH alcalino (de 9 a 10), la velocidad de la reacción es más rápida, con alta eficiencia y con conjugados de mayor peso molecular por la mayor incorporación de enzima al anticuerpo.

Este tipo de conjugación, llamada de largo cero, tiene como gran ventaja que no se introducen agentes entrecruzadores en ninguno de las proteínas que se unen, sin

embargo presenta como desventaja que se puede presentar impedimento estérico para separar los componentes de la IT (Figura 10) (Hermanson, T.G. 2013).

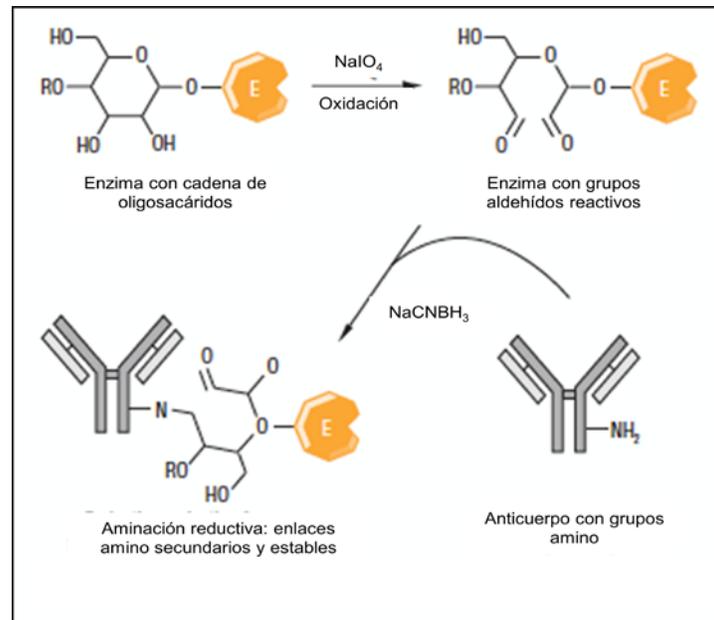


Figura 10. Conjugación anticuerpo-enzima mediante aminación reductiva (Hermanson, T.G. 2013).

2.2 Ejemplos de inmunotoxinas obtenidas por conjugación química

Aún cuando la evolución en la construcción de ITs ha llevado al uso de técnicas de ADN recombinante, la generación de estas moléculas híbridas mediante conjugación química se ha mantenido desde mediados de los años 80s. En la Tabla 5 se resumen algunas de las ITs obtenidas por unión química entre la toxina y el Mab en estos años. Entre los puntos a resaltar de este resumen se pueden mencionar: (a) El hecho del amplio uso de las RIPs como porción tóxica, destacando la ricina, la saporina y la gelonina; (b) el cambio de tipo de anticuerpos, al pasar de anticuerpos murinos obtenidos de fluido ascítico o hibridomas a anticuerpos humanizados y (c) el uso del entrecruzador SPDP (N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato). En este último punto cabe señalar que aún cuando la unión de proteínas mediante el agente heterobifuncional SPDP es relativamente fácil, los enlaces disulfuro que unen a la RIP con el anticuerpo en cuestión son muy lábiles y se presentan en forma azarosa con la consecuencia de inducir variabilidad en los efectos e inmunogenicidad.

Tabla 5. Inmunotoxinas obtenidas por conjugación química.

ENFERMEDAD	TOXINA	MAB	COMPUESTO ENTRECruzADOR	TOXICIDAD	AÑO (REF)
CÁNCER MAMA	RICINA A	85 MABs	SPDP	CI ₅₀ < 10 nM en algunas líneas	1985 (9)
MELANOMA	GELONINA	9.2.27	SPDP	CI ₅₀ 1-3 X 10 ⁻¹¹ M	1987(94)
LEUCEMIA MIELOIDE	GELONINA	M195	SPDP	CI ₅₀ 400 Y 15 pM	1994(21)
MIELOMA MÚLTIPLE	SAPORINA	B-B2, B-B4	2-IT	CI ₅₀ 1 Y 0.1 nM	1996 (104)
MELANOMA	MOSCATINA	Ng76	SPDP/2-IT	CI ₅₀ 0.04 nM	2003 (106)
CÁNCER PULMÓN	TOXINA HEMOLÍTICA	IOR EGF/R3	SPDP	Toxicidad diferencial	2007(3)
CÁNCER PROSTATA	SAPORINA	hj591	SPDP	2 x 10 ⁻⁹ a 1.4 X 10 ⁻¹⁰	2010(47)
PATOLOGÍAS SNC	RICINA A	ANTI-AQP1	SPDP	CI ₅₀ 1.81 µg/mL	2011(92)
VASCULATURA TUMORAL	DOLASTATINA	F8 Y KSF	NaIO ₄		2012 (110)
GnRH-R	ABRINA A	F1G4/A9E4	SMPT		2013 (30)
MELANOMA	NIGRINA B	MJ7/18	SPDP	CI ₅₀ 4.2 X 10 ⁻⁹ M	2013(65)

MAB: Anticuerpo monoclonal; SPDP: N-succinimidil 3-2(piridilditio) propionato; 2-IT: 2-iminotiolano; NaIO₄: Periodato de sodio; SMPT: N-(succinimidiloxicarbonil)-1-metil-1-(2-piridilditio) tolueno.

3. Cáncer de mama

Cáncer es el nombre genérico que se le da a un grupo de más de 100 enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y la propagación de células anormales, llegando incluso hasta la muerte. Este flagelo es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) que generan una serie de mutaciones que alteran las funciones de las oncoproteínas, promueven la proliferación celular e impiden la respuesta a señales proapoptóticas (American Cancer Society, 2011).

En México, la Secretaría de Salud (SSA) reporta que del egreso hospitalario por cáncer en 2008, la leucemia tuvo mayor presencia (8.7%), seguida del cáncer de mama (5.8%), de cuello de útero (3.3%) y ovario (2.1%). La leucemia afectó principalmente a los hombres (15.1%), mientras que el cáncer de mama a las mujeres (8.4%) (INEGI, 2011).

En nuestro país, la tasa de defunción por tumores tiende a aumentar; de 1998 a 2008, la tasa general de mortalidad por cáncer pasó de 57.7 a 66.6 por cada 100 mil habitantes; entre las mujeres, el crecimiento fue de 59.6 a 66.7 por cada 100 mil habitantes, mientras que entre los hombres, de 55.6 a 66.5 por cada 100 mil habitantes (INEGI, 2011).

El cáncer de mama es una neoplasia que se genera en los tejidos de la mama, por lo general en los conductos o los lobulillos. Se puede presentar tanto en los hombres como en las mujeres, aunque el cáncer de mama masculino es raro (National Cancer Institute, 2011).

A pesar de los avances en la detección temprana y el entendimiento de las bases moleculares del cáncer de mama, esta enfermedad sigue siendo la primer causa de muerte en México desde 2006 (Figura 11), es por esto que se buscan tratamientos más efectivos y con menos efectos secundarios. Las nuevas terapias consideran las características moleculares y clínicas de cada tumor, de tal forma que se incluyen agentes citotóxicos, hormonales e inmunoterapéuticos específicos a cada tipo o paciente (Knaul y col., 2009).

El cáncer de mama puede clasificarse en función a diferentes características (por su origen en ductal o lobular, por sus rasgos anatomopatológicos), sin embargo para fines de esta investigación sólo se considerará la división respecto a los receptores presentes en la superficie celular.

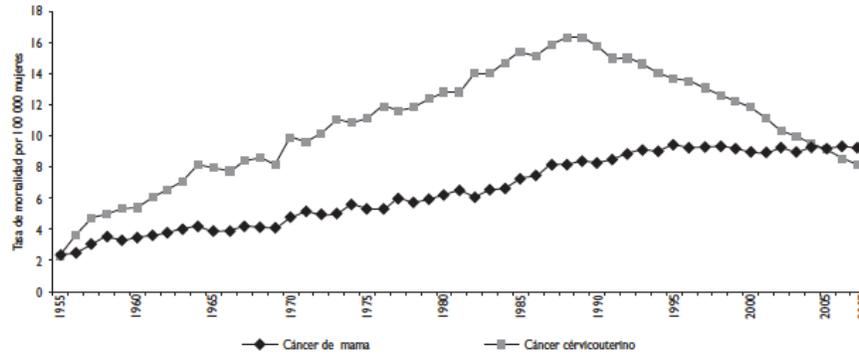


Figura 11. Mortalidad por cáncer de mama y cáncer cérvico-uterino, tasa por 100,000 mujeres ajustada por edad. México 1955-2007 (Knaul y col., 2009).

Los receptores más importantes que están presentes en las células mamarias y que influyen en la sintomatología y tratamiento de este tipo de cáncer son: 1) Receptor de estrógenos (RE), 2) Receptor de progesterona (RP) y 3) Receptor Her2/neu (Her2). Las células que presentan alguno de estos receptores se les coloca un signo positivo mientras que las que no lo tienen llevan un signo negativo: RE+, RE-, RP+, RP-, Her2+ y Her2-. Aquellas células que no tienen ninguno de estos receptores se denominan basales o triple negativas. El tipo de receptor presente en la glándula mamaria determina la sensibilidad a estrógenos, progesterona, Her2 o ninguno de estos, y de esta forma se pueden dar tratamientos que bloqueen la acción específica de alguno de ellos. Actualmente, la evaluación del tipo de receptores presentes en un cáncer de mama se ha convertido en una evaluación crítica e imprescindible para determinar el tipo e idoneidad de tratamientos específicos, por ejemplo tamoxifeno y/o trastuzumab.

Los estudios clínicos han demostrado que aproximadamente 30% de las pacientes con cáncer de mama sobreexpresan el receptor Her2/neu o son Her2+; aunque hay que señalar que este receptor también se encuentra amplificado en los cánceres de ovario, endometrial, gástrico, próstata, vejiga y pulmón (Cao y col., 2013).

Esta diferencia en expresión de Her2 entre células normales y cancerígenas, y debido a que juega un papel central en la transformación y crecimiento de células anormales, determinan que Her2 sea un blanco molecular ideal para terapias dirigidas (Qiu y col., 2008; Cao y col., 2009).

Her2/neu se refiere a un oncogen que ayuda a que las células crezcan, se dividan y se autoreparen. Cuando las células tienen demasiadas copias de este gen se multiplican rápidamente. Los expertos han concluido que las mujeres con cáncer de mama positivo para Her2 tienen una enfermedad más agresiva con alta tendencia a la metástasis, tienen una mayor resistencia a los tratamientos convencionales de quimioterapia, y con un riesgo mayor de recurrencia que aquellas que no tienen este tipo de cáncer (Mahmud y col., 2009; Álvarez, 2010, Cao y col., 2013).

Sin embargo, el cáncer de mama Her2+ responde a los medicamentos tales como el anticuerpo monoclonal trastuzumab (en combinación con la quimioterapia convencional) lo que ha mejorado el pronóstico significativamente. Por otro lado, el hecho de que este receptor es muy específico a este tipo de células tumorales lo hace un blanco terapéutico con gran potencial para el desarrollo de inmunotoxinas.

3.1 El receptor Her2

Los sistemas de transducción de señales son esenciales para la viabilidad de organismos pluricelulares, en los que existe una especialización de funciones ejecutadas de forma precisa y regulada. Estos mecanismos de comunicación celular juegan un papel fundamental en la regulación de procesos como proliferación, diferenciación, apoptosis, ciclo celular y angiogénesis, que finalmente aseguran la homeostasis de los tejidos y se relacionan directamente con la carcinogénesis (Lodish y col., 2000).

La activación de los sistemas de transducción esta regulada por moléculas extracelulares tales como factores de crecimiento, citocinas y hormonas, y los genes que codifican las proteínas implicadas en las vías de transducción de señales se designan como “protooncogenes”.

Uno de estos sistemas de transducción de señales es la familia de receptores de factores de crecimiento epidermal o EGFR. Esta familia está formada por cuatro subtipos, EGFR (ErbB-1,HER1), HER2/neu (ErbB-2), HER 3 (ErbB-3) y HER 4 (ErbB-4), que se caracterizan por ser glicoproteínas transmembranales con actividad tirosina quinasa y constituidas por tres dominios con diferentes funciones. Un dominio

extracelular N-terminal que reconoce y se une a sus ligando para activar el receptor, un dominio transmembranal que atraviesa la membrana citoplasmática, y el dominio C-terminal intracelular que tiene los sitios de fosforilación y que alberga la maquinaria de la actividad tirosinquinasa.

La unión de determinados ligandos a cada receptor desencadena una serie de respuestas celulares que eventualmente llevan a la proliferación celular (Tabla 6). Estas “vías intracelulares” son ahora el área principal de investigación en oncología ya que ellos participan en varios sistemas moleculares y mecanismos de carcinogénesis y progresión tumoral (Álvarez, 2010; Lahera y col., 2010).

Tabla 6. Familia de receptores de factor de crecimiento epidérmico: Componentes y ligandos (Lahera y col., 2010).

RECEPTOR DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	LIGANDOS
EGFR (ErbB1/HER)	EGF, TGF- α , Amfiregulina, β -celulina, Epiregulina, HB-EGF, Neuregulina
HER2	Desconocido
HER3	Neuregulina
HER4	β -celulina, Epiregulina, HB-EGF, Neuregulina

EGF: Factor de crecimiento epidérmico; TGF- α : Factor de crecimiento transformante alfa; HB-EGF: Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina.

La fosforilación de los residuos de tirosina del receptor desencadenan una cascada de señales moleculares a nivel intracelular involucradas con la división y diferenciación celular, entre las que destacan la vía Ras/MAPK (proteín-quinasas activadas por mitógenos), imprescindible para la proliferación celular, la vía PI3K o fosfatidil inositol 3 quinasa, la cual genera señales de supervivencia celular y previene la apoptosis. Otras rutas activadas son la STATs (transductores de señales y activadores de la transcripción), la fosfolipasa C gamma (PLC- γ 1) y la c-Jun N terminal quinasa (JNK), las cuales están involucradas en procesos de resistencia a apoptosis, migración celular y proliferación y transformación celular respectivamente (Figura 12) (Álvarez, 2010; Lahera y col., 2010).

Si bien el principal mecanismo que provoca la dimerización, y por tanto la activación de los EGFR es la unión del ligando, existen otras condiciones que pueden

provocar la activación, como son:

1. El incremento en la expresión del receptor: El aumento en la expresión es debido a la amplificación de genes o alteraciones transcripcionales. Este aumento del receptor en la superficie celular favorece la colisión azarosa entre moléculas y se favorece su activación. Los niveles de fosforilación son muy altos, lo cual provoca una saturación de la actividad fosfatasa celular.
2. Activación de receptores tirosina quinasas por alteraciones moleculares, como mutaciones puntuales y troncales.

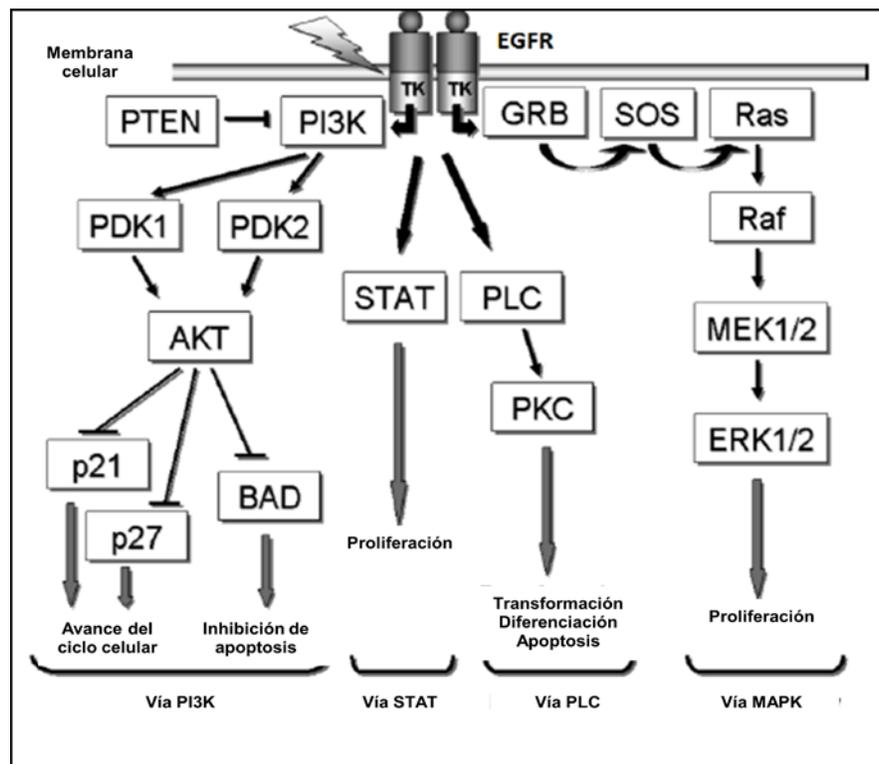


Figura 12. Señales de transducción dependientes de los receptores de factores de crecimiento epidermal (Fernández y col., 2006).

En ausencia de ligandos y de las dos condiciones anteriores, los receptores EGF residen en la membrana de la célula de forma inactiva, distribuidos uniformemente por su superficie y con muy pocas probabilidades de encontrarse de forma aleatoria. En cualquier caso, cuando se encuentran en la superficie celular por azar tienen la capacidad de transfosforilarse, la cual se ve rápidamente inhibida por la actividad fosfatasa basal de la célula.

El proto-oncogen HER2/neu, también llamado ErbB-2/neu, se localiza en el cromosoma 17q y codifica para una glicoproteína cinasa transmembranal de 185 kDa (p185) compuesta por 1255 aminoácidos, y llamada receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano, Her2, ErbB2, c-erbB2 o Her2/neu. Esta proteína fue descubierta en 1985 y como miembro de la familia de los receptores de los factores de crecimiento epidérmico (EGFR) interviene en procesos de transducción de señales de diferenciación, adhesión y motilidad celular. El hecho de que Her2 no presente un ligando específico para su dimerización (Tabla 6), y que sea capaz de acoplarse a sí mismo o a cualquiera de los otros receptores, provoca que sea un receptor con alto poder de inducir tumoración (Qiu y col., 2008; Cao y col., 2009).

3.2 Inmunotoxinas contra el receptor Her2

Entre las terapias dirigidas a tumores que expresan altos niveles de Her2 con resultados prometedores resaltan el anticuerpo monoclonal humanizado Trastuzumab o Herceptin (Genentech), y el inhibidor Gefitinib o Iressa (AstraZeneca), sin embargo presentan el inconveniente de tener efectos secundarios, como la generación de resistencia e incluso pacientes que no han respondido a estos tratamientos (Cao y col., 2009)

Varios intentos terapéuticos se han desarrollado para atacar células Her2+ y disminuir los daños colaterales, entre los que destacan el uso de anticuerpos monoclonales (anti-Her2) humanizados, sólo o conjugados con toxinas o con proteínas apoptóticas, sin embargo, se siguen reportando efectos secundarios tales como alergias, problemas en pulmones y de infusión en la fase clínica, debido principalmente a la naturaleza no humana de los componentes utilizados en las ITs (Qiu y col., 2008).

La estrategia más prometedora para tratar tumores Her2+ es combinar anticuerpos monoclonales específicos a esta proteína con sustancias altamente tóxicas (RIPs, PE o DT o proapoptóticas), ya sea por conjugación química o por técnicas de ADN recombinante.

En 1985 Bjorn y cols. conjugaron 85 anticuerpos monoclonales que reconocían antígenos específicos al cáncer de mama con la cadena A de la ricina mediante unión química con SPDP. Al determinar la citotoxicidad de las inmunotoxinas resultantes, encontraron que 5 de ellas fueron tóxicas a la línea celular SK-BR-3 (Her2+) a concentración igual o menor a 20 nM, y no presentaron toxicidad en fibroblastos humanos. Estos resultados les permitieron obtener la patente número 5,169,774 del año 1992 y con el título “Monoclonal anti-human breast cancer antibodies”.

Tecce y cols. (1993) construyeron dos inmunotoxinas dirigidas a dos diferentes epítopes de la región extracelular del receptor Her2, unidos por conjugación química con la RIP saporina 6. Ambas ITs tuvieron CI_{50} menores a 1 nM en la línea Her2+ SKBR-3, sin embargo requirieron tiempos de incubación de 36 a 60 h. El análisis de la internalización de estas ITs por inmunomicroscopía, determinó que son las últimas fases de la endocitosis las que determinaron la lentitud de la cinética citotóxica de estas ITs (Di Lazzaro y col., 1994).

La inmunotoxina BACH-250/rGel, formada por la unión química con SPDP del anticuerpo quimérico anti Her2/neu llamado BACH-250 con la RIP gelonina, mostró una citotoxicidad potente y específica contra células tumorales humanas Her2+ en cultivo y contra modelos xenográficos del tumor SKOV-3 en ratones. El valor de CI_{50} fue de 17 ng/mL y se aumentó la sobrevivencia de 30 a 60 días en los ratones tratados con la IT (Rosenblum y col., 1999). En el año 2005 la continuación de los trabajos realizados por Rosenblum y Shawver permitieron obtener la patente número US 2005/0163774 A1, referente a “Immunotoxins directed against C-ERBB-2(HER-2/NEU) related surface antigens”.

Debido a que la inmunotoxina recombinante ERB-38, construida mediante fusión de la porción Fv del Mab murino e23 y la exotoxina de *Pseudomonas* PE38, presentó valores de CI_{50} muy bajos (0.2 a 4 ng/mL) en varias líneas celulares Her2+, y causó completa remisión en ratones desnudos con cáncer de mama (MCF-7), con valores de DL_{50} de 450 μ g/kg, se decidió evaluarla clínicamente en 1999 en un estudio fase I en 5 pacientes con cáncer de mama y uno con cáncer esofágico. En este ensayo no se obtuvieron respuestas positivas, pero si se presentó hepatotoxicidad en todos los

pacientes. Estos autores concluyen que esto se debió a la presencia del receptor Her2 en los hepatocitos, y que esto es de esperarse en cualquier tipo de IT dirigida a este blanco debido a que también se encuentra en los tejidos normales (Pai-Scherf y col. 1999).

Una forma de revertir el efecto negativo de inmunotoxinas de gran tamaño y por lo tanto la dificultad en el proceso de introducción y difusión de las mismas en los tumores sólidos es mediante el uso de porciones de anticuerpos monoclonales; el grupo de trabajo de Marks ha obtenido la parte svFv de un anticuerpo proveniente de un fago y con alta afinidad a Her2. Este anti-Her2/neu scFv se designó como C6.5 y fue usado por McCall y colaboradores para construir y caracterizar un anticuerpo biespecífico entre C6.5 y el svFv anti-CD16, sus resultados mostraron alta citotoxicidad en células tumorales y tumores (McCall y col., 1999).

La IT ScFv(FRP5)-ETA construida por la porción scFv del Mab humanizado FRP5 fusionado a la exotoxina de *Pseudomonas* PE38 y dirigida al antígeno erbB2, fue reportada en el 2003 en un estudio clínico fase I. La aplicación de esta IT a 11 pacientes con cánceres de mama, colorectal y melanoma por inyección intratumoral en lesiones cutáneas en dosis diarias de 60 a 900 μg durante 7 a 10 días, resultó en 4 personas con remisión completa y 3 con remisión parcial. Las reacciones adversas fueron síntomas de dolor e inflamación en las zonas de inyección y fueron totalmente reversibles (Azemar y col., 2003). Otro estudio clínico de esta misma IT reportado en 2005, aplicado a 18 pacientes con diferentes tipos de cánceres sólidos Her2+, demostró que la terapia sistémica con esta IT es segura a dosis de 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, ya que a pesar de que ningún paciente presentó remisión tampoco tuvieron efectos secundarios (von Minckwitz y col., 2005).

Una variación reciente de IT, llamada inmuno-tbid, dirigida contra tumores Her2+ fue construida por Qiu y cols. (2008). Mediante fusión de la región variable del anticuerpo monoclonal e23 de ratón, con alta afinidad de unión al dominio extracelular de la proteína Her2, con el dominio de translocación de la exotoxina A de *Pseudomonas* y con una región de la proteína BID (tBID), la cual pertenece a la familia Bcl-2 y cuyo

dominio BH3 proapoptótico induce muerte celular por la liberación de factores tales como citocromo c, factor inductor de apoptosis y procaspasa 9 por parte de la mitocondria, generaron una IT de alta toxicidad; la proteína BID es reconocida como un factor de unión entre la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis y se ha planteado como una estrategia eficiente para matar células tumorales. Sus resultados mostraron un reconocimiento selectivo de líneas celulares Her2+ (SRBR-3 y SKOV-3), una alta eficiencia de translocación e inducción de su muerte celular mediante apoptosis mediada por la mitocondria bajo condiciones *in vitro*, con valores de 80% y 40% de muerte celular respectivamente. Mientras que en los ratones se observó disminución del tamaño del tumor y mayor sobrevivencia con respecto al control.

Este trabajo demuestra que el uso de proteínas inductoras de apoptosis y anticuerpos específicos asegura una respuesta selectiva y con alto efecto en la eliminación de las células atacadas, lo que representa una alternativa más para terapias dirigidas exitosas.

Ya se ha mencionado que las ITs constituidas por toxinas de bacterias o plantas presentan el inconveniente de inducir inmunogenicidad, por lo que algunos autores han planteado el uso de proteínas proapoptóticas de origen humano para revertir este inconveniente. Con este antecedente Mahmud y cols. (2009) construyeron una IT recombinante entre el factor de inducción de apoptosis (AIF) y el anticuerpo scFv(FRP5) específico para Her2, llamada 5-E-AIF_{Δ100}. El AIF es una proteína que interviene en la muerte celular programada independiente de caspasa en células dañadas o estresadas.

Esta IT mostró capacidad para unirse selectivamente a las células Her2+ y para internalizarse y acumularse en vesículas intracelulares; la acción citotóxica de esta IT sólo se presentó cuando se agregó cloroquina (reactivo endosomolítico) en el medio de incubación.

Para determinar el efecto del tipo de anticuerpo y el tipo de unión en una IT en su especificidad y citotoxicidad, Cao y cols. (2009) evaluaron los anticuerpos e23 (murino) y C6.5 (humano) unidos a la RIP gelonina recombinante (rGel) mediante tres diferentes péptidos, en células tumorales Her2+ y Her2-. Entre las conclusiones más relevantes

destacan que el anticuerpo humano C6.5 tuvo una afinidad y especificidad comparable a la del anticuerpo murino e23, por lo que es un candidato efectivo como molécula de reconocimiento en la IT.

Respecto a los resultados con los diferentes entrecruzadores concluyen que la incorporación de furina como endoproteasa dentro de la estructura de los péptidos de unión entre el anticuerpo y la gelonina mejora la separación entre estas dos moléculas, pero no implicó una citotoxicidad mayor comparada con la IT con el linker sin furina. Así mismo concluyen que la IT construída con el linker sin furina fue la que presentó mayor estabilidad en plasma y mayor actividad contra xenografías de tumores establecidos. Finalmente se establece que la estabilidad enzimática del linker que une a la RIP con el anticuerpo puede afectar seriamente la farmacocinética de la inmunotoxina y puede entonces determinar la eficacia de la misma tanto *in vitro* como *in vivo*.

En el 2014, este mismo de trabajo evaluó la eficacia de inmunotoxinas mono y bivalente, generadas tanto por acoplamiento químico como por ADN recombinante. En esta ocasión el anticuerpo bivalente fue el Herceptin y el monovalente fue su scFv llamado 4D5, mientras que la toxina fue la rGelonina. En sus resultados observaron que todas las ITs mostraron afinidad similar al receptor Her2, pero diferentes actividades antitumorales; El conjugado bivalente Herceptin/rGel y el monovalente con la orientación rGel/4D5 fueron superiores al 4D5/rGel; *in vitro* con valores de CI_{50} de 0.1 a 1 nM e *in vivo* con la inhibición del tumor. Esta mejor respuesta se atribuyó a la mejor entrada de estas ITs a la célula blanco y a la velocidad en el desencadenamiento de la vía de señalización correspondiente. Por otro lado, concluyen que los conjugados construídos por ingeniería genética son competitivos comparados con los generados por medio de reacciones químicas (Cao y col., 2014).

Una IT dirigida al receptor Her2 fue evaluada en cáncer gástrico por Zhou y cols. (2010). En este caso se unió mediante la molécula entrecruzadora SPDP, 1 mol de la cadena A de la ricina y 1 mol del Mab de ratón HER-2; la IT anti-p185^{HER-2}-RTA se unió de manera selectiva a la línea celular SGC7901-Her-2+ e inhibió su crecimiento, lo cual se incrementó cuando se combinó con el compuesto 5-fluorouracilo. Este efecto se pudo

relacionar con la activación de caspasa-9 y caspasa-3, y por lo tanto con la inducción de apoptosis.

En la Tabla 7 se presentan inmunotoxinas que se han desarrollado y que están actualmente bajo evaluación.

Tabla 7. Inmunotoxinas desarrolladas para terapias dirigidas al receptor Her2/neu (Adaptado de Cao y col., 2013).

ORIGEN TOXINA	TOXINA	MAB anti-Her2	TIPO CONJUGACIÓN	TIPO CÁNCER	AÑO
Planta	Gelonina	Mab humanizado	Química	Ovario	1999
		scFv humano	Recombinante	Ovario	2009
				Mama	2012
	Saporina	Mab murino	Química	Mama Melanoma	1994 1993
		Mab murino	Puente indirecto	Ovario	2002
	Ricina	Mab murino	Química	Mama	1999,2000,1994,1991,1992
				Ovario	1993,1998
				Gástrico	2010
		Fab' murino	Química	Pulmón	1993
Bacteria	PE	scFv murino	Recombinante	Ovario	2001,1992
				Epidérmico	2007,1995
				Próstata	1999,2001
				Pulmón	1996,1996
				Gástrico	1992,1996,1994,1996
		Mama	1998,1995,		
		dsFv murino	Recombinante	Gástrico	1996,2002
				Epidérmico	1994
		Mama	1994		
	(dsFv) ₂ bivalente murino	Recombinante	Epidérmico	1998,1999	
	scFv (anti-Her2 y anti EGFR) biespecífico murino	Recombinante	Epidérmico	1996	
	Fab' humanizado	Química-liposoma	Mama	2009,2008	
	Mab humanizado	Puente indirecto	Epidérmico	2007	
DT	scFv (anti-Her2 y anti-EpCAM) biespecífico murino	Recombinante	Colon	2007	
Enterotoxina estafilococcus	Mab murino	Química	Colon	1995	
	scFv humano	Recombinante	Mama	2006	
Toxina Bacillus Cyt2Aa1	scFv humano	Recombinante	Mama	2003	

Mab: Anticuerpo monoclonal; PE: exotoxina de *Pseudomonas*; DT: Toxina diftérica; Cyt2Aal: Toxina Cyt2Aal de *B. thuringiensis*; scFv: Fragmento variable de cadena simple; Fab': Fragmento de unión al anticuerpo; dsFv: Fragmento variable disulfuro; (dsFv)₂: Fragmento variable disulfuro bivalente; EGFR: Receptor de factor de crecimiento epidermal.

II. JUSTIFICACIÓN

Las inmunotoxinas representan una herramienta biomédica prometedora para eliminar células dañinas, neoplásicas, inmunocompetentes o parasitarias. Sin embargo, su aplicación se enfrenta a una serie de problemas de diferente índole, entre los que destacan los relacionados con la proteína tóxica y los métodos de unión entre ambos componentes de estas moléculas híbridas.

Las RIPs son una alternativa viable para conformar la porción tóxica de estas moléculas, sin embargo se requiere de un estudio detallado de las características de estas proteínas, que permitan identificar su estructura química, su actividad citotóxica y antitumoral y las condiciones bajo las cuales son producidas en la planta de origen.

Los estudios realizados con curcina de la especie *Jatropha curcas* L han demostrado su efecto inhibitorio en el crecimiento de líneas celulares cancerígenas, e incluso se reconoce ampliamente el efecto citotóxico, antitumoral y antimicrobiano de los extractos y frutos de esta especie por sobre otras RIPs.

Con estos antecedentes y el hecho de la sobreexplotación que se está haciendo de esta especie para la producción de biodiesel, es posible pensar en una evaluación de las características y la citotoxicidad de curcina que permitan considerarla como una alternativa en la construcción de inmunotoxinas.

Considerando al componente de especificidad de la IT por construir, se propone aprovechar las características de la proteína Her2, entre las que destacan la de sobreexpresarse en el 25-30% de los cánceres de mama, la de ser un blanco terapéutico que ya ha generado resultados prometedores en otras terapias dirigidas y la de que se cuenta con anticuerpos monoclonales anti-Her2 de varias características en el mercado.

Respecto a la unión de estas proteínas se propone la conjugación mediante aminación reductiva, previa oxidación de los azúcares presentes en curcina, con lo cual se aprovecharan los grupos funcionales de curcina (hidroxilos en azúcares) y del anti-Her2 (ϵ -amino en lisinas de la porción Fc). Aún cuando esta inmunotoxina será de largo cero presentará como principal ventaja la de no derivatizar a las proteínas, por lo que los sitios activos tanto de la enzima curcina como del anticuerpo monoclonal contra Her2 no perderán su actividad.

III. HIPÓTESIS

Si la curcina aislada de semillas de *Jatropha curcas* L tiene efectos citotóxicos sobre líneas celulares cancerígenas, una inmunotoxina constituida por esta enzima y un anticuerpo monoclonal dirigido a un receptor específico tendrá un efecto citotóxico mayor sobre células neoplásicas.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad citotóxica de la proteína curcina aislada de semillas de *Jatropha curcas* L, y construir una inmunotoxina dirigida a líneas celulares de cáncer de mama Her2+ usando un anticuerpo monoclonal Anti-Her2.

Objetivos Específicos

ETAPA I: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CURCINA

1. Obtener información medicinal, coleccionar e identificar taxonómicamente el material vegetal de *Jatropha curcas* L.
2. Identificar a la proteína curcina aislada de semillas de *Jatropha curcas* L mediante peso molecular, punto isoeléctrico y secuenciación.
3. Evaluar la actividad N-glicosidasa de curcina aislada de semillas de *Jatropha curcas* L sobre ARN.

ETAPA II: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE CURCINA

4. Evaluar la actividad citotóxica de curcina en líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 (Her2-) y SK-BR-3 (Her2+), y fibroblastos como células sanas.

ETAPA III: CONSTRUCCIÓN DE LA INMUNOTOXINA (curcina:anti-Her2) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD CITOTÓXICA

5. Construir una inmunotoxina dirigida a Her2 mediante conjugación química por aminación reductiva entre los grupos carbonilo de curcina y los grupos ϵ -amino presentes en el anticuerpo monoclonal anti-Her2.

6. Evaluar el efecto citotóxico de la inmunotoxina curcina:anti-Her2 en líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 (Her2-) y SK-BR-3 (Her2+), y fibroblastos como células sanas.

V. METODOLOGÍA

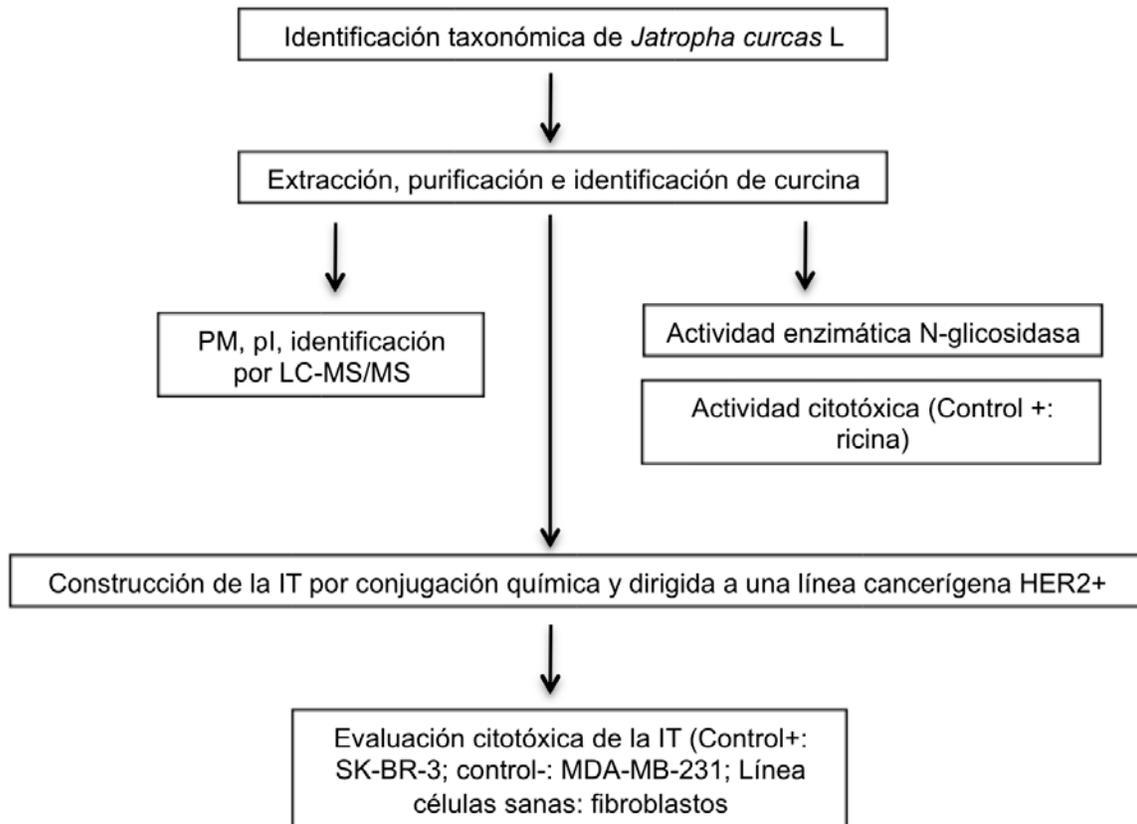


Figura 13. Estrategia experimental para la obtención de la inmunotoxina (IT) curcuma:anti-Her2.

ETAPA I: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CURCINA

1. Material biológico

1.1 Obtención de harina de semillas de *J. curcas* L

A partir de harina de semillas de *J. curcas* L se aisló la proteína curcuma. Las semillas fueron colectadas como frutos completos en el municipio Xicotepec de Juárez en el Estado de Puebla. Los frutos fueron transportados en condiciones de baja humedad en bolsas de papel y clasificadas cualitativamente (color) de acuerdo a su estado de maduración.

En el laboratorio se procedió a la obtención de las semillas de forma manual, para lo cual los frutos fueron abiertos y las semillas se obtuvieron, se secaron al sol para eliminar la mayor cantidad posible de humedad externa y fueron guardadas en bolsas de papel y oscuridad.

Tanto semillas, como plantas completas y frutos colectados fueron identificados taxonómicamente en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM.

Para la obtención de harina se molieron semillas maduras sin testa en mortero con mano y/o molino manual y se tamizaron en coladera metálica. La harina se desgrasó con hexano en una proporción 1:7 (p/v) durante 24 h en agitación continua a 4°C; se eliminó el solvente por filtración y el polvo se secó al aire en campana de extracción durante dos días. La harina fue guardada en recipientes de plástico y oscuridad para su posterior uso (Stirpe y col., 1976).

1.2 Anticuerpo monoclonal anti-Her2 (ErbB2/Her2)

El anticuerpo contra Her2 fue adquirido en R&D Systems con número de catálogo MAB1129. Este anticuerpo monoclonal de ratón pertenece al tipo IgG_{2B} con número de clon 191924.

Este anticuerpo se obtuvo de la línea celular de mieloma de ratón NS0 derivada del receptor ErbB2/Her2 humano Thr23-Thr552 recombinante con número de accession P04626. La IgG resultante fue purificada del sobrenadante del cultivo del hibridoma mediante cromatografía de afinidad en columna de Proteína A o G, y liofilizada a partir de su disolución en PBS filtrada con filtros de 0.2 µm. El anti-Her2 detecta el receptor ErbB2/Her2 humano en análisis de ELISA y Western blot, y no genera reacción cruzada con el resto de receptores de la familia Her (EGFR, rhErbB3 y rhErbB4).

2. Obtención de extracto proteico

Todo el proceso de extracción proteica se realizó a temperaturas entre 4°C y 7°C; la harina de semilla de *J. curcas* L desgrasada se mezcló con solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 con NaCl a concentración de 0.15 M, en una proporción 1:3 p/v. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 24 h a 4°C y se centrifugó durante 30 minutos a 11,000 rpm y 4°C. El sobrenadante se dializó contra solución amortiguadora de acetato de sodio 0.1 M y pH de 4.5 durante 24 h a 4°C con cambios cada 6 h y agitación continua.

Se colectó el sobrenadante por centrifugación durante 30 min a 4°C y 11,000 rpm, el cual se codificó como extracto T/A y se mantuvo a -80°C (Kittikajhon y col., 2009).

3. Purificación de curcina

La purificación de curcina se realizó mediante dos cromatografías de intercambio catiónico, la primera con el polímero sulfopropil-sepharosa (SP-Sepharosa) para el extracto T/A, y la segunda con carboximetil-sepharosa (CM-Sepharosa) para la fracción de curcina cruda, ambas seguidas de diálisis y ultrafiltración con membrana de 10 kDa en equipo Amicon modelo 8050 de 50 mL.

Las suspensiones de SP-Sepharosa y CM-Sepharosa se mezclaron con 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 para desgasificarlas durante 1 h bajo condiciones de vacío y agitación constante. Las suspensiones se vertieron en columnas Bio-Rad de 1x50 cm con chaqueta de enfriamiento, cuidando de mantener un flujo continuo de agua a 7°C. La columna de SP-Sepharosa se lavó secuencialmente con un volumen de hidróxido de sodio 0.5 M, un volumen de solución amortiguadora de fosfato de sodio 500 mM pH 6.67 y finalmente con veinte volúmenes de solución amortiguadora de acetato de sodio 10 mM, pH 4.5. La columna de CM-Sepharosa se lavó y equilibró con solución amortiguadora de fosfatos 5 mM pH 7.0 y 1.0 M de NaCl. Todas las cromatografías se realizaron con velocidad de flujo de 3 mL por minuto y se colectaron fracciones de 1.5 mL.

10 mL del extracto T/A se inyectaron en la columna de SP-Sepharosa y fueron secuencialmente eluidos con 10 volúmenes de solución amortiguadora de acetato de

sodio 10 mM pH 4.5 o hasta que la absorbancia a 280 nm del líquido efluente fue menor a 0.1, se continuó con un volumen de solución amortiguadora de fosfato de sodio 5 mM pH 7.0 y finalmente con 3 volúmenes de solución amortiguadora de fosfato de sodio 5 mM pH 7.0 conteniendo 1 M de NaCl. En esta última solución eluyente se obtuvieron fracciones de 1.5 mL, donde se monitoreó la presencia de proteínas mediante absorbancia a 280 nm y por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE).

Las fracciones con los picos de mayor absorbancia, que además presentaron la banda característica de curcina (aproximadamente 30 kDa) en los geles SDS-PAGE, fueron dializadas contra cien volúmenes de solución amortiguadora de fosfato de sodio 5 mM pH 7.0 durante 24 h a 4°C, agitación continua y con cambios cada 6 h. Finalmente la muestra con curcina cruda se centrifugó durante 30 min a 11,000 rpm y 4°C, almacenando el sobrenadante a -80°C.

Las fracciones de curcina cruda se inyectaron en la columna de CM-Sepharosa lavada con la solución de equilibrio. La elución se realizó de forma multietapa con 1 volumen de solución amortiguadora con gradientes de cloruro de sodio de 0.3M, 0.6M y 1.0 M. Se determinó la absorbancia a 280 nm de las fracciones colectadas y el peso molecular por SDS-PAGE en geles al 12% en condiciones reductoras. Las fracciones positivas para curcina se dializaron contra agua destilada a 4°C, con agitación continua y cambios cada 6 h.

Las fracciones se concentraron mediante ultrafiltración con membrana 10 kDa con un equipo Amicon modelo 8050 y con una presión de 60 kg/cm². Finalmente fueron liofilizadas y/o almacenadas a -80°C (Barbieri y col., 2000).

3.1 Caracterización fisicoquímica e identificación de curcina

La presencia de curcina durante su purificación se verificó mediante SDS-PAGE en geles al 12% bajo condiciones reductoras, teñidos con azul de Coomassie al 0.25% o con nitrato de plata, con un peso molecular cercano a 30 kDa (Sigma-Aldrich, ProteoSilverTM Silver Stain Kit) (Lin y col., 2010).

El contenido de proteína se determinó mediante el método de ácido bicinconínico (BCA) (Sigma Aldrich, BCA1) usando albúmina sérica bovina como estándar (BSA). Se tomó 1.0 mg de curcina liofilizada disuelta en 100 μ L de PBS pH 7.2 o 100 μ L de curcina sin liofilizar, se agregaron 2.0 mL de la solución de trabajo de BCA (50 partes de solución de ácido bicinconínico con carbonato de sodio, tartrato de sodio y bicarbonato de sodio con 1 parte de solución de sulfato de cobre pentahidratado al 4%) y se agitó durante 30 seg. Las mezclas de reacción se incubaron a 60°C durante 15 min para luego dejar enfriar a temperatura ambiente y realizar la medición de absorbancia a 562 nm. La concentración proteica se determinó con la curva patrón obtenida con concentraciones de 200 a 1000 μ g/mL de BSA (Technical Bulletin BCA protein assay kit, SIGMA).

El peso molecular y punto isoelectrico de la curcina purificada se obtuvo mediante espectroscopía de masas.

La presencia de azúcares en curcina fue determinada de dos maneras, por vía analítica mediante el método de Dubois (Dubois y col., 1956), y por vía electroforética por determinación de la presencia de azúcares en geles SDS-PAGE.

En el análisis de azúcares por el método de Dubois, a un mililitro de la muestra de curcina purificada disuelta en PBS 1X se le agregaron 500 μ L de fenol al 5% y 2.5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, se mezclaron perfectamente con vortex y se dejó en reposo 15 min, para luego colocar en baño María a 30°C durante 15 min. Se determinó la absorbancia a 492 nm y se estableció la concentración de azúcares mediante el uso de una curva patrón con glucosa como solución estándar.

La glicosilación de la curcina se determinó con el kit PierceTM Glycoprotein Staining (Thermo Scientific, USA). Gel de poliacrilamida 12% con curcina separada fue fijado durante 30 min con 100 mL de metanol al 50%. El gel se lavó en dos ocasiones con 100 mL de solución de ácido acético al 3%, para luego agregar 25 mL de la solución oxidante y agitar durante 15 min. Se lavó el gel en tres ocasiones con 100 mL de ácido

acético al 3% cada una, y se transfirió a 25 mL del reactivo de tinción de glicoproteínas donde se mantuvo en agitación durante 15 min. El gel se transfirió a 25 mL de solución reductora durante 5 min y finalmente se lavó exhaustivamente con ácido acético al 3% y con agua pura. La presencia de azúcares en las proteínas se evidenció por la aparición de bandas color magenta en el peso molecular correspondiente a la curcina (aproximadamente 30 kDa).

La curcina fue identificada mediante cromatografía líquida acoplada a espectroscopía de masas en tándem (LC-MS/MS), para lo cual se tomaron como muestras para análisis las bandas de curcina obtenidas en SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie. Estas muestras fueron reducidas con ditioneitol (DTT), alquiladas con iodoacetamida y digeridas "in gel" con tripsina. Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS constituido de un cromatógrafo líquido de micro-flujo Accela (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) con "splitter" (1/20) y un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fischer Co., San Jose, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro fue realizado con una solución (Calmix) de 10 moléculas calibrantes, que permite determinaciones con exactitudes menores a 5 ppm (partes/millón). En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un sistema gradiente de 10-100% de solvente B (acetonitrilo/ácido acético 0.1%) en 120 min sobre una columna capilar PicoFrit Proteopep 2 C18 75 μ m ID \times 50 mm (New Objective Inc., Woburn, MA). El flujo del sistema LC fue de 400 nL/min. Para la fragmentación de los péptidos se utilizaron los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High energy Collision Dissociation) donde solamente los iones con carga 2⁺ y 3⁺ fueron seleccionados para los eventos de fragmentación. Fueron desconsiderados los iones con cargas 1⁺, superiores a 4⁺ y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones segundo las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 40 ms y tiempo máximo de inyección de 10 ms por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizada la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 15 s y (iii) tiempo de exclusión de 60 s. Los datos espectrométricos

fueron sometidos a la búsqueda contra PDB de UniProt de *Jatropha curcas* a través del programa Proteome Discoverer 1.4.

3.2 Determinación de actividad N-glicosidasa de curcina

La actividad N-glicosidasa de curcina se determinó en ARN extraído de embriones de semillas de *J. curcas* L con el reactivo TRIzol y de acuerdo a la metodología planteada por Li y cols. (2005). Se tomaron 50 mg de embriones de *J. curcas* L y se pulverizaron en presencia de nitrógeno líquido, se agregaron 500 μ L de solución amortiguadora de extracción (100 mM Tris pH 8.0, 150 mM LiCl, 50 mM EDTA, 1.5% SDS, 1.5% 2-mercaptoetanol) y se homogenizó por inversión. Se agregaron 500 μ L de solución fenol:cloroformo (1:1), se agitó a velocidad máxima durante 5 min y se centrifugó durante 15 min a 4°C y 13,000 rpm. Se tomó la fase acuosa y se mezcló durante 5 min con 500 μ L de TRIzol, se agregaron 200 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó 5 min, se separó el sobrenadante mediante centrifugación durante 15 min a 4°C y 13,000 rpm, a éste se le agregaron 300 μ l de alcohol isopropílico congelado y 30 μ L de NaCl 1.2 M frío, se mantuvo en reposo durante 90 min en congelación. Pasado este tiempo se centrifugó durante 15 min a 4°C y 13,000 rpm, para eliminar por decantación el sobrenadante cuidando de no perder el botón formado en la base del tubo eppendorf. El botón se disolvió con 400 μ l de etanol al 70% congelado y se centrifugó en las condiciones antes señaladas, se eliminó el sobrenadante y se seco el exceso de líquido sobre una toalla de papel. Se agregaron 30 μ L de agua destilada estéril para disolver perfectamente el botón de ARN extraído. Para verificar la integridad, pureza y cantidad del ARN obtenido, se corrieron muestras en geles de agarosa 1.2% y se determinaron las absorbancias a 230, 260, y 280 nm, y se obtuvieron las razones 260/280 y 260/230.

100 μ g de ARN (DO>1.5) se incubaron con 1 μ g de curcina o 0.006 μ g de RTA (cadena A de la ricina) en solución amortiguadora (10 mM Tris-HCl pH 7.4/60 mM KCl/10 mM MgCl₂) a 37°C durante 30 min y en un volumen final de 100 μ L. La reacción se detuvo con 150 μ L de SDS al 0.5%, y el ARN fue nuevamente extraído con TRIzol, cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), alcohol isopropílico y precipitado con etanol al 70%.

El botón de ARN se disolvió con 20 μ L de agua destilada estéril y se dividió en dos porciones iguales. Una de estas porciones se incubó durante 30 min con 10 μ L de solución recién preparada de anilina acetato 1M pH 4.5 en baño de hielo, para finalmente reprecipitar el ARN con etanol al 70% frío y centrifugar en las condiciones ya mencionadas, el botón obtenido se redisolvió con 30 μ L de agua destilada estéril. Las muestras de ARN tratada y no tratada con anilina fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. El gel fue teñido con bromuro de etidio y las bandas de ARN se visualizaron en equipo transiluminador UV (Endo y col., 1988; Tumer y col., 1997).

ETAPA II: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE CURCINA

4. Evaluación *in vitro* del efecto citotóxico de curcina y de la inmunotoxina curcina:anti-Her2

4.1 Activación, propagación y mantenimiento de las líneas celulares

La prueba de citotoxicidad de curcina y de la inmunotoxina curcina:anti-Her2 se realizó en las líneas celulares cancerígenas MDA-MB-231 (Her2-) y SK-BR-3 (Her2+), y en fibroblastos de prepucio humano (BJ (ATCC CRL-2522)) como tejido sano.

La línea MDA-MB-231 fue proporcionada por la Dra. Cynthia Ordaz de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, y los fibroblastos por el Dr. Julio Reyes del CIBIOR-IMSS (Metepéc, Puebla) ; ambos cultivos se mantuvieron en el medio de cultivo Dulbecco's modificado por Eagle (DMEM), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) y 1% de solución de antibiótico-antimicótico (Sulfato de estreptomycin y penicilina G sódica). Mientras que la línea SK-BR-3, obtenida de ATCC con número de catálogo HTB-30, fue mantenida en el medio McCoy 5A y suplementada de igual manera con SFB (10%) y con solución de antibiótico-antimicótico (1%).

Las líneas celulares se descongelan a 37°C en baño María, se concentraron mediante centrifugación a 1,100 rpm y 25°C durante 5 min, para lo cual se vertieron en

tubos falcon con 2.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos 1X y 2.5 mL de medio de cultivo suplementado (DMEM o McCoy 5A).

Ambos cultivos se mantuvieron en forma de monocapa en botellas de cultivo de 25 cm² (Corning Co.) con resiembras cada tercer día e incubados a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% en condiciones de humedad constante.

La confluencia y la morfología de los cultivos se verificó diariamente mediante observación microscópica para determinar el tiempo adecuado de propagación. Células confluentes en más del 90% y con buena apariencia morfológica fueron despegadas con 2 mL de solución de tripsina al 0.1% en verseno durante dos o tres minutos, concentradas por centrifugación en las condiciones antes mencionadas y propagadas en botellas de cultivo.

El conteo de células se realizó en cámara de Neubauer, con diluciones 1:1 de la suspensión del cultivo celular y azul de tripano (0.4% en PBS 1X).

4.2 Pruebas de citotoxicidad mediante la técnica de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolium)

Las células, previamente activadas, propagadas y contabilizadas, fueron sembradas en placas de 96 pozos en concentraciones de 8,000 células/pozo y por triplicado para las distintas concentraciones probadas y para cada repetición independiente.

Los controles usados para realizar los cálculos de viabilidad celular fueron células con medio de cultivo, medio de cultivo sin células, y el medio de cultivo con células y PBS. Para efectos de comparación se planteó usar a la cadena A de la ricina (RTA) como control positivo respecto a curcina, y a la curcina bloqueada y al anti-Her2 como controles negativos para la inmunotoxina.

Las concentraciones evaluadas para curcina fueron 0.00, 3.12, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 y 200.00 µg/mL, mientras que para la inmunotoxina curcina:anti-

Her2 fueron 0.00, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50 y 25.00 $\mu\text{g/mL}$. Cabe aclarar que antes de hacer las diluciones correspondientes a cada concentración, tanto la curcina como la inmunotoxina disueltas en medio de cultivo DMEM o McCoy 5A, fueron esterilizadas por filtración con membranas de nylon de 0.22 μm en condiciones de esterilidad.

Una vez que las células fueron confluentes, se incubaron durante 24 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2 con las diferentes concentraciones de curcina, inmunotoxina o los controles, se retiró el medio líquido mediante succión y se lavaron los pozos con 100 μL /pozo de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2. Se agregaron 100 μL /pozo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolium) en concentración 0.025% en medio DMEM o McCoy 5A sin suplementar. Los cultivos se incubaron bajo las mismas condiciones durante 4 h más, el reactivo se retiró por decantación y se agregarán 100 μL de DMSO por pozo. La lectura de absorbancia se realizó en el espectrofotómetro de placas a 595 nm. El porcentaje de viabilidad se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{DO tratamiento}/\text{DO testigo}) * 100$$

4.3 Cálculo de la CI_{50}

Se calculó el valor de CI_{50} mediante una regresión no lineal entre el porcentaje de viabilidad y el logaritmo de la concentración de curcina, RTA, curcina bloqueada, anti-Her2 o inmunotoxina con el paquete estadístico GraphPad versión 5.0.

Se determinaron las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos evaluados mediante un análisis de varianza con un valor de significancia del 5%.

ETAPA III: CONSTRUCCIÓN DE LA INMUNOTOXINA (curcina:anti-Her2) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD CITOTÓXICA

5. Obtención de anticuerpos contra curcina

Conejos New Zealand fueron inmunizados con 1 mg de curcina disuelta en 1 mL de PBS 1X, dosificada en 3 dosis de 0.4, 0.3 y 0.3 mL, respectivamente. En la primera inmunización, 0.4 mL de la solución de curcina fue emulsificada con 3 mL de adyuvante de Freund completo (Sigma Aldrich Co.) y administrada por vía subcutánea en 6 puntos del lomo del conejo. La segunda inmunización se aplicó en el día 8 con 0.3 mL de la solución de curcina emulsificada con 3 mL de adyuvante de Freund incompleto (Sigma Aldrich Co.) por vía subcutánea. En el día 15 se aplicó la tercera inmunización con el resto de la solución de curcina más 3 mL de solución inyectable por vía intramuscular. Siete días después de esta última inmunización, el conejo fue anestesiado con pentobarbital, y el suero fue obtenido a partir de la sangre extraída mediante punción cardíaca y almacenado a -70°C .

El anti-curcina fue purificado por cromatografía de afinidad en columna de Proteína A en agarosa. Brevemente, la columna fue lavada con solución PBS hasta que la absorbancia a 280 nm fue menor o igual a 0.1, se agregaron 9 mL de suero de conejo inmunizado con curcina y se permitió el paso de este suero por la columna 3 veces, durante el último pase esta se selló y se mantuvo en refrigeración durante 40 min. Pasado este tiempo, la columna se lavó con solución PBS hasta absorbancia a 280 nm menor o igual a 0.1, y posteriormente se eluyó con solución de ácido acético 0.8 M, fracciones de 2.0 mL se colectaron en tubos de ensaye con 200 μL de solución de Tris 0.2 M pH 8.5. Las fracciones con altas lecturas de absorbancia fueron dializadas contra 100 volúmenes de solución PBS a 4°C y con cambios cada 6 h.

Las fracciones positivas de anti-curcina fueron evidenciadas por absorbancia a 280 nm, por SDS-PAGE en geles del 10% no reductor y por análisis de Western blot usando curcina como antígeno y anti-IgG de conejo peroxidado como anticuerpo secundario.

6. Modelación *in silico* de curcina

Para determinar la posición y disponibilidad de los azúcares presentes en la molécula de curcina, se modeló la accesión ACO53803.1 del banco de datos de

proteínas (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ACO53803.1), con ayuda del software I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). La calidad del modelo 3D de curcina fue verificada por inspección de la gráfica de Ramachandran obtenida a partir de PROCHECK (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK>). El mejor modelo predicho se glicosiló en las asparaginas 266 y 274 con el software <http://www.glycosciences.de/modeling/sweet2/>, de acuerdo al reporte de Lin y col. en 2003. Para lo cual se construyó y se colocó el oligosacárido GlcNAc2Man3Xyl (Daubenfeld y col., 2005) en el software GlyProt (<http://www.glycosciences.de/modeling/glyprot/php/main.php>). Finalmente se generó el modelo más estable minimizando la energía del mismo con el software MOE (http://www.chemcomp.com/MOE-Molecular_Modeling_and_Simulations).

7. Oxidación de curcina con periodato de sodio (NaIO₄)

La curcina liofilizada se disolvió en solución amortiguadora de carbonato/bicarbonato 0.1 M pH 9.5, se agregó solución de periodato de sodio (NaIO₄); se incubó la mezcla, se detuvo la reacción de oxidación con etilenglicol 0.16 M y se dializó 24 h contra 50 volúmenes de la solución amortiguadora de carbonato/bicarbonato con cambios cada 6 h. La solución se concentró con tubos de ultrafiltración de 10 kDa mediante centrifugación.

Se determinó el contenido de proteína en la solución de curcina oxidada con ácido bicinconínico, el peso molecular mediante SDS-PAGE en geles del 12% y la presencia de grupos aldehídos con la prueba de Tollens.

8. Aminación reductiva de curcina oxidada con anti-Her2

El anti-Her2 se disolvió en solución amortiguadora de carbonato/bicarbonato 0.1 M pH 9.5, se agregó gota a gota el volumen de curcina oxidada y se permitió la reacción de aminación entre estas dos proteínas durante 180 min a temperatura ambiente. Para reducir la base de Schiff formada se agregó cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃). La purificación de la inmunotoxina inició con una ultrafiltración por centrifugación con filtros Amicon de 30 kDa, seguida de cromatografía de exclusión molecular con sephadex G-

200 con PBS 1X como solución de elución; las fracciones positivas para proteína de acuerdo a absorbancia y peso molecular mayor a 150 kDa en SDS-PAGE 10% no reductor, se concentraron mediante ultrafiltración con filtros de 100 kDa.

9. Análisis de la inmunotoxina curcina:anti-Her2

La inmunotoxina se analizó mediante SDS-PAGE en geles al 10% bajo condiciones no reductoras; la conjugación entre ambas proteínas se analizó por Western blot con anticuerpos contra curcina (anti-curcina), anticuerpos contra IgG de ratón y de conejo peroxidados (anti-IgG peroxidado); el reconocimiento del receptor Her2 en células cancerígenas por parte de la inmunotoxina se evidenció mediante inmunocitoquímica.

9.1 Inmunodetección de curcina e inmunotoxina

La transferencia de la curcina o inmunotoxina a láminas de nitrocelulosa (tamaño de poro 0.45 mm, Bio-Rad, USA) se realizó durante 45 min a 400 mA. Las proteínas transferidas se visualizaron para su identificación y corte con Rojo de Ponceau, una vez colocado cada carril en el canal correspondiente, se lavaron con solución de PBS-Tween (PBS-T). Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con leche descremada al 10% o con solución de albúmina de suero bovina (BSA) al 1% durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo primario, anti-curcina o anti-IgG peroxidado, fue preparado en la dilución correspondiente con PBS-T y fue colocado en el carril apropiado para incubar toda la noche a 4°C. En el caso de anti-curcina, se usó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo peroxidado durante toda la noche en la dilución adecuada. Finalmente, la presencia del antígeno fue revelada a través de la reacción entre 4-Cloro-1-naftol y el peróxido de hidrógeno mediada por la enzima peroxidasa presente en el anti-IgG. La reacción de revelado fue parada con PBS-T. Cabe aclarar que entre cada cambio de anticuerpo o soluciones, las membranas fueron lavadas con PBS-T.

9.2 Inmunocitoquímica en líneas celulares cancerígenas

Células de las líneas MDA-MB-231 y SK-BR-3 se sembraron en cajas de cultivo de 24 pozos con cubreobjetos de vidrio estériles, se incubaron durante 48 h con el medio de cultivo correspondiente (DMEM o McCoy 5A) suplementado y en condiciones de 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ y humedad constante. Células en buen estado de desarrollo morfológico y confluentes se fijaron con 500 µL de paraformaldehído al 2% en PBS-T durante 30 min a 37°C. Pasado este tiempo, se eliminó el formaldehído y se lavaron las células con PBS-T. Se permeabilizaron con 200 µL de Triton al 0.5% en PBS-T durante un min. Los cultivos se bloquearon con 500 µL de leche descremada al 6% durante toda la noche a 4°C. La solución de bloqueo se eliminó y se lavaron las células con PBS-T. Se agregaron 500 µL de inmunotoxina curcina:anti-Her2 en dilución 1:250 en PBS-T a cada pozo de cada cultivo celular y se incubó durante toda la noche a 4°C; se agregaron 500 µL del anti-IgG de ratón peroxidado diluido 1:1000 en PBS-T y se incubó durante toda la noche a 4°C. Finalmente se reveló la acción de la enzima peroxidasa con 500 µL del reactivo tetrahidrocloreuro de 3,3'-diaminobencidina (DAB Substrate, Thermo Scientific) (preparado de acuerdo a las indicaciones del fabricante) durante 5 min, se eliminó esta solución y se lavaron los cultivos con PBS-T. Los cubreobjetos se secaron y montaron en portaobjetos para llevar a cabo la observación microscópica de las células.

9.3 Evaluación de la actividad citotóxica de la inmunotoxina (curcina:anti-Her2)

En la sección 4.2 ya se explicó como se evaluó la citotoxicidad de la inmunotoxina curcina:anti-Her2. Cabe aclarar que en esta parte los controles experimentales negativos fueron la curcina bloqueada con anti-curcina purificada y el anticuerpo monoclonal anti-Her2.

Para bloquear los sitios activos de la curcina se colocaron 2 mg de esta proteína liofilizada por mL de anti-curcina purificada durante 30 minutos. La solución se filtró con membrana de nylon de 0.22 µm en condiciones de esterilidad y se hicieron las diluciones correspondientes en medio de cultivo DMEM o McCoy 5A. Las concentraciones que se evaluaron en la citotoxicidad de la curcina bloqueada (Cb) fueron 15.6, 31.2, 62.5, 125.0, 250.0, 500.0 y 1000.0 µg/mL.

El anti-Her2 se disolvió directamente en medio de cultivo DMEM o McCoy 5A en una concentración de 90 µg/mL, y luego de su esterilización por filtración en membrana de nylon de 0.22 µm, se prepararon las diluciones con concentraciones de 0.70, 1.40, 2.80, 5.62, 11.25, 22.50 y 45.00 µg/mL.

Células MDA-MB-231 y SK-BR-3 fueron incubadas durante 24 h con curcina, inmunotoxina curcina:anti-Her2, curcina bloqueada y anti-Her2 en condiciones de 37°C y atmósfera con 5% de CO₂ con humedad constante. La viabilidad celular se determinó con la prueba de MTT y se calcularon los valores de CI₅₀ con el software GraphPad versión 5.0.

VI. RESULTADOS

ETAPA I: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CURCINA

1. Información medicinal e identificación de *J. curcas* L

Frutos y plantas de piñoncillo (*J. curcas* L) fueron colectados en el municipio de Xicotepec de Juárez, en la zona norte del estado de Puebla. En esta misma zona se realizó la investigación de campo para determinar los usos medicinales de los diferentes órganos de esta especie (Tabla 8).

Tabla 8. Uso medicinal del piñoncillo (*J. curcas* L) en el municipio de Xicotepec de Juárez, Puebla

NOMBRE COMÚN	PIÑÓN, PIÑONCILLO
ÓRGANO	SEMILLA, RAÍZ, TALLO, HOJA, LÁTEX
PREPARACIÓN	ACEITE, COCCIÓN
USO MEDICINAL	INFECCIONES CUTÁNEAS PURGANTE REUMATISMO FIEBRE INFECCIONES URINARIAS HEMORRAGIAS ANTIPARASITARIA

Es de recalcar que en la zona de colecta de *J. curcas* L no se le da uso medicinal como anticancerígeno o antitumoral, sin embargo es posible esta aplicación considerando que la curcina pertenece al grupo de las proteínas inactivadoras de ribosomas y en consecuencia pueden resultar tóxicas para todo tipo de células, entre las que destacan las cancerígenas.

La identificación taxonómica de la planta, fruto, semilla e inflorescencias masculinas y femeninas se realizó en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores

Iztacala de la UNAM, y ahí se determinó que se trataba de *Jatropha curcas* L de la familia Euphorbiaceae y se le asignó el número de registro 2011 IZTA (Figura 14).



Figura 14. Ficha de identificación taxonómica de *Jatropha curcas* L
No. de registro: 2011 IZTA

2. Extracción, purificación e identificación de curcina a partir de semillas de *J. curcas* L.

Las primeras operaciones para la extracción de curcina consistieron en eliminar la testa de las semillas, molerlas de forma manual y eliminar la grasa con hexano, para obtener la pasta residual que se secó y almacenó en condiciones de baja humedad en bolsas de plástico.

En la Tabla 9 se resumen los rendimientos obtenidos en cada una de las metodologías que se siguieron para la obtención de curcina; el porcentaje de harina molida y tamizada fue del 61% y el de la harina desengrasada o pasta residual fue de 41% con respecto a la semilla.

Tabla 9. Rendimientos en las diferentes etapas para la obtención de curcina a partir de semillas de *J. curcas* L

	SEMILLA COMPLETA	HARINA MOLIDA Y TAMIZADA	PASTA RESIDUAL	EXTRACTO T/A	CURCINA CRUDA (F2)	CURCINA PURA
CANTIDAD (g)	195	119	80	7.9	5.9	0.49
% RENDIMIENTO (SEMILLA)	100	61	41	4.0	3.0	0.25
% RENDIMIENTO (PASTA RESIDUAL)			100	9.9	7.4	0.62

El extracto T/A obtenido a partir de la pasta residual mediante precipitación con Tris-HCl y diálisis con solución amortiguadora de acetato de sodio presentó en SDS-PAGE una banda clara y gruesa entre los pesos moleculares de 26 y 34 kDa, además de otras bandas más tenues, tanto de mayor como de menor peso molecular (Figura 15).

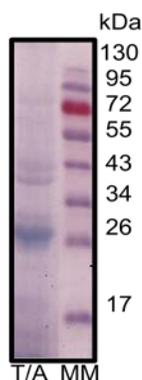


Figura 15. SDS-PAGE del extracto T/A (T/A) obtenido por precipitación con Tris-HCl 50 mM pH 7.5 de la pasta residual de *J. curcas*. L. MPM: marcador de peso molecular.

El rendimiento del extracto protéico T/A fue de 4.0% con respecto a semilla o de 9.9% base pasta residual (Tabla 9).

Este extracto T/A se purificó en columna de SP-Sepharosa, con la elución con solución amortiguadora de fosfato de sodio con NaCl y de ahí se obtuvieron 40 fracciones de 1.5 mL cada una, cuyas absorbancias se muestran en la Figura 16. En el cromatograma se observa un grupo de picos de alta absorbancia (entre 0.3 y 0.8) entre las fracciones 13 y 19, por lo que se decidió colectar en cromatografías posteriores sólo cuatro fracciones de 15 mL cada una y codificarlas como F1, F2, F3 y F4.

El patrón electroforético de estas cuatro fracciones mostró que todas las fracciones presentaron una banda con peso molecular característico de curcina (28 a 30 kDa) (Figura 17); pero fue la fracción F2 la que tuvo el contenido protéico más alto, 290 μg de proteína por miligramo de proteína liofilizada, por lo que se tomó la fracción F2 para continuar la purificación y realizar pruebas de caracterización de la curcina (codificándola como F2 o curcina cruda).

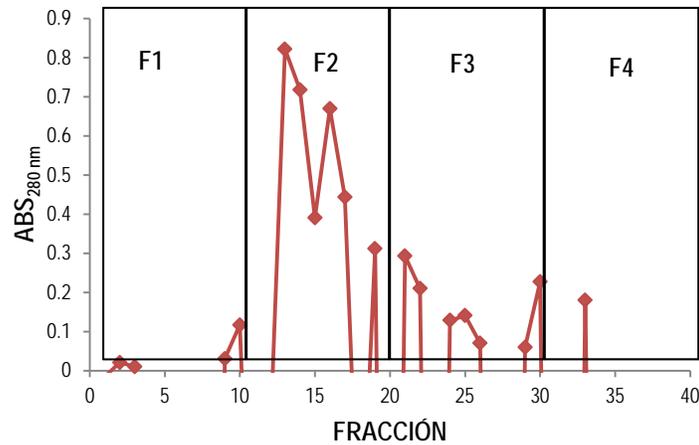


Figura 16. Cromatografía de intercambio iónico en columna de SP-Sepharosa del extracto T/A proveniente de pasta residual de *J. curcas* L eluido con solución amortiguadora de fosfatos 5 mM, pH 7.0 y 1.0 M NaCl.

El rendimiento de curcina cruda F2 fue de 3.0% y 7.4% con respecto a semilla y pasta residual (Tabla 9).

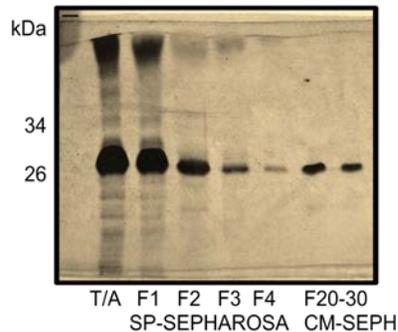


Figura 17. Análisis SDS-PAGE de extracto T/A y fracciones obtenidas en cromatografía de intercambio iónico en SP y CM-Sepharosa a partir de pasta residual de *J. curcas* L (Gel de poliacrilamida al 12% en condición reductora y Tinción con plata).

La curcina pura obtenida por cromatografía en CM-Sepharosa con gradiente de NaCl a partir de F2 (Figura 18), se detectó en las fracciones 20 a 30 por SDS-PAGE en gels al 12% bajo condiciones reductoras (Figura 17). Estas fracciones se colectaron, juntaron y concentraron por ultrafiltración luego de dializarlas contra agua destilada.

El rendimiento final de curcina purificada fue de 0.62% y de 0.25% con respecto a pasta residual y semilla (Tabla 9).

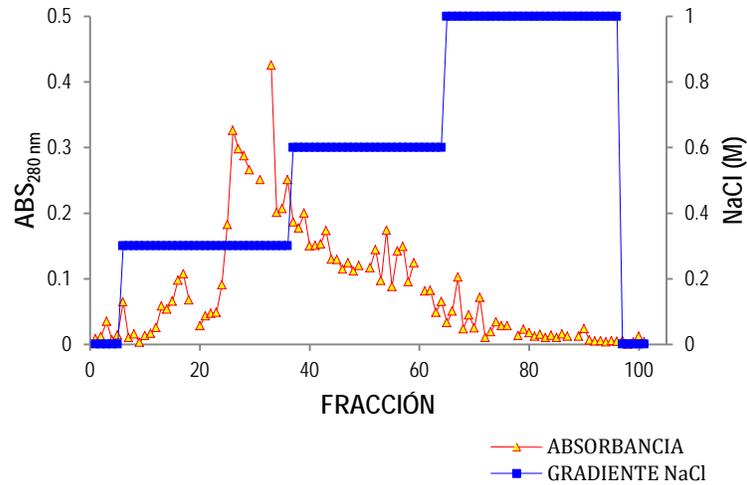


Figura 18. Cromatografía de intercambio iónico en columna de CM-Sepharosa de F2 (curcina cruda) eluida con solución amortiguadora de fosfatos 5 mM, pH 7.0 y gradiente de NaCl

3. Caracterización fisicoquímica e identificación de curcina

La determinación del peso molecular de curcina pura por espectroscopía de masas arrojó un valor de 32.7 kDa (Figura 19). El pI se calculó de forma teórica a partir de los péptidos generados en el análisis espectroscópico y resultó ser de 8.70. Mientras que la determinación de carbohidratos por el método de Dubois indicó una concentración de 4.14%. Estos datos fisicoquímicos se resumen en la Tabla 10.

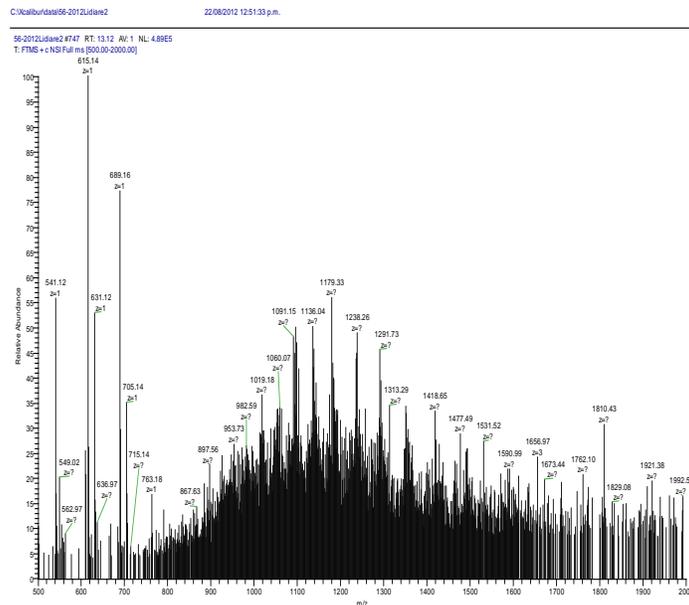


Figura 19. Determinación por espectroscopía de masas del peso molecular de curcina purificada a partir de pasta residual de *J.*

curcas L .

Tabla 10. Parámetros fisicoquímicos de curcina purificada a partir de pasta residual de *J. curcas* L.

	Peso molecular (kDa) ^a	pI	Carbohidratos (%) ^b
Curcina	32.7	8.7	4.14

^a Valor obtenido por espectroscopía de masas

^b Método de Dubois, 1956

Los azúcares presentes en curcina fueron también evidenciados con el kit de detección de glicoproteínas (GLYCOPRO, Sigma-Aldrich, USA) en gel SDS-PAGE al 12%, lo que resultó positivo por la detección de una banda rosa/magenta en el peso molecular correspondiente a curcina (Figura 20).

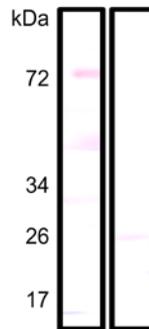


Figura 20. Glicosilación de curcina en gel SDS-PAGE 12% reductor (Tinción método ácido peryódico-reactivo de Schiff).

Los péptidos obtenidos por digestión con tripsina de una banda de curcina separada por SDS-PAGE fueron analizados por cromatografía líquida acoplada a espectroscopía de masas (LC-MS/MS); los datos espectrométricos generados fueron sometidos a la búsqueda en el banco de datos de proteínas (PDB) de UniProt a través del programa Proteome Discoverer 1.4. De esto resultó que los 23 péptidos generados en el análisis cubrieron el 74.06% de la proteína con actividad ARNr N-glicosidasa con número de acceso K9JF38, la cual pertenece a la especie *J. curcas* L. En la Tabla 11 se muestran los péptidos generados en este análisis.

Tabla 11. Péptidos generados mediante cromatografía líquida acoplada a espectroscopía de masas (LC-MS/MS) de curcina pura obtenida a partir de pasta residual de *J. curcas* L.

Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides
K9JF38	rRNA N-glycosidase OS=Jatropha curcas PE=3 SV=1 - [K9JF38_JATCU]	17932.89	74.06	23
Peptide	Sequence	Modifications	Charge	MH+ [Da]
1	ANVHREDVDLGVQALDNYIYTLEK		3	2775.42203
2	EDVDLGVQALDNYIYTLEK		2	2198.09892
3	VINVANLEVSLGLNVVNAYLVGYK		3	2561.45707
4	TFRPGGDIISLENNWGDSLQIQK		2	2751.38945
5	SSKPADIAKPLVGFIEmVPEAAR	M17(Oxidation)	3	2442.32627
6	AGSPPTLTITYDATTDKK		2	1879.98259
7	SSKPADIAKPLVGFIEmVPEAAR		3	2426.32779
8	EAFGFSYSSHEIPVLR		2	1838.91216
9	VGGTSYFFNDPESLADAK		2	1917.89519
10	QQTLSFTGSYADFLSR		2	1820.89214
11	cVNGVFLKPVQLQR	C1(Carbamidomethyl)	3	1657.92679
12	KNYAQFIK		2	1011.56999
13	TYLFTDTKQQTLSFTGSYADFLSR		2	2790.36919
14	NYAQFIKDLR		2	1267.67253
15	AGSPPTLTITYDATTDK		2	1751.88652
16	KVLSQISK		2	902.57060
17	AGSPPTLTITYDATTDKKNYAQFIK		3	2744.39133
18	TYLFTDTK		2	988.50224
19	ATVAPNQK		2	828.46269
20	FKYIEKK		2	955.56493
21	VLSQISK		2	774.47496
22	NYAQFIK		2	883.47063
23	FKYIEK		2	827.47057

4. Determinación de actividad N-glicosidasa de curcina

La actividad enzimática N-glicosidasa de curcina se determinó en ARN de embriones de *J. curcas* L aislado con el reactivo TRIzol, usando como control positivo a la cadena A de la ricina (RTA). En la Figura 21 se muestra el gel de agarosa del ARN tratado con ambas RIPs, con y sin anilina ácida; la flecha muestra la banda de aproximadamente 500 pb que se desprendió al tratar el ARN con anilina ácida 1M pH 4.5, tanto en el caso de curcina como en el de ricina (carriles 4 y 6), mientras en que los ARN con RIPs pero sin tratamiento de anilina (carriles 3 y 5) no hubo aparición de esta banda. En el carril 1 se presenta el marcador de pares de bases del ARN y en el carril 2 aparece el ARN del cual se partió para hacer las pruebas enzimáticas.

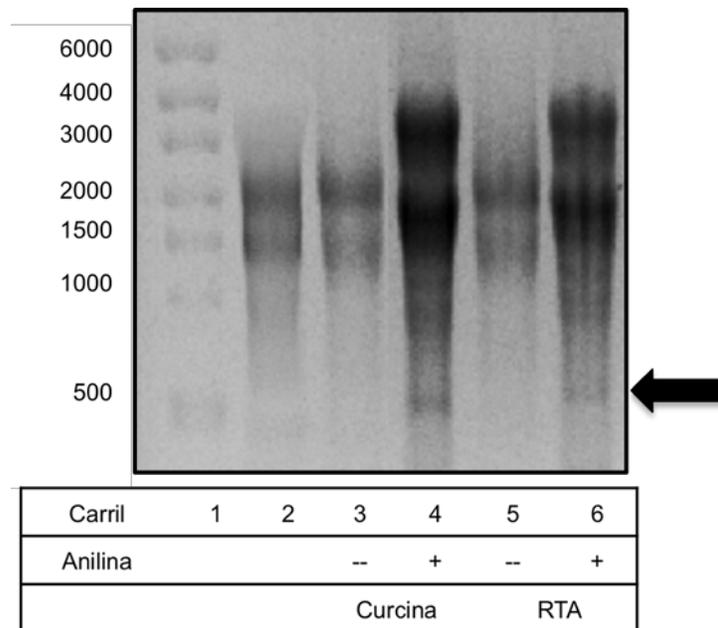


Figura 21. Actividad N-glicosidasa: ARN de embriones de *J. curcas* L se incubaron con 1 μg de curcina o 0.006 μg de cadena A de ricina (RTA), separados en gel de agarosa 1.2% en condiciones desnaturalizantes, y teñido con bromuro de etidio. Los símbolos '+' y '-' indican la presencia o ausencia del tratamiento con anilina ácida 1M pH 4.5, respectivamente. Carril 1: marcador de pares de bases; carril 2: ARN de embriones de *J. curcas* L; carril 3: ARN tratado con curcina sin tratamiento de anilina; carril 4: ARN tratado con curcina y anilina; carril 5: ARN tratado con RTA sin tratamiento de anilina; carril 6: ARN tratado con RTA y anilina. La flecha señala la banda correspondiente al α -fragmento liberado luego del tratamiento con anilina (característico de la actividad N-glicosidasa de las RIPs, también llamado fragmento Endo).

ETAPA II: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE CURCINA

5. Evaluación *in vitro* del efecto citotóxico de curcina en líneas celulares cancerígenas y sanas

El efecto de las diferentes concentraciones de curcina sobre la viabilidad de las líneas celulares cancerígenas MDA-MB-231 y SK-BR-3 y la línea celular sana de fibroblastos se muestra en la Figura 22.

En la Figura se observa que la viabilidad de las líneas celulares cancerígenas disminuye desde la primera concentración de curcina evaluada, mientras que en los fibroblastos el efecto citotóxico fue mucho menos drástico, presentándose en los tres casos un efecto dosis-respuesta dependiente. En la concentración de 3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la

línea MDA-MB-231 mostró 57.2% de viabilidad y la línea SK-BR-3 presentó 64.7% de células viables. Llegando a valores de 25.4% para la línea MDA-MB-231 y de 30.7% para la SK-BR-3 en la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En los fibroblastos no se presentó un efecto tóxico importante en las primeras concentraciones de curcina, con cerca de 98% de viabilidad con un tratamiento de 3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de curcina, llegando a disminuir hasta 71.3% de células vivas con la concentración más alta de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de curcina.

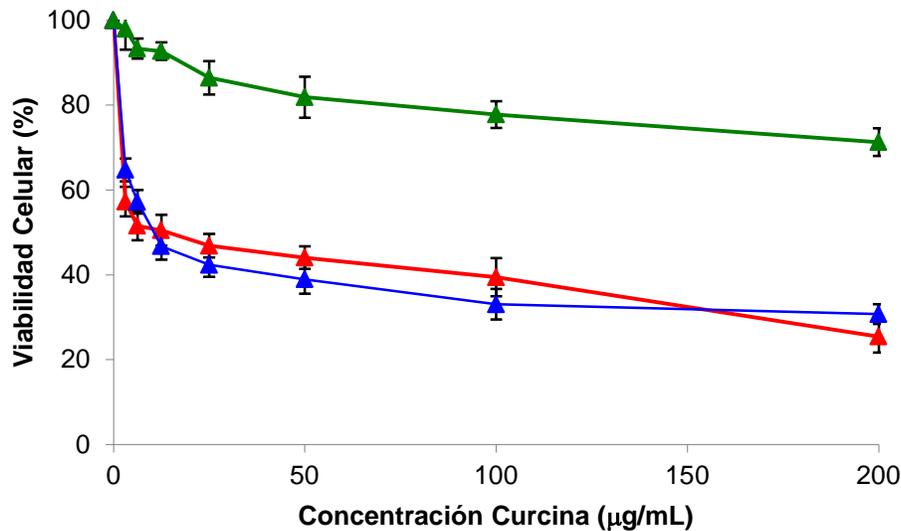


Figura 22. Efecto citotóxico de curcina en las líneas celulares cancerígenas MDA-MB-231 (\blacktriangle), SK-BR-3 (\blacktriangle) y la línea sana de fibroblastos (\blacktriangle). Las células fueron incubadas durante 24 h con diferentes concentraciones de curcina. La viabilidad se determinó por la técnica de MTT. Datos son media \pm DE de 3 a 5 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno.

Calculando la CI_{50} de curcina para estas tres líneas con el paquete estadístico GraphPad versión 5.0, se obtuvieron valores en $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 18.6 ± 2.4 para MDA-MB-231, 15.5 ± 8.3 para SK-BR-3 y 353.4 ± 41.9 para fibroblastos (Tabla 12).

El análisis estadístico para estos resultados mostró que no se presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) para el efecto tóxico de curcina en todas las concentraciones evaluadas y en los valores de CI_{50} en las líneas celulares cancerígenas MDA-MB-231 y SK-BR-3. Sin embargo, los fibroblastos presentaron un CI_{50} estadísticamente diferente con respecto a ambas líneas cancerígenas.

Tabla 12. Actividad citotóxica (CI₅₀) de curcina y RTA en líneas de cáncer de mama MDA-MB-231, SK-BR-3 y en línea de tejido sano FIBROBLASTOS.

LÍNEA CELULAR	CI ₅₀ (µg/mL)	
	CURCINA	RTA
MDA-MB-231(HER2-)	18.6 ± 2.4 ^{ae}	0.002 ± 0.0009 ^{cf}
SK-BR-3 (HER2+)	15.5 ± 8.3 ^{ag}	0.005 ± 0.002 ^{ch}
FIBROBLASTOS (LÍNEA SANA)	353.4 ± 41.9 ^{bi}	0.012 ± 0.003 ^{dj}

RTA: cadena A de ricina

Datos son valor medio ± DE de 2 a 5 réplicas

a, b diferencias significativas para curcina

c, d diferencias significativas para RTA

e, f, g, h, i, j diferencias significativas entre curcina y RTA para cada línea celular

Para comparar el efecto tóxico de curcina con un control positivo se determinó la viabilidad de las tres líneas celulares con la cadena A de la ricina (RTA), los resultados se presentan en la Figura 23 y los valores de CI₅₀ en la Tabla 12.

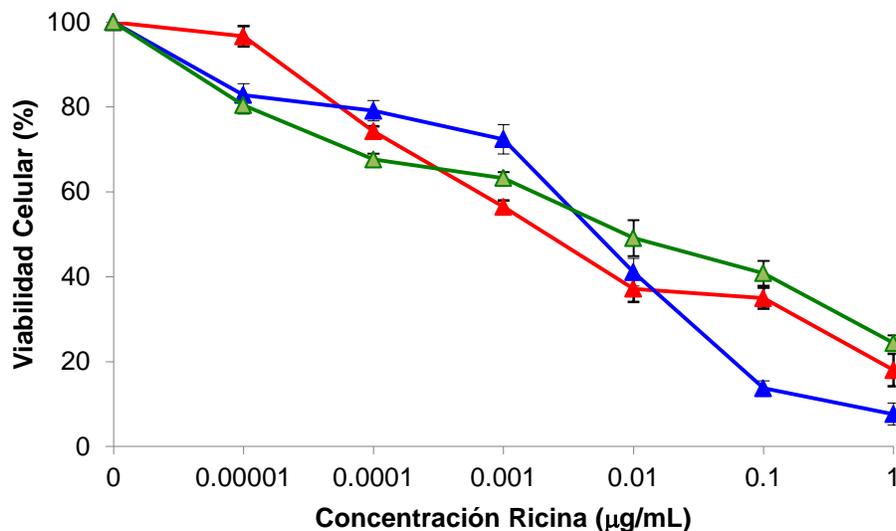


Figura 23. Efecto citotóxico de la cadena A de ricina (RTA) en las líneas celulares cancerígenas MDA-MB-231 (▲), SK-BR-3 (▲) y la línea sana de fibroblastos (▲). Las células fueron incubadas durante 24 h con diferentes concentraciones de RTA. La viabilidad se determinó por la técnica de MTT. Datos son media ± DE de 3 a 5 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno.

Resulta evidente que la ricina fue mucho más tóxica que la curcina en las tres líneas celulares, y aunque en la Figura 23 no se observan diferencias en este efecto, la comparación de medias de los valores de CI₅₀ de la Tabla 12 determinó que, al igual

que la curcina, la ricina no tuvo un efecto estadísticamente diferente ($p < 0.05$) para las dos líneas cancerígenas (MDA-MB-231 y SK-BR-3), pero estas sí fueron estadísticamente diferentes con respecto a las células sanas (fibroblastos).

ETAPA III: CONSTRUCCIÓN DE LA INMUNOTOXINA (curcina:anti-Her2) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD CITOTÓXICA

6. Obtención de anticuerpos contra curcina

La inmunización de conejos con curcina purificada permitió obtener anticuerpos policlonales contra esta proteína, tanto del suero no purificado como del purificado mediante cromatografía de afinidad en columna de Proteína A. La detección por Western Blot, usando curcina como antígeno, fue hasta dilución 1:1000 para el suero no purificado y de 1:500 para el suero purificado.

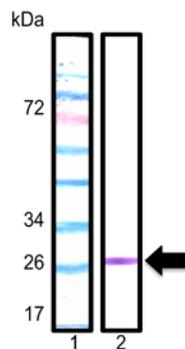


Figura 24. Inmunodetección de curcina (SDS-PAGE 12%), detectada con anti-curcina policlonal obtenida en conejo y purificado en columna de Proteína A (dilución 1:250, revelado con 4-cloro-1-naftol).

Como se puede observar en la Figura 24, el anticuerpo contra curcina (anti-curcina) obtenido detectó a la curcina en el peso molecular correspondiente a esta proteína (Flecha en Figura 24). Este anticuerpo se usó para comprobar la unión de esta proteína con el anti-Her2 luego de la conjugación.

7. Modelación *in silico* de curcina

La búsqueda de secuencias con alta similitud al acceso ACO53803.1, perteneciente a curcina, a través de BLASTp en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),

mostró la ausencia de modelos con alto porcentaje de identidad con esta secuencia. Por esta razón se usó el servidor I-TASSER para obtener el modelo tridimensional de curcina.

El mejor modelo 3D que construyó este servidor, generado a partir de diez estructuras pertenecientes a la familia de las RIPs, mostró un valor de C-Score de -1.01 y un valor de TM de 0.59 ± 0.14 (Figura 25). Estos parámetros están relacionados con la calidad del modelo en cuanto a similitud estructural y topología de la estructura tridimensional del modelo generado con respecto a las plantillas que usó para la modelación.

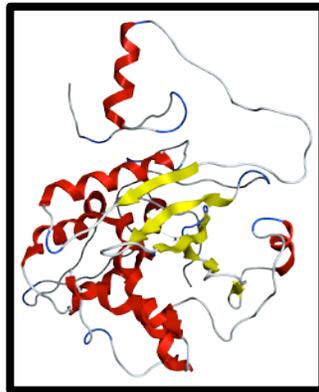


Figura 25. Estructura tridimensional de curcina generada por el servidor I-TASSER a partir del acceso ACO53803.1 del GenBank.

El gráfico de Ramachandran del modelo de curcina indicó que el 94.2% de los aminoácidos se encontraron dentro de las categorías favorecidos (área de color rojo) y permitidos (área color amarillo), mientras que un 5.8% de los aminoácidos estuvieron en las categorías poco permitidas (área de color amarillo tenue) y no permitidas (área de color blanco), resultados que indican buena calidad estereoquímica de este modelo 3D de curcina (Figura 26).

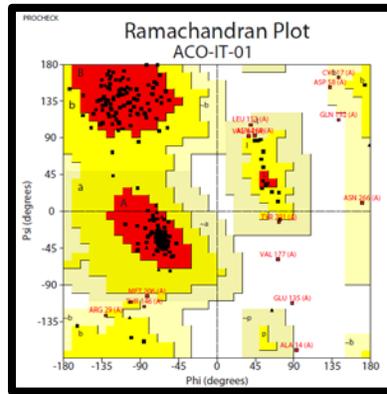


Figura 26. Gráfico de Ramachandran para el modelo 3D del acceso ACO53803.1 de curcuma predicho por el servidor I-TASSER. Las regiones más favorecidas aparecen en color rojo, las zonas permitidas, poco permitidas y no permitidas son indicadas como zonas de colores amarillo, amarillo tenue y blanco, respectivamente

La glicosilación del modelo 3D de curcuma se realizó con el software GlyProt, en los aminoácidos asparaginas en posición 266 y 274 (Lin y col., 2003) y con el oligosacárido GlcNAc2Man3Xyl (Daubenfeld y col., 2005). La Figura 27 muestra la conformación de la curcuma 3D glicosilada en N-266 y N-274. Para asegurar un modelo tridimensional estable, la energía de éste fue minimizada con ayuda del software MOE y un RMSD de 1.73 °A fue observado al sobreponer la estructura de curcuma minimizada energéticamente y la cucurmosina (RIP tipo I de *Cucurbita moschata*).

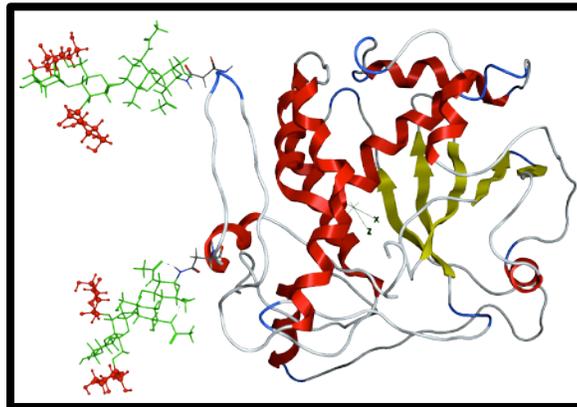


Figura 27. Estructura 3D de curcuma glicosilada con el oligosacárido GlcNAc2Man3Xyl en los residuos de asparagina en posiciones 266 y 274 generada con el software GlyProt.

8. Conjugación de curcuma y anti-Her2 mediante aminación reductiva

La reacción de conjugación del anti-Her2 con la curcuma se realizó en dos etapas, en la primera se oxidaron los azúcares presentes en la curcuma con el compuesto

periyodato de sodio (NaIO_4). El análisis de la curcina oxidada en SDS-PAGE en geles al 12% corroboró que la curcina no se dimerizó durante esta reacción (Figura 28, carriles 2 a 5), mientras que con la prueba cualitativa de Tollens se evidenció la presencia del grupo funcional aldehído con la aparición del espejo de plata (Figura 29).

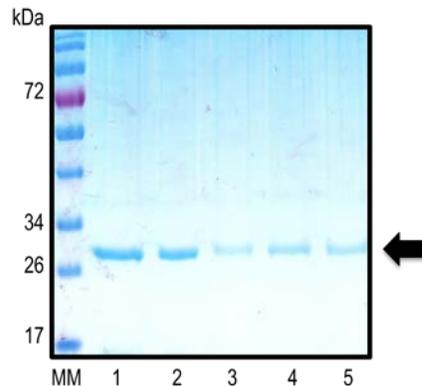


Figura 28. Análisis SDS-PAGE 12% de curcina (carril 1) y curcina en diferentes etapas de la reacción de oxidación con NaIO_4 (carriles 2 a 5). MPM: Marcador de peso molecular.



Figura 29. Prueba de Tollens aplicada a curcina oxidada con NaIO_4 (espejo de plata).

Una vez corroborada la conversión de los grupos hidroxilo presentes en los azúcares de la curcina glicosilada hacia grupos aldehídos, se continuó con la segunda etapa de la conjugación, la cual consistió en incubar la solución de curcina oxidada con el anti-Her2 disuelto en solución amortiguadora de carbonatos y su posterior reducción con NaCNBH_3 .

En la Figura 30 se presentan los resultados de la electroforesis bajo condiciones no reductoras de la curcina (carril 1), el anti-Her2 (carril 2) y la inmunotoxina ya construida (carril 3). La curcina, como ya se había comprobado anteriormente, no altera

su peso molecular después del proceso de oxidación y lo mantiene cercano a 30 kDa. El anti-Her2 presenta una banda clara y fuerte cerca de los 130 kDa, mientras que la inmunotoxina curcina:anti-Her2 presenta una banda cercana a los 250 kDa.

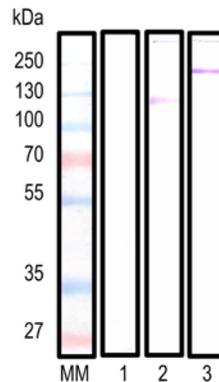


Figura 30. Análisis SDS-PAGE (gel 10%, no reductor) de la conjugación de anti-Her2 y curcina. Carril 1: Curcina oxidada con NaIO_4 ; carril 2: Anti-Her2 en solución amortiguadora de carbonatos; carril 3: Inmunotoxina curcina:anti-Her2.

8.1 Análisis de la inmunotoxina curcina:Anti-Her2

Para verificar que en la inmunotoxina construida y con peso molecular de aproximadamente 250 kDa se unieron la curcina y el anti-Her2 se analizó el conjugado y los componentes del mismo con la técnica de Western Blot.

En la Figura 31 se presentan los resultados obtenidos en el Western Blot realizado a curcina oxidada, anti-Her2 y la inmunotoxina curcina:anti-Her2.

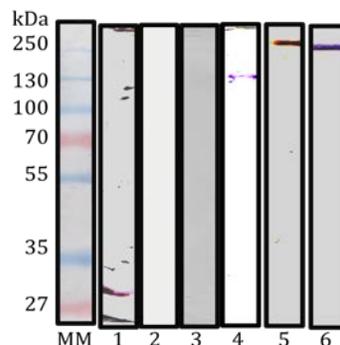


Figura 31. Inmunodetección (gel 10%, no reductor) de curcina (carriles 1 y 2), anti-Her2 (carriles 3 y 4) e inmunotoxina (carriles 5 y 6), tratados con anti-curcina (carriles 1, 3 y 5) o con anti-IgG peroxidado de conejo (carril 2) o con anti-IgG peroxidado de ratón (carriles 4 y 6).

Con esta técnica se detectó la unión entre las proteínas involucradas en la conjugación (carriles 5 y 6), pero además se usaron como antígenos curcina (carriles 1 y 2) y anti-Her2 (carriles 3 y 4) como controles positivos y negativos para esta prueba. Para la curcina tratada con anti-curcina en el carril 1 y con anti-IgG de conejo peroxidado en el carril 2, se observa la identificación de esta proteína solo en el carril 1, con una banda de aproximadamente 30 kDa.

En el carril 3 la anti-curcina no detectó al anti-Her2, pero éste si fue detectado en el carril 4 con el anti-IgG de ratón peroxidado con un peso molecular de aproximadamente 130 kDa.

En la inmunotoxina se detectaron tanto la curcina con la anti-curcina en el carril 5 y el anti-Her2 con el anti-IgG de ratón peroxidado en el carril 6. El reconocimiento de curcina y anti-Her2 en la misma muestra con bandas de aproximadamente 250 kDa de peso molecular, junto con los controles negativos y positivos para cada proteína de los carriles 1 a 4, permiten concluir que hubo unión de la curcina con el anti-Her2.

Aunado al Immunoblotting, se realizó el análisis inmunocitoquímico en células cancerígenas MDA-MB-231 (Her2-) y SK-BR-3 (Her2+) tratadas con la inmunotoxina como anticuerpo primario en una dilución 1:250. En la Figura 32 se presentan ambos tipos celulares tratados con la inmunotoxina y revelados con el compuesto 3,3'-diaminobencidina (DAB).

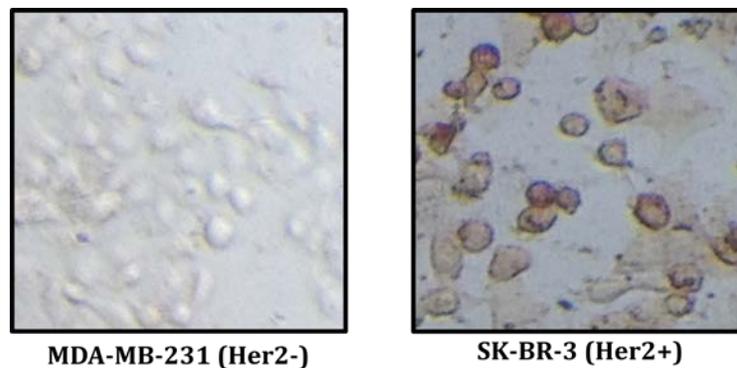


Figura 32. Inmunocitoquímica aplicada en células cancerígenas MDA-MB-231 (Her2-) y SK-BR-3 (Her2+). Las células fueron tratadas con la inmunotoxina curcina:Anti-Her2 (1:250) y reveladas con 3,3'-diaminobencidina (DAB).

Se observa claramente que el reconocimiento y acoplamiento del anti-Her2 de la inmunotoxina con su antígeno Her2 se presentó sólo en las células SK-BR-3, que como ya se ha mencionado sobreexpresa esta proteína, mientras que en el caso de las células MDA-MB-231, catalogadas como Her2-, no se observa formación del precipitado café cuando se revela con el compuesto DAB.

9. Evaluación *in vitro* del efecto citotóxico de la inmunotoxina curcina:Anti-Her2 en líneas celulares cancerígenas y sanas

Una vez construida la inmunotoxina, comprobada la unión entre curcina y anti-Her2 y el reconocimiento diferenciado de este conjugado hacia las dos líneas celulares probadas, se procedió a evaluar su efecto citotóxico. Para esto se determinó la concentración proteica del conjugado y se realizaron las diluciones correspondientes para obtener las concentraciones a probar.

La Figura 33 presenta la viabilidad de las líneas cancerígenas MDA-MB-231 (Her2-) y SK-BR-3 (Her2+) y de las células sanas fibroblastos en las diferentes concentraciones de inmunotoxina y bajo condiciones *in vitro*.

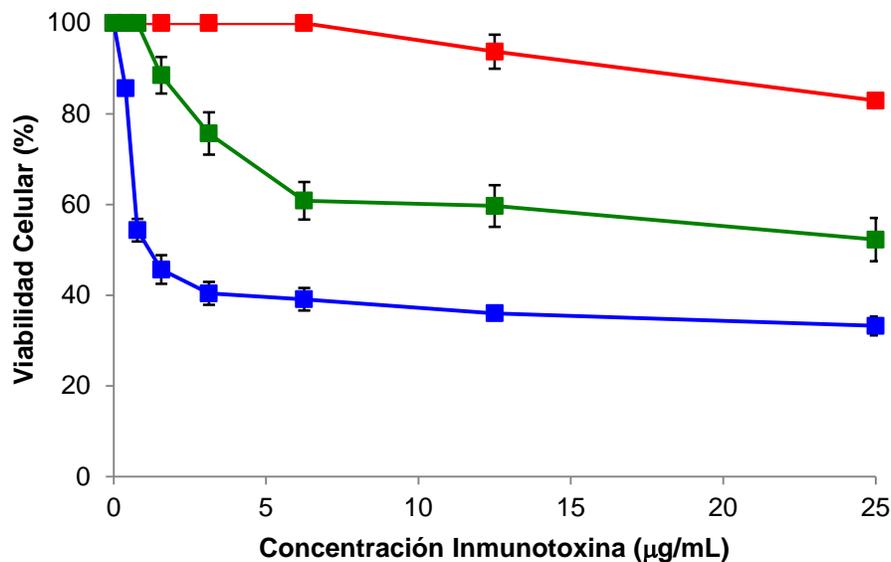


Figura 33. Efecto citotóxico de la inmunotoxina curcina:Anti-Her2 en las líneas celulares cancerígenas MDA-MB-231 (▲), SK-BR-3 (▲) y la línea sana de fibroblastos (▲). Las células fueron incubadas durante 24 h con diferentes concentraciones de inmunotoxina. La viabilidad se determinó por la técnica de MTT. Datos son media \pm DE de 3 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno.

Se observa claramente que en la línea MDA-MB-231 (Her2-) la inmunotoxina no fue tóxica en las concentraciones de hasta 6.25 $\mu\text{g/mL}$, y aunque a partir de este punto se presentó disminución de la viabilidad, esta fue de solo 19% en la concentración más alta (25 $\mu\text{g/mL}$). Todo lo contrario sucedió en la línea SK-BR-3 (Her2+), donde desde la concentración de 0.39 $\mu\text{g/mL}$ ya se disminuye la viabilidad en aproximadamente 15%, presentándose el efecto más fuerte en la concentración de 0.78 $\mu\text{g/mL}$ de inmunotoxina con un 46% de células muertas. Aunque la citotoxicidad de la inmunotoxina fue dosis-respuesta dependiente, a partir de 3.125 $\mu\text{g/mL}$ la muerte celular ya no fue tan drástica y finalmente se llegó a un 33.22% de viabilidad con 25 $\mu\text{g/mL}$ de inmunotoxina.

Los fibroblastos presentaron un comportamiento intermedio entre las líneas cancerígenas; la inmunotoxina resultó tóxica para esta células a partir de 1.56 $\mu\text{g/mL}$ con 88.5% de viabilidad, y llegó a disminuir el número de células vivas hasta un 52.2% con 25 $\mu\text{g/mL}$ de inmunotoxina.

Finalmente, en la Tabla 13 se muestran los valores de CI_{50} obtenidos para la inmunotoxina, la curcina bloqueada, el anti-Her2 y la curcina, estos últimos ya presentados en la Tabla 12.

Tabla 13. Actividad citotóxica (CI_{50}) de curcina, curcina bloqueada, anti-Her2 e inmunotoxina en líneas de cáncer de mama MDA-MB-231 y SK-BR-3, y en línea de tejido sano de FIBROBLASTOS.

LÍNEA CELULAR	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	CURCINA	CURCINA BLOQUEADA	ANTI-HER2	INMUNOTOXINA (Curcina:Anti-Her2)
MDA-MB-231 (Her2-)	18.6 \pm 2.4 ^{a, f}	708.6 \pm 19.9	291.3 \pm 19.8	147.6 \pm 2.5 ^{c, g}
SK-BR-3 (Her2+)	15.5 \pm 8.3 ^{a, h}	184.7 \pm 4.6	247.3 \pm 16.1	2.2 \pm 0.08 ^{d, i}
FIBROBLASTOS (LÍNEA SANA)	353.4 \pm 41.9 ^{b, j}	1079.0 \pm 21.0	50.7 \pm 3.6	16.7 \pm 2.8 ^{e, k}

Datos son valor medio \pm DE de 2 a 5 réplicas

a, b diferencias significativas para curcina

c, d, e diferencias significativas para inmunotoxina

f, g, h, i, j, k diferencias significativas entre curcina e inmunotoxina en cada línea celular

Como se mencionó en la metodología, los controles negativos para evaluar la citotoxicidad de la inmunotoxina fueron la curcina bloqueada y el anticuerpo anti-Her2. Los valores de CI_{50} de ambas proteínas corroboran que no tienen efecto tóxico comparativo con curcina y con la inmunotoxina.

Los valores de CI_{50} de la inmunotoxina corroboran lo que ya se había observado en la gráfica de viabilidad (Figura 33) respecto al efecto en función a la línea celular; la especificidad de la inmunotoxina se comprueba en dos vertientes, entre las líneas celulares cancerígenas y con respecto a la curcina sin conjugar para cada línea celular.

Entre la línea que sobreexpresa el antígeno Her2 SK-BR-3 y la que no lo sobreexpresa MDA-MB-231 se presentó una diferencia importante de citotoxicidad, ya que mientras en la primera el valor de CI_{50} fue de 2.2 $\mu\text{g/mL}$, en la segunda fue de 147.6 $\mu\text{g/mL}$.

Con respecto a la curcina sin conjugar, en la línea celular que sobreexpresa el receptor Her2 SK-BR-3 se incrementa la toxicidad de 15.5 $\mu\text{g/mL}$ de la curcina desnuda a 2.2 $\mu\text{g/mL}$ cuando ya se encuentra conjugada con el anti-Her2, un incremento de 7 veces. Todo lo contrario ocurre con la línea celular MDA-MB-231 que no sobreexpresa este receptor, donde hay una disminución de la toxicidad al aumentar la CI_{50} de 18.6 $\mu\text{g/mL}$ para la curcina a 147.6 $\mu\text{g/mL}$ para la inmunotoxina, es decir un descenso de 8 veces.

Para las células sanas de fibroblastos la inmunotoxina tuvo una CI_{50} de 16.7 $\mu\text{g/mL}$, aproximadamente 8 veces mayor que para la línea SK-BR-3 y 9 veces menor que para la línea MDA-MB-231, pero sobretodo se observa que hubo un marcado incremento de toxicidad comparado con la de la curcina sin conjugar, con CI_{50} de 353.4 $\mu\text{g/mL}$, lo que significa un aumento de 21 veces.

VII. DISCUSIÓN

Aunque diferentes partes de la planta de *J. curcas* L se han usado con propósitos medicinales (hojas frescas, hojas secas y la savia proveniente de hojas tiernas, ramas y tallos), también se ha documentado la toxicidad de sus semillas. Esta toxicidad se debe a la presencia de diterpenos del tipo ésteres de forbol y a la proteína curcina; sin embargo Makkar y col. (1997) establece que las concentraciones y los ensayos de hemaglutinación con esta proteína no determina la toxicidad de las semillas, además de que se ha reportado que esta RIP es mucho menos tóxica que la ricina y la abrina; sin embargo se ha documentado que la toxoalbúmina curcina, debido a su actividad N-glicosidasa (RIP), resulta ser tóxica a células de una gran variedad de organismos, entre los que destacan los mamíferos (Makkar y col., 1997; Martínez-Herrera y col., 2006; Gómez-Pompa y col., 2009; Devappa y col., 2010; Devappa y col., 2011).

Las semillas colectadas en el municipio de Xicotepec de Juárez en el Estado de Puebla correspondieron a variedades del tipo no tóxico de *J. curcas* L, en esta zona las semillas se usan para fines alimenticios y dentro de los usos medicinales no se menciona función anticancerígena (Tabla 8).

El uso anticancerígeno de *J. curcas* L se debe específicamente a la presencia de la RIP curcina en las semillas. De acuerdo a la bibliografía revisada, todas las RIPs tienen este potencial, pero en ningún caso se plantea que el consumo directo de la fuente de la RIP elimine las células cancerígenas; además de que la presencia de los ésteres de forbol, altamente tóxicos e irritantes de la piel, determina que no se consuman en forma cruda o silvestre (Devappa y col., 2011).

El efecto citotóxico de curcina, y en general todas las RIPs, sobre células normales y cancerígenas se ha evidenciado cuando se ha aplicado de forma pura en cultivos *in vitro* e *in vivo*.

El objetivo de esta investigación parte de la obtención de la proteína curcina, característica de la especie *Jatropha curcas* L. De esto resultó necesario identificar taxonómicamente las semillas y las plantas (Figura 13).

Una vez comprobada la identidad de la semilla como *J. curcas* L se inició la obtención de la pasta residual, para lo cual se eliminó la testa de forma manual y la grasa con hexano. Los resultados de rendimiento (Tabla 9) fueron de 61% para harina molida sin testa y de 41% para harina desengrasada, tomando como base de cálculo la semilla completa.

De acuerdo a la bibliografía, la cantidad de semilla sin testa o almendra como tal fluctúa entre 54% y 70% respecto a la semilla completa de piñón. El porcentaje de pasta residual luego de la extracción del aceite varía entre 48% y 64% con base a la almendra y de 30% a 40% con base a la semilla completa (Makkar y col., 1997; Martínez-Herrera y col., 2006; King y col., 2009; Devappa y col., 2010).

El resultado de 61% de harina molida a partir de la almendra se encuentra dentro de los rangos reportados, aunque hay que considerar que este valor se refiere a la harina y no a la almendra completa, lo que implica un poco de pérdida de material. Los porcentajes de pasta residual fueron de 67% con base a la almendra y de 41% con base a semilla completa, resultados que están un poco por arriba de lo referido por los autores antes mencionados.

Como se comprueba con estos resultados, el porcentaje de “desecho” generado por el proceso de obtención del aceite de las semillas de *J. curcas* L es muy alto. Tanto esta característica, como la condición antitumoral de la curcina, motivaron la búsqueda de la explotación de este subproducto del procesamiento del piñón.

Luego del proceso de extracción y dos cromatografías de intercambio iónico para obtener curcina pura a partir de la pasta residual se obtuvieron rendimientos de 0.25% base semilla o 0.62% base pasta residual (Tabla 9).

Kumar y cols., (2008) reportaron rendimientos de curcina entre 1.4 y 2.0% con respecto a la semilla completa de piñón presente en cultivos de la India y extraída mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de exclusión molecular; por su parte, Kittikajhon y cols. (2009) determinaron el contenido de curcina en semillas de 153 especímenes de *J. curcas* L colectados en 38 provincias de Tailandia y extraídas únicamente por precipitación con Tris-HCl y acetato de sodio. Con sus resultados dividieron a las semillas en cuatro grupos basados en el contenido de curcina con base a peso seco de la almendra. El grupo A con el mayor número de especímenes mostró valores de 0.00 a 4.95%, el grupo B presentó valores entre 5.02 y 8.69% de curcina, mientras que los grupos C y D tuvieron rangos de 10.01-11.53% y 15.83-19.28%, respectivamente. Resulta claro que se presentó una gran variabilidad en el contenido de curcina en las plantas analizadas, lo cual puede deberse a diferencias genotípicas de acuerdo a los autores. Por otro lado, Lin y cols. (2010) reportaron rendimientos de 0.117% p/p para curcina cruda y de 0.00291% para curcina pura obtenida por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de exclusión molecular.

Con respecto a otras RIPs, se han reportado rendimientos de 0.014% para tricosantina obtenida de raíces de *Trichosanthes kirilowii* mediante extracción con sulfato de amonio y cromatografía en CM-Sepharosa; de 0.004% para abesculina a partir de semillas de *Abelmoschus esculentus* después de una extracción con sulfato de amonio y 3 tipos de cromatografías consecutivas; en *Nicotiana tabacum* se aisló la RIP identificada como TRIP con rendimientos de 0.01% en los diferentes partes de la planta analizadas (raíces, tallos, flores y callos); la purificación de las RIPs diocina 1 y diocina 2 a partir de hojas de *Phytolaca dioica* L generó rendimientos de 0.000027% y 0.00037% respectivamente, después de una extracción con sulfato de amonio y 5 tipos de cromatografías consecutivas (Maraganore y col., 1987; Sharma y col., 2004; Kondo y col., 2007; Parente y col., 2008).

Resulta evidente con los datos presentados anteriormente que existe una gran variabilidad en los rendimientos de curcina obtenidos por los diferentes grupos de investigación, variando desde cantidad de 0.0% hasta 19%, mientras que para las otras RIPs se reportan rendimientos muy bajos, generalmente menores a 0.01%; la comparación de estos datos y los obtenidos en esta investigación, debe hacerse con

cuidado debido a que, además de que provienen de plantas de orígenes diferentes y por lo tanto con genotipos que pueden influir en el contenido de la RIP en cuestión, las condiciones experimentales para extraer y purificar las RIPs mencionadas son diferentes tanto en número, como en el tipo de reactivos y metodologías aplicadas.

Independientemente de la gran variación en los contenidos de curcina presente en semillas de piñón, lo que resalta es el bajo rendimiento de esta proteína. Sin embargo, aun cantidades tan pequeñas resultan atractivas para generar compuestos con efecto terapéutico ya que se ha establecido que una molécula de RIP puede inactivar 200 ribosomas/EF2 por minuto (Rustamzadeh y col., 2003).

El análisis del extracto T/A por SDS-PAGE (Figura 15) muestra la presencia de una banda nítida con un peso molecular entre 26 y 34 kDa, muy cercano al reportado para curcina por Lin y cols. (2010) de 28.2 kDa. Y aunque también aparecen bandas tenues por arriba y por debajo de este peso molecular, la extracción con Tris-HCl seguida de diálisis con solución amortiguadora de acetato de sodio resultó bastante selectiva para esta proteína.

En la purificación del extracto T/A por cromatografías de intercambio iónico en SP-Sepharosa (Figura 16) y CM-Sepharosa (Figura 18) se obtuvieron fracciones cuyo análisis SDS-PAGE demostró la purificación de la curcina. En los carriles 6 y 7 (F20-30) de la Figura 17 se observa una sola banda en el peso molecular entre 26 y 34 kDa.

De acuerdo a la investigación bibliográfica, el peso molecular de la curcina puede variar entre 28 y 30 kDa de acuerdo a la isoforma de referencia (Qin y col. 2005; Kumar y col., 2008; Lin y col., 2010), por lo que el resultado de 32.7 kDa que se obtuvo para la curcina pura cae dentro de este rango; pero además concuerda con los reportados para otras RIPs tipo I cuyos pesos moleculares varían entre 26 y 32 kDa (Stirpe, 2004). El valor del pI de 8.7 también concuerda con los reportados por los autores anteriores y en general para todas las RIPs (Tabla 10) (Stirpe, 2004; Lin y cols., 2010).

La glicosilación de la curcina fue una característica de suma importancia en esta investigación, ya que el fundamento químico para la construcción de la inmunotoxina por

aminación reductiva inició con la producción de grupos aldehídos a partir de los grupos hidroxilos presentes en moléculas de azúcares. Es por esto que se verificó la presencia de carbohidratos por dos vías, de forma analítica el valor de 4.14% correspondió con el reportado por Lin y col. (2010) de 4.91%; y de forma electroforética en gel SDS-PAGE, que con fundamento en la reacción de los azúcares con el ácido periódico para formar grupos aldehídos, y en presencia de reactivo de Schiff en condiciones reductoras, genera una coloración magenta en el punto donde se encuentran estos azúcares. Como se observa en el carril 2 del gel de la Figura 20, hay una banda magenta en el peso molecular correspondiente a curcina. Con esto se concluyó que la curcina purificada estaba glicosilada y era posible usar sus residuos de azúcares para unirla al anticuerpo anti-Her2.

Otra característica de la curcina que resultó crucial para su uso como la parte de la inmunotoxina curcina:anti-Her2, fue su actividad N-glicosidasa, ya que es precisamente esta función enzimática la que provoca su efecto tóxico. En el gel de la Figura 21 se observa que ARN tratado tanto con curcina (carril 4) como con la cadena A de la ricina (carril 6), como control positivo, con tratamiento de anilina ácida provocaron la aparición del fragmento Endo, R o α con aproximadamente 500 pares de base, lo que demostró el rompimiento del enlace glicosídico entre la adenina (A^{4324}) y la ribosa del ARN.

De acuerdo a la bibliografía, el rompimiento del enlace entre la adenina y la ribosa del bucle sarcina/ricina presente en la subunidad mayor del ARN provoca la liberación de una porción de nucleótidos entre 350 y 500 pares de bases, que aunque generalmente queda atrapado en el bucle de ARN, puede ser evidenciado mediante electroforesis luego de que el ARN es tratado con anilina ácida (Endo y col., 1987; Tumer y col., 1997; Bagga y col., 2003).

Una vez obtenida la curcina y evidenciada su actividad N-glicosidasa se evaluó su actividad citotóxica bajo condiciones *in vitro* en cultivos celulares de cáncer de mama SK-BR-3 y MDA-MB-231 y de células sanas de fibroblastos. En los tres cultivos el efecto fue dosis-respuesta dependiente, pero fue en las células cancerígenas donde se evidenció la toxicidad de la curcina, sin que hubiera diferencias significativas en ninguna

concentración evaluada entre ambas líneas celulares. Este comportamiento se comprobó con los valores de CI_{50} (Tabla 12).

La citotoxicidad de la curcina ya ha sido evaluada por varios autores. En 2003, Lin y cols. reportaron que la curcina inhibió la síntesis de proteínas en las líneas SGC-7901 (cáncer gástrico), Sp2/0 (mieloma de ratón) y hepatoma humano, cuyos valores de CI_{50} luego de 72 h de incubación, fueron de 0.23 ± 0.08 , 0.66 ± 0.31 y 3.16 ± 0.42 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, y encontraron que para la línea HeLa y para las células normales de pulmón humano MRC los valores fueron miles de veces mayores. Existen además reportes del efecto citotóxico de curcina en sistema de lisados de reticulocitos de conejo con valores de 0.19 nmol/L para proteína nativa y de 0.32 nmol/L para proteína recombinante (Lin y col., 2003b).

Zhao y col (2012) concluyeron que el tiempo de incubación es un factor determinante en la inhibición del crecimiento celular inducido por curcina; estos investigadores reportaron que el efecto de curcina en el proceso de apoptosis de células de sarcoma S-180 de ratón fue mayor conforme aumentó la concentración evaluada (0.01 a 100 $\mu\text{g/mL}$) y el tiempo de incubación (3, 5 y 7 días). Sugiriendo que esta RIP puede inhibir el crecimiento de este tipo de células a concentraciones tan bajas como 10 $\mu\text{g/mL}$.

Ya también se ha evaluado el efecto tóxico de curcina recombinante. Luo y col. (2006) encontraron que el crecimiento de las células tumorales NCL-H466 (cáncer de pulmón) y SGC-7901 (cáncer gástrico) se inhibió en un 50% con 50 $\mu\text{g/mL}$ de curcina recombinante, mientras que para la líneas S180 (cáncer gástrico) este porcentaje de inhibición se alcanzó con 500 $\mu\text{g/mL}$, después de cinco y siete días de incubación.

Por su parte, DanDan y cols. (2012) reportaron los efectos antiproliferativos de curcina recombinante en la línea celular A549 (cáncer de pulmón) con CI_{50} de 92.24 $\mu\text{g/mL}$ y en la línea HepG2 (cáncer de hígado) con CI_{50} de 691.42 $\mu\text{g/mL}$.

En el trabajo publicado en 2014 por Mohamed y col. se evaluó el efecto de curcina en varias líneas celulares cancerígenas y sanas, con el objetivo principal de determinar algunos eventos bioquímicos y morfológicos causados por esta RIP y compararlos entre ambos tipos de células. En sus resultados destacan que la curcina presentó efectos citocidas dosis dependientes, con mayor mortalidad conforme aumentaba la concentración de esta proteína (1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y que las células sanas fueron más resistentes, sobresaliendo los fibroblastos (L929). Una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ causó la muerte de cerca de 30% de estas células, mientras que 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ causó 20% de mortalidad. Este comportamiento de los fibroblastos también fue observado en la presente investigación, con valores de viabilidad de aproximadamente 78% con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 71% con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 22), y con un valor de CI_{50} de 353.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 12).

De acuerdo a Mohamed y col. (2014), la posible causa de esta alta viabilidad en los fibroblastos puede ser su alto índice mitótico. Los fibroblastos son células del tejido conectivo cuya principal función es mantener la integridad estructural del tejido conjuntivo mediante la producción y secreción de proteínas de la matriz extracelular como el colágeno, glucosaminoglucanos y glicoproteínas. Un rasgo característico de este tipo de células es que ante una lesión del tejido se genera un estímulo proliferativo que los induce a producir proteínas de cicatrización, pero sobretodo de reparación de tejidos mediante inducción de mitosis y producción de sustancias (colágeno principalmente) que aíslan el tejido y favorecen su reparación, funciones que confirman lo planteado por Mohamed y col. (2014) y lo encontrado en el presente trabajo.

Entre las líneas de cáncer que estudiaron Mohamed y col. (2014) se encontraron dos de cáncer de mama, la MDA-MB-453 y la MCF-7, siendo la primera de ellas más resistente con valores de viabilidad de 45% con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 55% con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que la línea MCF-7 presentó 30% de viabilidad con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 55% con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como estas líneas celulares poseen mas o menos el mismo índice mitótico, los autores plantean que la diferencia en la respuesta a curcina se puede deber a la resistencia propia de cada población celular. Además especulan que la línea MDA-MB-

453, la cual es triple negativa, exhibe mejor flujo de fármacos cuando se compara a otras líneas celulares y esto puede ser causa de su mayor resistencia.

Lo que resulta evidente en la presente investigación es que la curcina fue tóxica para ambas líneas cancerígenas de mama probadas, y aunque ambas provienen de efusión pleural de hembras caucásicas con adenocarcinoma de mama, presentan la gran diferencia en los receptores que expresan a nivel de membrana. La línea SK-BR-3 sobreexpresa el producto del gen HER2/c-erb-2 y por lo tanto es considerada HER2 positiva. Mientras que la línea MDA-MB-231 expresa el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento transformante alpha ($TGF\alpha$) y cantidades normales de HER2/c-erb-2, por lo que es considerada como HER2 negativa.

La diferencia en la respuesta de las líneas celulares cancerígenas a una RIP específica también ha sido evidenciada ampliamente en saporina, tricosantina, gelonina, MJ-30, ricina, entre otras; las razones de estas diferencias no han sido completamente dilucidadas y de hecho son varias. Unas de las más mencionadas son las diferencias en el tipo y número de receptores a nivel de membrana celular, las vías de movimiento intracelular de estas proteínas, y las velocidades de degradación y excreción de las proteínas (Stirpe y col., 2006; Fracasso y col., 2010).

Con estos antecedentes, y debido a que no se realizaron pruebas para determinar la vía de entrada de curcina en estas líneas celulares, sólo se puede argumentar que las diferencias entre las líneas SK-BR-3 y MDA-MB-231 no fueron suficientes para inducir un efecto diferenciado en la captación y entrada de esta RIP a ambas células.

Comparando la citotoxicidad de curcina con la cadena A de la ricina (RTA) como control positivo (Figura 22-23 y Tabla 12), se observa claramente que la RTA resultó ser altamente tóxica en las tres líneas evaluadas. Como ha sido bien establecido, la ricina es una RIP tipo II que contiene además de la cadena catalítica A, la cadena lectina B, la cual permite el reconocimiento y la unión de la ricina a las células; es precisamente esta característica la causante de la alta toxicidad de la ricina. Sin embargo, en este estudio se usó la cadena A de la ricina, lo que implicó que la toxicidad no fue mediada por la cadena B.

De acuerdo a Jasheway y cols. (2011), la cadena A de la ricina (RTA) tiene una alta afinidad por los ribosomas, con una K_m de aproximadamente $1 \mu M$ y una K_{cat} de 1500 min^{-1} , lo que implica una alta capacidad de inhibición de la síntesis proteica. Por otro lado, Wang y cols. (2011) concluyen que la cadena A de la ricina induce desplegamiento de proteínas (UPR) y apoptosis, lo cual incrementa su toxicidad en células de mamíferos.

Con respecto a la curcina, sólo se ha concluido que esta RIP tipo I induce inhibición de la síntesis proteica y apoptosis, pero no se cuenta con información respecto a sus parámetros cinéticos para comparar con los de la RTA. Es posible que la curcina presente menor afinidad por los ribosomas y que sea esta característica la responsable de su menor toxicidad comparada con la RTA.

Aunque la actividad antitumoral de la curcina había sido adjudicada a la inhibición de la síntesis proteica y a la apoptosis (Zhao y cols., 2012). En 2014, Mohamed y col. reportan las respuestas subcelulares y citológicas de varios tipos de células sanas y cancerígenas tratadas con curcina. Sus resultados mostraron que curcina induce apoptosis y muerte celular debido a que desencadena una amplia gama de reacciones que estimulan esta respuesta. Entre los efectos de curcina, encontraron que además de la aparición de signos de apoptosis, como la aparición de cuerpos proapoptóticos, pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática y encogimiento celular, hubo incremento importante en la producción de especies reactivas de oxígeno y de peróxidos por oxidación de lípidos, inhibición de las enzimas poli (ADP-ribosa) polimerasa o PARP que intervienen en el mantenimiento del ADN, degeneración y distorsión de los filamentos de actina encargados de mantener el citoesqueleto celular, disminución en la producción de proteínas como la vinculina, proteína de membrana que interviene en interacciones intercelulares, y la survivina, que actúa como anti-apoptótica, además de pérdida en el potencial de membrana mitocondrial con la consecuente liberación de factores proapoptóticos como el citocromo c y las caspasas.

Con estos resultados, Mohamed y cols. demuestran que las alteraciones causadas por curcina son muy similares a los procesos de autofagia y apoptosis, lo cual aunado a que estos efectos fueron mayores en las células cancerígenas que en las

células normales y que presentó hemocompatibilidad, les permitió concluir que esta RIP es una opción con alto potencial citocida y abre las puertas para su aplicación como agente terapéutico contra cáncer de diferentes orígenes.

En esta investigación se planteó explotar esta capacidad tóxica de curcina en forma de una inmunotoxina con el objetivo de dirigir el ataque a un determinado tipo de célula. El antígeno que se seleccionó para esta inmunotoxina fue la proteína Her2 que, como ya se mencionó en los antecedentes, cumple con los requisitos de ser un blanco terapéutico para el cáncer.

Aunque el método más empleado para conjugar anticuerpos monoclonales con otras proteínas mediante modificación química es a través del uso de entrecruzadores, es posible aprovechar los grupos funcionales presentes en la proteínas para inducir su unión a través de los mismos. Este tipo de conjugación, llamada de largo cero, tiene como principal ventaja que las proteínas en cuestión no pasan por procesos de derivatización y por lo tanto se disminuyen los tratamientos químicos y con ello la alteración de la actividad biológica, tanto del anticuerpo como de la toxina.

Entre los grupos funcionales reactivos presentes en proteínas destacan los grupos aminos, principalmente los ϵ -amino de los residuos de lisina, los tioles característicos de los aminoácidos cistina y metionina, los grupos carboxilo de los ácidos aspártico y glutámico, y los grupos hidroxilo presentes en varios aminoácidos pero sobretodo en los carbohidratos de proteínas glicosiladas. Con estos antecedentes y la modelación *in silico* de la posición de los azúcares en curcina (Figura 27) se planteó como hipótesis de trabajo la unión de curcina con el anticuerpo contra Her2 a través de los grupos hidroxilo de las manosas expuestas en la RIP curcina y los grupos ϵ -amino de las lisinas de la región cristalizable Fc del anticuerpo contra Her2. Esta conjugación se considera como “sitio-dirigida” entre la porción de carbohidratos de la curcina y la región Fc del anti-Her2, con la consecuente ventaja de no involucrar las zonas bioactivas de ambas proteínas.

Antes de llevar a cabo la construcción química de la inmunotoxina mediante oxidación de los carbohidratos en curcina y la aminación bajo condiciones reductoras con el anticuerpo contra Her2 de forma experimental, se llevó a cabo la modelación *in silico* de la estructura tridimensional de la curcina glicosilada.

En la Figura 27 se muestra la representación esquemática de la molécula de curcina con dos oligosacáridos con estructura GlcNAc2Man3Xyl en los residuos de asparaginas en posiciones 266 y 274 (Lin y col., 2003; Daubenfeld y col., 2005). En esta molécula se observa que los azúcares se encuentran expuestos en la estructura de curcina, de tal forma que pueden ser usados para unirlos al anticuerpo mediante las reacciones antes mencionadas.

Cabe mencionar que el modelo 3D de la curcina que se usó como base para glicosilar fue obtenido con el servidor I-TASSER y fue evaluado mediante el gráfico de Ramachandran para asegurar la mayor estabilidad en sus enlaces y arreglos espaciales, además de que se minimizó la energía del modelo de curcina glicosilada y se analizó su alineación con la estructura 3D de la RIP cucurmosina, cuya estructura ya ha sido cristalizada. El valor de 1.73 °Å de RMSD luego de la superimposición de ambas proteínas indica una buena similitud entre ambas estructuras.

En la primera parte de la construcción de la inmunotoxina curcina:anti-Her2 se generaron los grupos aldehído en los azúcares de curcina con el agente oxidante NaIO_4 . Este reactivo rompe el enlace entre átomos de carbono adyacentes que contienen grupos hidroxilo (llamados cis-dioles o vicinales), convirtiéndolos en dos grupos aldehídos de mayor reactividad mediante el mecanismo de reacción presentado en la Figura 34. Esta reacción ha sido tan usada y estudiada que ya se ha establecido que para asegurar la oxidación de azúcares como galactosa y manosa se deben usar concentraciones a partir de 10 mM.

La prueba de Tollens que se realizó para verificar esta conversión resultó ser positiva, ya que se observa claramente la presencia del espejo de plata en la base del tubo de ensaye (Figura 29), consecuencia de la reducción del complejo de nitrato de

plata amoniacal hacia plata metálica por oxidación del grupo carbonilo de los aldehídos presentes en la muestra de curcina tratada con NaIO_4 .

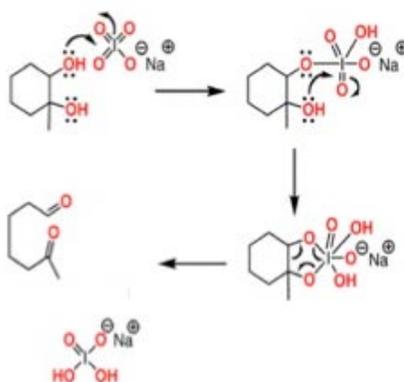


Figura 34. Mecanismo de reacción durante la oxidación de grupos hidroxilo vicinales con NaIO_4 .

Debido a que la curcina oxidada podría sufrir reacciones de dimerización entre las mismas moléculas por reacción de aminación, se analizaron muestras de curcina en diferentes etapas de la oxidación, y como se observa en el gel de poliacrilamida de la Figura 28, sólo se detecta la banda característica de curcina de aproximadamente 30 kDa en todas estas muestras, por lo que se puede concluir que bajo las condiciones en que se llevó a cabo la oxidación de la curcina, no se provocó la autodimerización de esta proteína.

Otros factores que aseguraron la estabilidad de la curcina oxidada fue la detención de la reacción con etilenglicol, la remoción de los productos de esta reacción y el exceso de NaIO_4 mediante diálisis y la preparación de curcina oxidada en el momento justo de su conjugación con el anti-Her2 (Nakane y col., 1974).

Es bien sabido que las aminas primarias representan un muy buen blanco para la conjugación de anticuerpos debido a su carácter nucleofílico y alta reactividad cuando se encuentran desprotonados. En el caso de los grupos ϵ -amino de las lisinas, que como ya se mencionó se encuentra de forma abundante y ampliamente distribuidas en la superficie de la región Fc de los anticuerpos, esto ocurre en un pH alcalino entre 8 y 10 ($\text{pK}_R = 10.53$). Por lo que para dirigir la unión de la curcina oxidada con la región Fc del anti-Her2 se incubaron ambas proteínas en condiciones de pH de 9.5. Además se usó el

compuesto NaCNBH_3 como agente reductor para convertir las bases de Schiff formadas en aminas secundarias estables, de acuerdo al mecanismo de reacción de la Figura 9. El uso de este compuesto reductor asegura que la reducción ocurra en los enlaces imino de las bases de Schiff y no en los aldehídos, gracias al ligando CN^- aceptor de electrones que disminuye la reactividad del grupo hidruro (Baxter y col., 2004).

En el análisis por SDS-PAGE no reductor de la inmunotoxina (Figura 30), luego de haber sido purificada por ultrafiltración y cromatografía de exclusión molecular, se observa claramente el cambio electroforético de este conjugado (250 kDa) con respecto a curcina (30 kDa) y al anti-Her2 (130 kDa).

Uno de los principales inconvenientes de la construcción de inmunotoxinas mediante conjugación química es el hecho de que el conjugado resultante es heterogéneo, tanto en el número como en la posición de las moléculas de toxina acopladas. Esta heterogeneidad en la estructura afecta las propiedades tanto físicas como biológicas del conjugado y frecuentemente resulta en una disminución de la actividad de ambas proteínas. Es por esto que se requiere establecer metodologías de conjugación bien definidas y sobre todo generar modificaciones sitio-específicas en las proteínas en cuestión. Y es precisamente lo que la reacción de aminación reductora permitió en esta investigación.

Otra forma de controlar la heterogeneidad de los conjugados es a través de la proporción molar entre la toxina y el anticuerpo. En esta investigación se planteó una proporción molar de 5 moles de curcina por 1 mol de anti-Her2 durante la reacción de conjugación, y aún cuando no se determinó experimentalmente el número de moléculas de curcina que se unieron al anticuerpo anti-Her2, se observó que todos los conjugados construidos mostraron un peso molecular de aproximadamente 250 kDa (Figura 30 carril 3). Este resultado permite proponer que el manejo controlado de todos los parámetros durante la reacción, incluida la relación molar 5:1, generó conjugados con tres moléculas de curcina unidas a cada Mab. Sin embargo, es necesario corroborar experimentalmente tanto el número como la posición de las moléculas de curcina unidas al anti-Her2 e incluso optimizar esta proporción para asegurar la unión de 2 a 3 moléculas de curcina por anticuerpo.

El grado de conjugación es otro factor que determina la efectividad de una inmunotoxina, ya que tanto un exceso como un bajo número de curcina unida al anti-Her2 puede causar baja actividad citotóxica. En el primer caso, el conjugado de alto peso molecular genera una conformación espacial que difícilmente se puede transportar e introducir en las células blanco. Mientras que una menor conjugación produce inmunotoxinas de menor efectividad enzimática.

Aunque el análisis en geles de poliacrilamida es una buena herramienta para monitorear el grado de conjugación, es necesario realizar análisis cromatográficos para cuantificar de forma más exacta el número de moléculas de curcina unidas al anti-Her2.

Los análisis de inmunodetección (Figura 31) e inmunocitoquímico (Figura 32) permitieron comprobar la unión entre curcina y el anti-Her2, y el reconocimiento diferencial de la inmunotoxina a su antígeno Her2 en las células consideradas como Her2+. Estos resultados permiten concluir que la conjugación química ocurrió y que además no afectó la capacidad de reconocimiento y unión del anti-Her2 con su antígeno Her2 en las células blanco SK-BR-3.

Desde los años 80s hasta la actualidad se han construido inmunotoxinas por acoplamiento químico de una gran variedad de anticuerpos y RIPs, entre las que destacan la ricina, la gelonina, la saporina, la PAP y la momordina. En la mayoría de ellas la técnica de acoplamiento ha sido mediada por derivatización tanto de anticuerpos como de toxinas con diferentes reactivos entrecruzadores, resaltando los compuestos succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-oxicarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio) tolueno (SMPT) y 2-iminotiolano (2-IT) (Ghethie y col., 2001). Aún cuando en casi todas las inmunotoxinas se ha incrementado el efecto tóxico hacia las células blanco, los problemas de heterogeneidad e inestabilidad del enlace disulfuro en la molécula han limitado su avance como terapias dirigidas comerciales.

En la inmunotoxina generada en esta investigación el enlace que unió a la curcina con el anti-Her2 fue de tipo amina, por lo que se disminuye en gran medida la inestabilidad del conjugado durante su trayecto hacia la célula blanco. Además, la

estrategia de conjugación presentada en esta investigación permite generar conjugados uniformes en el sitio de unión entre ambas proteínas. Aunque ambas características representan grandes ventajas en la construcción de inmunotoxinas por esta vía, resulta evidente que se debe caracterizar el conjugado y cuantificar el rendimiento obtenido, parámetros de extrema importancia para la producción de moléculas de importancia farmacológica.

El principal objetivo de esta investigación fue construir una inmunotoxina con curcina y dirigida al receptor Her2, por lo que las células blanco fue el cultivo SK-BR-3, el cual sobreexpresa este antígeno, y el control negativo fue el cultivo MDA-MB-231, con niveles normales de esta proteína. Para corroborar que la citotoxicidad de la inmunotoxina fue debida a la curcina, se evaluaron los efectos citotóxicos de la curcina bloqueada con el anti-curcina y del anti-Her2 en las mismas líneas celulares.

Una vez descartado el efecto tóxico de la curcina bloqueada y el anti-Her2 (Figura 33 y Tabla 13), se observa que la inmunotoxina fue dos órdenes de magnitud más tóxica para las células Her2+ que para las Her2-, y un orden de magnitud más tóxica para los fibroblastos.

Con respecto a la curcina, el cambio de citotoxicidad de la inmunotoxina fue también muy marcado. Ya que como RIP, la curcina fue igualmente tóxica para ambas líneas celulares cancerígenas y poco tóxica para los fibroblastos, pero como conjugado la curcina presentó los cambios sustanciales que ya se mencionaron en el párrafo anterior.

Los valores de CI_{50} (Tabla 13) muestran claramente que la inmunotoxina construida mediante aminación reductiva entre la curcina y el anti-Her2 permitió dirigir el efecto citotóxico a la célula blanco con una concentración mucho menor que la curcina no conjugada, resultado del reconocimiento del anti-Her2 por su receptor en el cultivo SK-BR-3.

Como es bien sabido, la elección del antígeno es un factor clave en la construcción de una inmunotoxina, ya que determinará la selectividad y la entrega

exclusiva de la toxina a las células blanco. Un antígeno ideal debería ser expresado únicamente en la célula cancerígena, sin embargo estos antígenos no se han identificado todavía. En esta investigación se eligió el receptor Her2 debido a que presenta dos características de alta importancia para el objetivo planteado, en primer lugar es un antígeno asociado al cáncer, de forma muy específica al cáncer de mama; y en segundo lugar, interviene en procesos de regulación celular que implican crecimiento y resistencia a apoptosis. Cabe recalcar que aunque se plantea que Her2 es un antígeno asociado al cáncer debido a que estas células sobreexpresan esta proteína hasta 100 veces, llegando a valores de hasta dos millones de copias por célula, las células normales también producen y tienen Her2 en sus membranas, en valores que van de 20 a 25 mil copias por célula.

El aumento en la citotoxicidad de la curcina en los fibroblastos cuando esta conjugada con el anti-Her2 implica que estas células presentan el antígeno Her2 o que la inmunotoxina presentó alguna característica que aumentó su velocidad de unión, introducción y/o metabolismo en este tipo de células. Como ya se mencionó anteriormente, los fibroblastos son células de tejido conectivo que intervienen en la reparación tisular y cicatrización de heridas, lo que implica alta capacidad de reproducción. Cuando los fibroblastos fueron tratados con curcina se obtuvo una CI_{50} de 353.4 $\mu\text{g/mL}$ y se concluyó que esta proteína no fue tóxica para este tipo de células, o quizá la respuesta de los fibroblastos fue tal que revirtió los efectos tóxicos; sin embargo, se observa que cuando fueron incubados con el anti-Her2 el valor de CI_{50} fue de 50.7 $\mu\text{g/mL}$, un incremento de toxicidad respecto a curcina. Esta respuesta implica que el anticuerpo contra Her2 tuvo la posibilidad de entrar a la célula de fibroblasto e inducir la muerte de la misma. Cuando este anticuerpo fue además conjugado con la curcina, se incrementa aún más la toxicidad en los fibroblastos, con una CI_{50} de 16.7 $\mu\text{g/mL}$, lo que de alguna manera confirma que el anti-Her2 fue capaz de reconocer y anclarse a los fibroblastos y conducir a la curcina hacia estas células para que llevara a cabo su efecto citotóxico. Para asegurar que la presencia de Her2 o algún otro antígeno en los fibroblastos intervino en el aumento de citotoxicidad de la inmunotoxina es necesario realizar estudios, que podrían ser de inmunohistoquímica, que permitan evidenciar si fue por vía del anticuerpo que se obtuvo este resultado.

A pesar de que la inmunotoxina curcina:anti-Her2 resultó más tóxica que la curcina para los fibroblastos, los valores de CI_{50} que se obtuvieron para cada línea celular cancerígena y las células sanas de fibroblastos permite concluir que esta inmunotoxina tiene una ventana terapéutica con potencial para su aplicación como terapia dirigida, ya que la diferencia entre CI_{50} de $2.2 \mu\text{g/mL}$ para la célula Her2+ contra $16.7 \mu\text{g/mL}$ para los fibroblastos es todavía amplia. Por otro lado, el valor de CI_{50} de $2.2 \mu\text{g/mL}$ para células Her2+ permite suponer que aún cuando el conjugado sufra hidrólisis durante su paso por el torrente sanguíneo, las cantidades de curcina y anti-Her2 liberada sería insuficiente para causar efectos tóxicos importantes en las células sanas, aunque esta última premisa se debe corroborar en estudios *in vivo* y con el cálculo matemático del índice terapéutico.

Con el mismo objetivo de incrementar el potencial terapéutico de la curcina mediante la construcción de conjugados, Zheng y cols. (2013) y Mohamed y cols. (2014) unieron esta proteína con diferentes moléculas. En el trabajo de Zheng y cols., la curcina se fusionó a un péptido de reconocimiento al receptor de transferrina y fue codificada como curcina-TfRBP9; este conjugado presentó significativa inhibición de proliferación en las células de cáncer de hígado HepG2, las cuales sobreexpresaron este receptor, mientras que las células de cáncer de mama SK-BR-3 y las células normales de hígado LO-2, con bajos niveles de expresión del receptor de transferrina, mostraron bajo efecto inhibitorio. Concluyendo finalmente que el conjugado curcina-TfRBP9 indujo mayor apoptosis en las células HepG2, y que a altas concentraciones de esta molécula híbrida se presentó una mayor diferencia con respecto a curcina sin conjugar (30 a 40%).

Mohamed y cols. (2014) conjugaron curcina con nanopartículas de oro PEGuiladas y las unieron a folato y a un anticuerpo de transferrina (Au-PEG-FOL-CUR-Tfr). Este conjugado mostró una fuerte e importante especificidad para la células cancerígenas de glioma, con 3% de viabilidad a $100 \mu\text{g/mL}$, mientras que las células sanas neuronales HCN-1A mostraron 90% de viabilidad a esta misma concentración. Finalmente concluyen que sus resultados fueron dosis-respuesta dependientes e

inversamente proporcionales a la concentración del conjugado, sin embargo no compararon con curcina sin conjuguar.

Inmunotoxinas contra Her2 ya han sido construidas mediante conjugación química desde los años 80's (Tabla 7), siendo las RIPs vegetales ricina, gelonina y saporina, las porciones tóxicas más usadas. Como ya se mencionó, las técnicas de conjugación reportadas para las inmunotoxinas han sido mediante derivatización con entrecruzadores que forman enlaces disulfuro entre ambos componentes de estas moléculas híbridas, con la principal desventaja de la inestabilidad y rompimiento de este enlace. Sin embargo, los reportes de toxicidad en estas inmunotoxinas son bastantes alentadores debido a que las concentraciones de CI_{50} han sido en escala de nano y picogramos.

Una de las RIPs ampliamente conjugada por el grupo de investigación italiano encabezado por Stirpe es la saporina, RIP tipo I proveniente de semillas de *Saponaria officinalis*. Esta RIP ha sido conjugada con una gran variedad de anticuerpos y por lo tanto ha sido dirigida a numerosos blancos, siendo más eficientes en cánceres hematológicos.

Las RIPs gelonina y ricina también han sido conjugadas químicamente con una gran variedad de anticuerpos y por un amplio número de investigadores.

Finalmente se puede concluir que el concepto de “bala mágica” postulado desde hace más de un siglo por Paul Ehrlich sigue siendo actual y con altas posibilidades de ser alcanzado debido a los avances en la tecnología de anticuerpos y en la biología de los receptores asociados al cáncer.

VIII. CONCLUSIONES

En esta investigación se aisló e identificó la proteína inactivadora de ribosomas curcina a partir de la torta residual de *Jatropha curcas* L. La curcina aislada presentó actividad N-glicosidasa característica de las RIPs, y su efecto citotóxico fue estadísticamente igual en las líneas celulares de cáncer de mama SK-BR-3 (CI₅₀ de 15.5 ± 8.3 µg/mL) y MDA-MB-231 (CI₅₀ de 18.6 ± 2.4 µg/mL). Esta proteína resultó más tóxica para las líneas celulares de cáncer de mama que para las células sanas de fibroblastos (CI₅₀ de 353.4 ± 41.9 µg/mL).

Para incrementar el potencial terapéutico de la curcina hacia las células de cáncer de mama se construyó una inmunotoxina constituida por esta proteína y un anticuerpo contra Her2 mediante aminación reductiva. La unión de estas proteínas fue “sitio-dirigida”, ya que involucró los residuos de carbohidratos de la curcina, los cuales fueron previamente oxidados con periodato de sodio, y los grupos ε-amino del fragmento cristalizable (Fc) del anti-Her2.

La inmunotoxina curcina:anti-Her2 resultó más tóxica para la línea celular SK-BR-3 (CI₅₀ de 2.2 ± 0.08 µg/mL), que sobreexpresa el antígeno Her2, que para la línea MDA-MB-231 (CI₅₀ de 147.6 ± 2.5 µg/mL), la cual no sobreexpresa este receptor. Por otro lado, la inmunotoxina fue más tóxica que la curcina para la línea SK-BR-3 y menos tóxica para la línea MDA-MB-231.

Estos resultados permiten concluir que la reacción de aminación reductiva puede ser un método rápido y “sitio-específico” para la construcción de inmunotoxinas, con la ventaja de no comprometer los sitios activos y permitir la acción de cada proteína involucrada en estas moléculas híbridas. Además de que se sugiere que la curcina conjugada con anti-Her2 presenta potencial terapéutico para desarrollar terapias dirigidas al cáncer Her2.

IX. PERSPECTIVAS

El desarrollo de este trabajo de investigación permite establecer una gran cantidad de perspectivas tanto para la curcina como para la inmunotoxina.

En el caso de la curcina resulta claro que se deben investigar los parámetros fisicoquímicos, cinéticos y estructurales de la molécula. Desde la perspectiva citotóxica, es necesario establecer los mecanismos de muerte celular que induce esta proteína, además de probar su actividad N-glicosidasa en ARN de hígado de ratón. Aun cuando Mohamed y cols. (2014) ya han dilucidado una amplia gama de efectos bioquímicos que se presentan en las células incubadas con curcina, será necesario establecer que funciones bioquímicas se ven alteradas por la curcina obtenida de semillas provenientes de México.

Respecto a la inmunotoxina, se propone caracterizar esta molécula para determinar por un lado el grado de conjugación, y por otro comprobar el punto de unión entre ambas moléculas. Además que se plantea establecer un diseño experimental que permite evaluar y determinar bajo que condiciones se obtiene el mayor rendimiento y actividad de esta molécula híbrida.

Otro factor importante sobre la inmunotoxina es establecer el mecanismo de anclaje y entrada a la célula, para dilucidar las vías por las que la molécula alcanza su organelo blanco.

Uno de los factores que limitan la conjugación es la cantidad de anticuerpo, por lo que resultaría mucho más conveniente producirlo y purificarlo en el laboratorio.

Finalmente se debe considerar realizar los estudios *in vivo* de esta inmunotoxina en modelos de ratón o conejo.

X. REFERENCIAS

1. American Cancer Society (2011) <http://www.cancer.org>
2. Álvarez, H.R. (2010) Present and future evolution of advanced breast cancer therapy. *Breast Cancer Research* 12(suppl 2): S1.
3. Ávila, A.D., Calderón, C.F., Pérez, R.M., Pons, C., Pereda, C.M., Ortiz, A.R. (2007) Construction of an immunotoxin by linking a monoclonal antibody against the human epidermal growth factor receptor and a hemolytic toxin. *Biol Res* 40: 173-183.
4. Azemar, M., Djahansouzi, S., Jäger, E., Solbach, C., Schmidt, M., Maurer, A.B., Mross, K., Unger, C., Minckwitz, G., Dall, P., Groner, B., Wels, W.S. (2003) Regression of cutaneous tumor lesions in patients intratumorally injected with a recombinant single-chain antibody-toxin targeted to ErbB2/HER2. *Breast Cancer Res. Treat.* 83(3): 155-164.
5. Bagga, S., Seth, D., Batra, K. (2003) The cytotoxic activity of ribosome-inactivating protein saporin-6 is attributed to its rRNA N-glycosidase and internucleosomal DNA fragmentation activities. *The Journal of Biological Chemistry* 278(7): 4813-4820.
6. Barbieri, L., Valbonesi, P., Bonora, E., Gorini, P., Bolognesi, A., Stirpe, F. (1997) Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Research* 25(3): 518-522.
7. Barbieri, L., Bolognesi, A., Stirpe, F. (2000) Purification and conjugation of type 1 ribosome-inactivating proteins. In *Methods in Molecular Biology* vol. 166: Immunotoxin Methods and Protocols. Hall, W.A. Ed. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA.
8. Baxter, E.W., Reitz, A.B. (2004) Reductive aminations of carbonyl compounds with borohydride and borane reducing agents. *Organic Reactions* 59(1): 1-170.
9. Bjorn, M.J., Ring, D., Frankel, A. (1985) Evaluation of monoclonal antibodies for the development of breast cancer immunotoxins. *Cancer Research* 45: 1214-1221.

10. Bolognesi, A., Polito, L., Scicchitano, V., Orrico, C. Pasquinelli, G., Musiani, S., Santi, S., Riccio, M., Bortolotti, M., Battelli, M.G. (2012) Endocytosis and intracellular localisation of type 1 ribosome-inactivating protein saporin-S6. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 26: 97–109.
11. Bonomi, P.D. (2006) Immunotoxins: the next generation. *Advances in Targeted Cancer Therapies* 4(4): 1-4.
12. Cao, Y., Marks, D.J., Marks, W.J., Cheung, H.L., Kim, S., Rosenblum, M.G. (2009) Construction and characterization of novel, recombinant immunotoxins targeting the Her2/neu oncogene product: in vitro and in vivo studies. *Cancer Research* 69(23): 8987-8995.
13. Cao, Y., Rosenblum, M.G. (2013) Design, development, and characterization of recombinant immunotoxins targeting HER2/neu. In: Antibody-drug conjugates and immunotoxins: from pre-clinical development to therapeutic applications. Cancer Drug Discovery and Development. Chapter 18 Phillips G.L. Ed. New York, USA. pp: 319-348.
14. Cao, Y., Marks, J.W., Cheung, L.H., Hittelman, W.N., Rosenblum, M.G. (2014) Design optimization and characterization of Her2/neu-targeted immunotoxins: comparative in vitro and in vivo efficacy studies. *Oncogene* 33(4): 429-439.
15. Choudhary, S., Mathew, M., Verma, R.S. (2011). Therapeutic potential of anticancer immunotoxins. *Drug Discovery Today* 16(11/12): 495-503.
16. DanDan, X., Bo, Z., YaDong, H., QiHao, Z., ZhiJian, S., Hua, X., Qing, Z. (2012) Expression of recombinant curcin in *Jatropha curcas* L and its anti-tumor activity in vitro. *Med. Plant.* 3(8): 68-71.
17. Daubenfeld, T., Hossan, M., Trommer, W.E., Niedner-Schatteburg, G. (2005) On the contentious sequence and glycosylation motif of the ribosome inactivating plant protein gelonin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333(3): 984-989.
18. Devappa, R.K., Makkar, H.P.S., Becker, K., (2010). Nutritional, biochemical and pharmaceutical potential of proteins and peptides from *Jatropha*: review. *J. Agric. Food Chem.* 58: 6543-6555.
19. Devappa, R.K., Makkar, H.P.S., Becker, K. (2011) *Jatropha* diterpenes: a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88: 301-322.
20. de Virgilio, M., Lombardi, A., Caliandro, R., Fabbrini, M.S. (2010) Ribosome-inactivating proteins: from plant defense to tumor attack. *Toxins* 2: 2699-2737.

21. Di Lazzaro, C., Digiesi, G., Tecce, R., Lotti, L.V., Torrissi, M.R., Natali, P.G. (1994) Immunotoxins to the HER-2 oncogene product: functional and ultrastructural analysis of their cytotoxic activity. *Cancer Immunol. Immunother.* 39: 318-324.
22. Dosio, F., Brusa, P., Cattel, L. (2011) Immunotoxins and anticancer drug conjugate assemblies the role of the linkage between components. *Toxins* 3: 848-883.
23. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356.
24. Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M., Tsurugi, K. (1987) The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. *The Journal of Biological Chemistry* 262(12): 5908-5912.
25. Endo, Y., Tsurugi, K. (1988) The RNA N-glycosidase activity of ricin a-chain. The characteristics of the enzymatic activity of ricin a-chain with ribosomes and with rRNA. *The Journal of Biological Chemistry* 263(18): 8735-8739.
26. Farkas, P., Bystricky, S. (2010) Chemical conjugation of biomacromolecules: A mini-review. *Chemical Papers* 64(6): 683-695.
27. Fernández, M.J., Pérez, P.V. (2006) El receptor de EGF (EGFR): una diana terapéutica para el tratamiento del cancer y sus inhibidores. *Biocáncer* 3.
28. Ferreras, J., Citores, L., Iglesias, R., Jiménez, P., Girbés, T. (2011) Use of ribosome-inactivating proteins from Sambucus for the construction of immunotoxins and conjugates for cancer therapy. *Toxins* 3: 420-441.
29. Fracasso, G., Stirpe, F., Colombatti, M. (2010) Ribosome-inactivating protein containing conjugates for therapeutic use. J.M. Lord and M.R. Hartley (eds.), Toxic Plant Proteins, Plant Cell Monographs 18, DOI 10.1007/978-3-642-12176-0_12, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 225-263.
30. Gadadhar, S., Karande, A.A. (2013) Abrin immunotoxin: Targeted cytotoxicity and intracellular trafficking pathway. *PLOS ONE* 8(3)
31. Ghetie, V., Vitetta, S.E. (2001) Chemical construction of immunotoxins. *Molecular Biotechnology* 18: 251-268.
32. Girbés, T.J. (2000) Proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) y sus aplicaciones en la construcción de inmunotoxinas para la terapia experimental del cáncer. *Anal. Real Acad. Farm.* 66(3): 1-21.

33. Gómez-Pompa, A., Marín, A.A., Campo, G.J., Domínguez, L.J., Cano, A.L., Segura, J.L., Cuéllar, M.M., Fernández, S.M., Sánchez, S.O., Lozoya, X. (2009) La XUTA se come. Kin chutacan wakan. Xuta, *Jatropha*, Piñon o Aishte Patrimonio del Totonacapan. Universidad Veracruzana, México.
34. GlyProt. Disponible en: <http://www.glycosciences.de/modeling/glyprot/php/main.php>. Accesado en Octubre 2013.
35. Hermanson, T.G. (2013) *Bioconjugate Techniques*. 3rd ed.; Academic Press: New York, NY, USA.
36. Huang, M-X., Hou, P., Wei, Q., Hu, Y., Chen, F. (2008) A ribosome-inactivating protein (curcin 2) induced from *Jatropha curcas* can reduce viral and fungal infection in transgenic tobacco. *Plant Growth Regul.* 54: 115-123.
37. Hwu, L., Huang, K.Ch., Chen, D.T., Lin, A. (2000) The action mode of the ribosome-inactivating protein a-sarcin. *Journal of Biomedical Science* 7: 420-428.
38. INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2011) <http://www.inegi.gob.mx>.
39. INIFAP. Disponible en: http://agromapas.inifap.gob.mx/int_jatropha.html. Accesado en 2012.
40. I-TASSER. Disponible en: <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>. Accesado en Octubre 2013.
41. Jasheway, K., Pruet, J., Anslyn, E.V., Robertus, J.D. (2011) Structure-based design of ricin inhibitors. *Toxins* 3: 1233-1248.
42. King, J.A., He, W., Cuevas, J.A., Freudenberg, M., Ramiamanana, D., Graham, I.A. (2009) Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. *Journal of Experimental Botany* 60(10): 2897-2905.
43. Kittikajhon, S., Roytrakul, S., Wetprasit, N., Ratanapo, S. (2009) Purification of curcin from physic nut (*Jatropha curcas* Linn) and identification of its antimicrobial effect. Proceedings for the 2nd. Biochemistry and Molecular Biology Conference
44. Knaul, F.M., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A., Frenk, J. (2009) Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública de México* 51(suplemento 2): 335-344.

45. Kondo, T., Yoshikawa, T. (2007) Purification and characterization of abesculin, a novel ribosome-inactivating protein from the mature seeds of *Abelmoschus esculentus*. *J. Nat. Med.* 61: 170-174.
46. Kumar, O., Singh, Y., Kothari, V., Vijayaraghavan, R. (2008) Purification and biochemical characterization of curcin toxin from *Jatropha curcas* seeds. *Journal of Cell and Tissue Research* 8(2): 1425-1430.
47. Kuroda, K., Liu, H., Kim, S., Guo, M., Navarro, V., Bander, N.H. (2010) SAP toxin-conjugated monoclonal antibody targeting prostate-specific membrane antigen has potent anticancer activity. *Prostate* 70: 1286-1294.
48. Lahera, S.T., González, H.J. (2010) El receptor del factor de crecimiento epidérmico y su papel en el desarrollo tumoral. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* 9(2): 172-180.
49. Li, Z., Trick, H.N. (2005) Rapid method for high-quality RNA isolation from seed endosperm containing high levels of starch. *BioTechniques* 38(6), 872-876.
50. Lin, J., Yan, F., Tang, L., Chen, F., (2003) Antitumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas*. *Acta Pharmacol. Sin.* 24 (3): 241-246.
51. Lin, J., Chen, Y., Xu, Y., Yan, F., Tang, L., Chen, F. (2003b) Cloning and expression of curcin, a ribosome-inactivating protein from the seeds of *Jatropha curcas*. *Acta Botanica Sinica* 45(7): 858-863.
52. Lin, J., Zhou, X., Wang, J., Jiang, P., Tang, K., (2010) Purification and characterization of curcin, a toxin lectin from the seed of *Jatropha curcas*. *Biochemistry and Biotechnology* 40(2): 107-118.
53. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnel, J. (2000) Cell-to-cell signaling: hormones and receptors. *Molecular Cell Biology* 4th ed. Freeman, WH Eds. Chapter 20.
54. Luo, M., Yang, X., Liu, W., Xu, Y., Huang, P., Yan, F., Chen, F. (2006) Expression, purification and anti-tumor activity of curcin. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 38(9): 663-668.
55. Mahmud, H., Dälken, B., Wels, W. (2009) Induction of programmed cell death in ErbB2/HER2-expressing cancer cells by targeted delivery of apoptosis-inducing factor. *Mol. Cancer Ther.* 8(6): 1526-1535.

56. Makkar, H.P.S., Becker, K., Sporer, F., Wink, M. (1997) Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3152-3157.
57. Makkar, H.P.S., Becker, K. (2009) Challenges and opportunities for using byproducts from the production of biodiesel from *Jatropha* oil as livestock feed. Proceedings of Animal Nutrition Association World Conference. New Delhi, India. 168-170.
58. Maraganore, M.J., Joseph, M., Bailey, C.M. (1987) Purification and characterization of trichosanthin. *The Journal of Biological Chemistry* 262(24): 11628-11633.
59. Martínez-Herrera, J. (2006) Caracterización genético, nutricional y no nutricional de *Jatropha curcas* L. de México. Tesis Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México.
60. Martínez-Herrera, J., Siddhuraju, P., Francis, G., Dávila-Ortiz, G., Becker, K. (2006) Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their level, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from México. *Food Chemistry* 96: 80-89.
61. McCall, A.M., Adams, G.P., Amoroso, A.R. (1999) Isolation and characterization of an anti-CD16 single-chain Fv fragment and construction of an anti-Her2/neu/antiCD16 bispecific scFv that triggers CD16-dependent tumor cytotoxicity. *Mol Immunol.* 36:433-445.
62. MOE. http://www.chemcomp.com/MOE-Molecular_Modeling_and_Simulations. Accesado en Octubre 2013.
63. Mohamed, M.S., Veerananarayanan, S., Poulouse, A., Nagaoka, Y., Minegishi, H., Yoshida, Y., Maekawa, T., Kumar, D.S. (2014) Type 1 ribotoxin-curcumin conjugated biogenic gold nanoparticles for a multimodal therapeutic approach towards brain cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1840(6): 1657-1669.
64. Mohamed, M.S., Veerananarayanan, S., Minegishi, H., Sakamoto, Y., Shimane, Y., Nagaoka, Y., Aki, A., Poulouse, A.C., Echigo, A., Yoshida, Y., Maekawa, T., Kumar, D.S. (2014) Cytological and subcellular response of cells exposed to the type-1 RIP curcumin and its hemocompatibility analysis. *Scientific Reports* 4: 5747 DOI: 10.1038/srep05747.

65. Muñoz, R., Aria, Y., Ferreras, J.M., Jiménez, P., Langa, C., Rojo, M.A., Gayoso, M.J., Córdoba-Díaz, D., Bernabéu, C., Girbés, T. (2013) *In vitro* and *in vivo* effects of an anti-mouse endoglin (CD105)-immunotoxin on the early stages of mouse B16MEL4A5 melanoma tumours. *Cancer Immunol Immunother* 62: 541-551.
66. Nakane, P.K., Kawaoi, A. (1974) Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 22(12): 1084-1091.
67. Narayanan, S., Surolia, A., Karande, A. (2004) Ribosome-inactivating protein and apoptosis: abrin causes cell death via mitochondrial pathway in Jurkat cells. *Biochem J.* 377: 233-240.
68. National Cancer Institute (2011) <http://www.cancer.gov>
69. Nayak, B.S., Patel, K.N. (2009) A Marvel Plant-Jatropha: an appraisal. *International Journal of Pharmaceutical Research* 1(3): 35-39.
70. NCBI. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Accessed on October 2013.
71. Nielsen, K., Boston, R.S. (2001) Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 785-816
72. Olmo, N., Turnay, J., González de Buitrago, G., López de Silanes, I., Gavilanes, J., Lizarbe, M. (2001) Cytotoxic mechanism of the ribotoxin α -sarcin Induction of cell death via apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 268: 2113-2123.
73. Pabón, G.G. (2009) Estudio de las características botánicas y etnobotánicas de Jatropha (*Jatropha curcas* L). Cultivos energéticos alternativos. Recalde, P.E. y Durán, A.J. Eds. CIITTOL www.pucesi.edu.ec/files/bookcultivosenergeticos09.pdf
74. Pai-Scherf, L.H., Villa, J., Pearson, D., Watson, T., Liu, E., Willingham, M.C., Pastan, I. (1999) Hepatotoxicity in cancer patients receiving erb-38, a recombinant immunotoxin that targets the erbB2 receptor. *Clin. Cancer Res.* 5: 2311-2315.
75. Parente, A., Conforto, B., Di Maro, A., Chambery, A., De Luca, P., Bolognesi, A., Iriti, M., Faoro, F. (2008) Type 1 ribosome-inactivating proteins from *Phytolacca dioica* L leaves: differential seasonal and age expression, and cellular localization. *Planta* 228: 963-975.
76. Park, S-W., Vepachedu, R., Sharma, N.M., Vivanco, J.M. (2004) Ribosome-inactivating proteins in plant biology. *Planta* 219: 1093-1096.
77. Pastan, I., Hassan, R., FitzGerald, D., Kreitman, R.J. (2007) Immunotoxin treatment of cancer. *Annu. Rev. Med.* 58: 221-237.

78. Pennell, C.A., Erickson, H.A. (2002) Designing immunotoxins for cancer therapy. *Immunologic Research* 25(2): 177-191.
79. Polito, L., Botolotti, M., Mercatelli, D., Batteli, M.G., Bolognesi, A. (2013) Saporin-S6: a useful tool in cancer therapy. *Toxins* 5: 1698-1722.
80. PROCHECK. Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>. Accesado en Octubre 2013.
81. Qin, W., Huang, M., Xu, Y., Zhang, X., Chen F. (2005) Expression of a ribosome inactivating protein (curcin 2) in *Jatropha curcas* is induced by stress. *J. Biosci* 30(3): 351-357.
82. Qin, X., Zhang, J., Shao, C., Lin, S., Jiang, L., Zhang, S., Xu, Y., Chen, F. (2009) Isolation and characterization of a curcin promoter from *Jatropha curcas* L and its regulation of gene expression in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 27: 275-281.
83. Qin, X, Zheng, X., Shao, C., Gao, J., Jiang, L., Zhu, X., Yan, F., Tang, L., Xu, Y., Chen, F. (2009b) Stress-induced curcin-L promoter in leaves of *Jatropha curcas* L. and characterization in transgenic tobacco. *Planta* 230: 387-395.
84. Qiu, X., Xu, Y., Wang, F., Fan, Q., Wang, L., Ma, B., Jia, L., Zhao, J., Meng, Y., Yao, L., Chen, S., Yang, A. (2008) Single-chain antibody/activated BID chimeric protein effectively suppresses HER2-positive tumor growth. *Mol. Cancer Ther.* 7(7): 1890-1899.
85. Reyes, A.A. (2008) Proteína inactivadora de los ribosomas de *Streptomyces coelicolor*. Tesis Maestría en Biotecnología. UAM-Ixtapalapa.
86. Rosenblum, G.M., Shawver, K.L., Marks, W.J., Brink, J., Cheung, L., Langton-Webster, B. (1999) Recombinant immunotoxins directed against the c-erb-2/HER2/neu oncogene product: in vitro cytotoxicity pharmacokinetics, and in vivo efficacy studies in xenograft models. *Clinical Cancer Research* 5: 865-874.
87. Rosenblum, G.M., Shawver, K.L. (2005) PATENTE US 2005/0163774 A1. Immunotoxins directed against C-ERBB-2(HER-2/NEU) related surface antigens.
88. Rustamzadeh, E., Low, W., Vallera, D. Hall, W. (2003) Immunotoxin therapy for CNS tumor. *Journal of Neuro-Oncology* 64: 101-116.
89. SAGARPA (2008) Programa de producción sustentables de insumos para bioenergéticos y de desarrollo científico y tecnológico. www.sagarpa.gob.mx/agricultura/.../PROINBIOS_20091013.pdf.

90. Sandeep, K. (2011) Anti-malignant property of curcin through inhibition of tyrosine kinase as evidenced by *in-silico* study. Thesis of Bachelor Degree. National Institute of Technology, Rourkela.
91. SEMARNAT, INE, UNAM, CIECO (2008) Análisis integrado de las tecnologías, el ciclo de vida y la sustentabilidad de las opciones y escenarios para el aprovechamiento de la bioenergía en México. www.ine.gob.mx/descargas/cclimatico/e2008e_bioenergia.pdf.
92. Shan, L., Liu, Y., Wang, P. (2013) Recombinant immunotoxin therapy of solid tumors: challenges and strategies. *J. of Basic Clinical Medicine* 2(2): 1-6.
93. Sharma, N., Park, S.W., Vepachedu, R., Barbieri, L., Ciani, M., Stirpe, F., Savary, B.J., Vivanco, M.J. (2004) Isolation and characterization of an RIP (Ribosome-inactivating protein)-like protein from tobacco with dual enzymatic activity. *Plant Physiology* 134: 171-181.
94. Sivam, G., Pearson, J.W., Bohn, W., Oldham, R.K., Sadoff, J.C., Morgan Jr., A.C. (1987) Immunotoxins to a human melanoma-associated antigen: comparison of gelonin with ricin and other A-chain conjugates. *Cancer Research* 47: 3169-3173.
95. Stirpe, F., Pession-Brizzi, A., Lorenzoni, E., Strocchi, P., Montanaro, L., Sperti, S. (1976) Studies on the protein from seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas*. *Biochem J.* 156: 1-6.
96. Stirpe, F. (2004) Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* 44: 371-383.
97. Stirpe, F., Battelli, M. (2006) Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cellular Molecular Life Sciences* 63: 1850-1866.
98. Surash, S., Nemeth, P., Chakrabarty, A., Chumas, P. (2011) The conjugation of an AQP1-directed immunotoxin in the study of site-directed therapy within the CNS. *Childs Nerv Syst* 27: 811-818.
99. SWEET-II. Disponible en: <http://www.glycosciences.de/modeling/sweet2/>. Accesado en Octubre 2013.
100. Tecce, R., Digiesi, G., Savarese, A., Trizio, D., Natali, P.G. (1993) Characterization of cytotoxic activity of saporin anti-gp185/HER-2 immunotoxins. *Int J Cancer* 55(1): 122-127.
101. Teicher, B.A., Chari, R.V.J. (2011) Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. *Clin Cancer Res.* 17: 6389-6397.

102. Tumer, N.E., Hwang, D-J., Bonnes, M. (1997) C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral protein inhibits viral infection but does not depurinate host ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 3866-3871.
103. von Minckwitz, G., Harder, S., Hövelmann, S., Jäger, E., Al-Batran, S-E., Loibl, S., Atmaca, A., Cimpoiasu, C., Neumann, A., Abera, A., Knuth, A., Kaufmann, M., Jäger, D., Maurer, A.B., Wels, W.S. (2005) Phase I clinical study of the recombinant antibody toxin scFv(FRP5)-ETA specific for the ErbB2/HER2 receptor in patients with advanced solid malignomas. *Breast Cancer Res*. 7(5): R617-R626.
104. Vooijs, W.C., Post, J., Wijdenes, J., Schuurman, H.J., Bolognesi, A., Polito, L., Stirpe, F., Bast, E.J.E.G., de Gast, G.C. (1996) Efficacy and toxicity of plasma-cell-reactive monoclonal antibodies B-B2 and B-B4 and their immunotoxins. *Cancer Immunol Immunother* 42: 319-328.
105. Wang, Ch., Jetzt, A., Cheng, J., Cohick, W. (2011) Inhibition of the unfolded protein response by ricin A-chain enhances its cytotoxicity in mammalian cells. *Toxins* 3: 453-468.
106. Xia, H.C., Li, Z., Zhang, Z.C. (2003) Purification and characterization of moschatin, a novel type I ribosoma-inactivating protein from the mature seeds of pumpkin (*Cucurbita moschata*), and preparation of its immunotoxin against human melanoma cells. *Cell Research* 13(5): 369-374.
107. Zhao, Q., Wang, W., Wang, Y., Xu, Y., Chen, F. (2012) The effect of curcin from *Jatropha curcas* on apoptosis of sarcoma-180 cells. *Fitoterapia* 83: 849-852.
108. Zhou, X., Ji, F., Zhao, J., Cheng, L., Xu, C. (2010) Anti-cancer activity of anti-p185HER-2 ricin A chain immunotoxin on gastric cancer cells. *J Gastroenterology Hepatology* 25: 1266-1275.
109. Zheng, Q., Xiong, Y., Su, Z., Zhang, Q., Dai, X., Li, L., Xiao, X., Huang, Y. (2013) Expression of curcin-transferrin receptor binding peptide fusion protein and its anti-tumor activity. *Protein Expression and Purification* 89: 181-188.
110. Zuberbühler, K., Casi, G., Bernades, G.J.L., Neri, D. (2012) Fucose-specific conjugation of hydrazide-derivatives to a vascular targeting monoclonal antibody in IgG format. Electronic Supplementary Material for Chemical Communications 48: 7100-7102.
111. PATENTE 5,169,774. Monoclonal anti-human breast cancer antibodies. 1992 A.E. Frankel; D.B. Ring; W, Laird.

XI. ANEXOS

ScholarOne Manuscripts

Página 1 de 2

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry

Decision Letter (BBB-140804.R1)

From: urade@kais.kyoto-u.ac.jp

To: alayala@ipn.mx

CC: pjaramillo4@hotmail.com, neocontis@hotmail.com, aromeror2002@yahoo.com.mx, saulrohe@yahoo.com.mx, citlicampos@gmail.com, alayala@ipn.mx

Subject: Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry - Decision on Manuscript ID BBB-140804.R1

Body: 17-Dec-2014

Dear Dr. Martínez-Ayala:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Cytotoxic effect of the immunotoxin constructed of the ribosome-inactivating protein curcin and the monoclonal antibody against Her2 receptor on tumour cells." in its current form for publication in the Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Reiko URADE
Editor, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry
urade@kais.kyoto-u.ac.jp
Sincerely,
Dr. Tadao ASAMI
Editor in Chief, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry
asami@pgr1.ch.a.u-tokyo.ac.jp

Date Sent: 17-Dec-2014

 Close Window

https://mc.manuscriptcentral.com/bbb?PARAMS=xik_41uWdXSk5uULGYAsK1UL8Ke... 08/01/2015

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry

Cytotoxic effect of the immunotoxin constructed of the ribosome-inactivating protein curcin and the monoclonal antibody against ErbB2 receptor on tumour cells.

Journal:	<i>Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry</i>
Manuscript ID:	BBB-140804
Manuscript Type:	Regular Paper
Date Submitted by the Author:	11-Nov-2014
Complete List of Authors:	Jaramillo-Quintero, Lidia; Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada Contis Montes de Oca, Arturo; Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Medicina Romero Rojas, Andrés; Universidad Nacional Autónoma de México, FES-Cuautitlán Rojas Hernández, Saúl; Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Medicina Campos Rodríguez, Rafael; Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Medicina Martínez-Ayala, Alma Leticia; Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos
Keywords:	Her2, chemical conjugation, reductive amination, targeted therapy, breast cancer
Subject Categories:	Organic Chemistry
Classification of Research Fields:	II - 2) Isolation and Structure Determination of Bioactive Substances < II. Organic Chemistry and Chemistry of Natural Products, II - 3) Biosynthesis and Metabolism < II. Organic Chemistry and Chemistry of Natural Products

SCHOLARONE™
Manuscripts

Japan Science and Technology Information Aggregator, Electronic (J-STAGE)

1 Lidia Patricia Jaramillo Quintero¹, Arturo Contis Montes de Oca², Andrés Romero Rojas³,
2 Saúl Rojas Hernández², Rafael Campos Rodríguez² and Alma Leticia Martínez Ayala^{4,*}

3 ¹ *Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA-*
4 *IPN), Ex Hacienda San Juan Molino carretera estatal Tecuexcomac, Tepetitla Km 1.5,*
5 *Tlaxcala México 90700; e-mail: pjaramillo4@hotmail.com.*

6 ² *Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Medicina (ESM-IPN), Salvador Díaz*
7 *Mirón esq. Plan de San Luis, Casco de Santo Tomás, Cd. de México, D.F. 11340; e-mail:*
8 *neocontis@hotmail.com, saulrohe@yahoo.com.mx, citlicampos@gmail.com.*

9 ³ *Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán*
10 *(FES-Cuautitlán UNAM), Av. 1º. de mayo s/n Santa María las Torres, Cuautitlán Izcalli,*
11 *Estado de México 54740; e-mail: aromeror2002@yahoo.com.mx.*

12 ⁴ *Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI-*
13 *IPN), Carretera Yautepec-Jojutla Km 6, calle CEPROBI No. 8 San Isidro, Yautepec*
14 *Morelos México 62731. Apartado postal 24; e-mail: alayala@ipn.mx.*

15 * *Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: alayala@ipn.mx;*
16 *Tel.: 525557296000 ext. 82500.*

17 The research was conducted in:

18 Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA-
19 IPN), Ex Hacienda San Juan Molino carretera estatal Tecuexcomac, Tepetitla Km 1.5,
20 Tlaxcala México 90700

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 Cytotoxic effect of the immunotoxin constructed of the ribosome-inactivating protein
33 curcin and the monoclonal antibody against ErbB2 receptor on tumour cells.

34

35 **Abstract:**

36 The toxicity of the curcin on cancer cells allowed consider this protein as the toxic
37 component of an immunotoxin directed to ErbB2, which is associated with cancer.
38 Reductive amination was proposed to conjugate curcin and an anti-ErbB2; the binding
39 was tested using SDS-PAGE, western blot and immunocytochemistry. The *in vitro*
40 cytotoxicity of curcin and the immunotoxin was assessed on breast cancer cell lines SK-
41 BR-3 (Her2+), and MDA-MB-231 (Her2-). IC₅₀ values for curcin were 15.5 ± 8.3 and
42 18.6 ± 2.4 µg/mL respectively, statistically equivalent (p<0.05). While to the
43 immunotoxin was 2.2 ± 0.08 for SK-BR-3 and 147.6 ± 2.5 µg/mL for MDA-MB-231.
44 These values showed that the immunotoxin was seven times more toxic to the SK-BR-3
45 than curcin and eight times less toxic to the MDA-MB-231. The immunotoxin composed
46 of curcin and an antibody against Her2 and constructed by reductive amination could
47 be a therapeutic candidate against Her2+ cancer.

48 Keywords: Her2; chemical conjugation; reductive amination; targeted therapy; breast cancer

49 **Introduction**

50 The human epidermal growth factor receptors (ErbB or Her) are a family of four signal
51 transduction proteins with intracellular domains that have tyrosine kinase activity. These
52 receptors are involved in the normal regulation of cell growth, morphogenesis and
53 differentiation. Her2, or ErbB2, is widely expressed in epithelial cells and plays a central role
54 in a number of cellular processes, including proliferation, motility, and resistance to
55 apoptosis. Amplification or overexpression of Her2 disrupts normal cell-control mechanisms
56 and gives rise to aggressive tumour cells, notably in Her2 positive or Her2+ breast cancer
57 (30%) and some other cancer types (including ovarian, stomach, bladder, salivary and lung).
58 Overexpression of the Her2 receptor is associated with poor prognosis, aggressive tumour
59 growth and metastasis.[1]

60 The important role of Her2 in cancer progression and its biological characteristics make
61 it a highly attractive target for the therapeutic treatment of cancer. Targeted therapies are
62 transforming treatments and have already begun to make personalized medicine a reality. In

63 fact, a monoclonal antibody against Her2, Herceptin (also known as trastuzumab), is
64 currently in use as a specific treatment against breast cancer.[2]

65 One class of targeted therapies are immunotoxins, which are bifunctional proteins
66 constructed by covalently linking a monoclonal antibody (Mab) and a toxin. The targeting
67 moiety recognizes and delivers the whole molecule to the specific receptors on the cell
68 surface of the malignant cells. The toxin then triggers cell death, either by reaching the
69 cytosol and catalytically inactivating vital cell processes or by modifying the tumour cell
70 membrane, allowing for the selective elimination of the cells expressing the antigen
71 recognized by the Mab.[3-5]

72 The toxins used for building immunotoxins include ribosome-inactivating proteins
73 (RIPs), which are N-glycosidases enzymes that inhibit protein synthesis by selectively
74 cleaving a specific adenine residue from a highly conserved structure in 28S rRNA.[6] These
75 enzymes show depurination activity against eukaryotic and prokaryotic rRNA.[7] A broad
76 spectrum of activities is attributed to RIPs, encompassing antiproliferative, antitumor,
77 immunomodulatory, antiviral, antifungal and anti-insect functions. For this reason, the
78 interest in RIPs in possible medical and therapeutical applications is increasing. Several of
79 these proteins have been found to be more toxic to tumour cells than to normal cells and thus
80 offered a theoretical opportunity for the development of antitumor drugs that selectively
81 target tumour cells.[8-11]

82 To improve the selective potency, the conjugate should preferentially release the active
83 agent in or around the tumour tissue. Thus, the characteristics of the targeting agent, the
84 biodegradability of the linkage, and the potency of the bioactive anticancer agent are essential
85 in the immunotoxins.[12-13]

86 Immunotoxins have evolved with time and technology, and can be divided into three
87 generations. First-generation immunotoxins were prepared by chemically coupling whole
88 toxins to antibodies; second-generation immunotoxins were produced by chemical
89 conjugation but with modified toxins where the cell-binding domains were removed; and
90 third-generation immunotoxins were made by recombinant DNA techniques and as a group
91 are called recombinant immunotoxins.[14-15]

92 Although several authors mention that recombinant techniques are the best way to link
93 the Mab and the toxin, the immunogenicity and clearance remains the principal
94 inconvenience. Chemical conjugation presents a wide range of methods for conjugating
95 proteins, however its principal difficulty is the heterogeneity of the products.

96 Reductive amination is one of the most popular methods for the preparation of
97 glycoconjugates, especially from unprotected free mono- and oligosaccharides. In brief, free
98 aldehydes and ketones react with amines to form unstable imines or Schiff bases (reversible
99 reaction), which are then converted to stable secondary amines using a reducing agent. [16]
100 This reaction is greatly advantageous in that it does not require derivatization of the proteins
101 and could be site-specific.

102 In the present study, an immunotoxin was constructed by chemical conjugation through
103 sugar oxidation and reductive amination between the ribosome-inactivating protein curcin
104 and the monoclonal antibody against the Her2 receptor. The differential cytotoxicity of this
105 immunotoxin was probed *in vitro* on cell lines SK-BR-3 (Her2+) and MDA-MB-231 (Her2-).

106 **Methods**

107 *Chemical and biological materials*

108 All of the chemicals used were of analytical research grade. Sodium periodate (NaIO₄),
109 sodium cyanoborohydride (NaBH₃CN), ethylene glycol (C₂H₆O₂), Sephadex G-200, 3-(4,5-
110 dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), Dulbecco's modified
111 Eagle's medium high glucose (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), penicillin-streptomycin
112 solution, complete and incomplete Freund's adjuvant, the ProteoSilver™ silver stain kit,
113 dimethyl sulfoxide (DMSO), SP-Sepharose, CM-Sepharose and all of the salts, acids and
114 bases compounds used in this investigation were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis,
115 MO, US). The SK-BR-3 (HTB-30) cell culture and McCoy's 5A medium (No. 30-2007) were
116 obtained from ATCC (Manassas, VA, US). The MDA-MB-231 cell culture was a kind gift
117 from Dr. C. Ordaz (ESMyH-IPN, México). Reagents and materials for the electrophoresis
118 and electroblotting methods were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, US). The goat
119 anti-rabbit IgG and anti-mouse IgG secondary antibody HRP conjugate, the glycoprotein
120 staining kit, 4-chloro-1-naphthol and the DAB substrate kit (3,3'-diaminobenzidine
121 tetrahydrochloride) were purchased from Thermo Scientific (Rockford, IL, US).

122

123 *Monoclonal antibody against ErbB2/Her2 receptor*

124 The antibody against the Her2 receptor was purchased from R&D Systems. Anti-Erb2 is
125 a monoclonal mouse IgG2B clone #191924, obtained by protein A or G purification from a
126 hybridoma culture supernatant with reactivity to human ErbB2/Her2. The immunogen to this
127 antibody was the mouse myeloma cell line NS0-derived recombinant human ErbB2/Her2

128 Thr23-Thr652, accession # P04626. The anti-Her2 detects human ErbB2/Her2 receptor in
129 ELISAs and western blots. This antibody does not cross-react with the other receptors of this
130 family (EGFR, ErbB3 and ErbB4).

131

132 *Curcin isolation from J. curcas L seeds*

133 Briefly, seeds of *J. curcas* L (voucher number 2011 IZTA) were decorticated, ground
134 and defatted with hexane. The powder was added to 1:3 (w/v) 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7,5,
135 0,15 M NaCl and continuously stirred at 4°C overnight. The homogenate was further purified
136 by two rounds of ion exchange chromatography. First, the homogenate was applied to an SP-
137 Sepharose column preequilibrated with 10 mM sodium acetate buffer, pH 4,5, followed by
138 elution of the column with 3 volumes of 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7,0 adjusted
139 with 1 M NaCl. Next, fractions containing crude curcin were applied to a CM-Sepharose
140 column and curcin was eluted sequentially with a stepwise gradient of NaCl (0,3, 0,6 and 1,0
141 M) in 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7,0. Finally, those fractions with curcin were
142 pooled and dialyzed with distilled water and were concentrated using a Stirred Ultrafiltration
143 Cell 8050 (Amicon, Beverly, MA) with a 10kDa MWCO membrane, freeze-dried and stored
144 at -70°C.

145

146 *Physicochemical and biological characterization of curcin*

147 The properties of curcin, including its molecular weight, isoelectric point (pI) and
148 sequence, were determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The
149 enzymatic rRNA N-glycosidase activity of curcin was carried out using RNA from *J. curcas*
150 L seeds, the RNA was extracted according to Li et al. [17], and the enzymatic activity was
151 done with a modified method according to Endo et al. [18] and Tumer et al. [19]. The total
152 neutral sugar content was determined using the phenol sulphuric acid method as Dubois et al.
153 [20], and the glycosylation of curcin was detected on a polyacrylamide gel with a Pierce
154 Glycoprotein Staining Kit. The total protein concentration was measured by the Bradford
155 protein assay using BSA as standard.[21]

156

157 *In silico modelling of curcin*

158 To determine the availability of the glycan moiety in curcin and the feasibility of its
159 oxidation, the three-dimensional (3D) structure of this glycosylated protein was modelled *in*
160 *silico*.

161 The sequence of the accession ACO53803.1 of GenBank was modelled with the I-
162 TASSER server.[22] The quality of the best curcin 3D model was inspected using the
163 Ramachandran Plot analysis.[23] The predicted model was glycosylated at N-266 and N-274
164 according to Lin et al. [8] and with the oligosaccharide GlcNAc2Man3Xyl [24] constructed
165 using SWEET-II.[25] The *in silico* glycosylation was performed using the web-based tool
166 GlyProt.[26] Sugar oxidation was simulated by transforming the vicinal OH groups of
167 mannose into aldehydes with MOE software and the final model was optimized by energy
168 minimization with MOE software.[27]

169

170 *Cell cultures SK-BR-3 (Her2+) and MDA-MB-231 (Her2-)*

171 The human breast adenocarcinoma cell line SK-BR-3, which overexpresses the antigen
172 Her2 on its surface, was cultured in McCoy's 5A medium supplemented with heat-inactivated
173 FBS to a final concentration of 10% (v/v). This cell line was catalogued as Her2+.

174 The human breast adenocarcinoma cell line MDA-MB-231, which does not overexpress
175 the antigen Her2 on its surface, was cultured and maintained in DMEM supplemented with
176 10% (v/v) heat-inactivated FBS and 1% penicillin-streptomycin. This cell line was
177 catalogued as Her2-.

178 The cell cultures were maintained as monolayer cultures and incubated at 37°C in a
179 humidified atmosphere with 5% CO₂ (v/v). For all of the experiments, cells were grown to
180 80-90% confluence and were harvested using trypsin-EDTA.

181

182 *Development of antibodies against curcin*

183 Polyclonal antibodies against curcin were produced in New Zealand white rabbits.
184 Animals were immunized with 1 mg of curcin dissolved in 1 mL of PBS, which was divided
185 into three doses at weekly intervals. The first two immunizations were administered
186 subcutaneously. For the first immunization, the curcin solution was emulsified with complete
187 Freund's adjuvant, and for the second immunization, incomplete Freund's adjuvant was used.
188 The third immunization was administered intramuscularly with the curcin solution in 3 mL of
189 saline solution. Seven days after the last immunization, the rabbits were anesthetized with
190 pentobarbital. Serum samples were obtained from blood extracted by cardiac puncture and
191 stored at -70°C.

192 The antibodies were purified by affinity chromatography on a Protein A column, and the
193 anti-curcin antibody was detected by SDS-PAGE and western blot using curcin as the antigen

194 and an anti-rabbit IgG-HRP conjugate as the secondary antibody. The purified anti-curcin
195 was stored at -20°C.

196

197 *Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot analysis*

198 SDS-PAGE was performed according to the method of Laemmli [28]. The protein
199 samples (20 µg) were mixed with the sample buffer either with or without 2-mercaptoethanol
200 (ME) and heated at 100°C for 5 minutes. The samples were applied to 7,5, 10 or 12%
201 polyacrylamide gels, and electrophoretic separation was performed at 120 V for 90 minutes.
202 Coomassie Blue or silver nitrate were used to stain the protein bands.

203 To the western blot analysis, the resolved proteins by electrophoresis were electro-
204 transferred to a 0,45µm nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Membranes were blocked in
205 10% skim milk or 1% bovine serum albumin in PBS-Tween (PBS-T) for 4 h at room
206 temperature and then incubated in the appropriate primary antibody overnight at 4°C. After
207 incubation, the membrane was washed and exposed to either anti-rabbit IgG-HRP or anti-
208 mouse IgG-HRP conjugate as the secondary antibodies. Between each step, the nitrocellulose
209 strips were washed with PBS-T. Peroxidase activity was detected with 4-chloro-1-naphthol
210 and H₂O₂ as the substrate.

211

212 *Preparation of the immunotoxin curcin:anti-Her2 via reductive amination*

213 The immunotoxin was constructed by linking curcin to the monoclonal antibody anti-
214 Her2 via sugar oxidation and reductive amination. Briefly, the sugars present on 5 mg of
215 curcin were oxidized with a freshly prepared 10 mM sodium periodate solution. Samples
216 were incubated for 30 minutes at room temperature in the dark with gentle shaking, leading to
217 the formation of reactive aldehyde groups. The oxidation was stopped with 1 mL of 0,16 M
218 ethylene glycol for 60 minutes in the dark at room temperature with gentle shaking. Excess
219 reagents were removed by dialysis performed overnight at 4°C in 0,1 M carbonate buffer pH
220 9,5.

221 The oxidized curcin was added to the anti-Her2 at a molar proportion of 5:1. The
222 proteins were incubated for 180 minutes at room temperature in the dark with gentle shaking.
223 The imine was reduced with 100 µL of 0,6 M NaBH₃CN for 120 minutes at 4°C. The
224 immunotoxin was concentrated through ultrafiltration with an Amicon Ultra-4 centrifugal
225 filter of 100 kDa, and was purified by exclusion molecular chromatography using a Sephadex
226 G-200 column eluted with PBS.

227

228 *Analysis and characterization of the immunotoxin curcin:anti-Her2*

229 The proteins curcin, anti-Her2 and immunotoxin were analyzed by SDS-PAGE under
230 non-reducing conditions. The union of curcin and Mab anti-Her2 was analyzed by western
231 blot with an anti-curcin or anti-mouse IgG-HRP conjugate. The specific recognition of the
232 conjugate by the Her2 receptor was analyzed by immunocytochemistry using the DAB
233 substrate. The *in vitro* cytotoxicity was determined using the MTT assay.

234

235 *Immunocytochemistry*

236 SK-BR-3 and MDA-MB-231 cells were grown on glass slides and fixed with 2%
237 paraformaldehyde for 30 minutes at 37°C and then washed with PBS-T. The cells were
238 permeabilized with Triton 0,5% for one minute and then were blocked with 6% skim milk in
239 PBS-T overnight at 4°C. The slides were incubated with the immunotoxin (1:250) overnight
240 at 4°C, washed with PBS-T and incubated with conjugated anti-mouse IgG-HRP (1:1000)
241 under the same conditions. The peroxidase reaction was performed in a freshly prepared
242 DAB solution in peroxide buffer according to the manufacturer's instructions. The slides
243 were dried and mounted for microscopic observation.

244

245 *In vitro cytotoxicity assays of the immunotoxin curcin:anti-Her2*

246 The MTT assay was used to evaluate the cytotoxicity of curcin, blocked curcin, anti-
247 Her2 and the immunotoxin curcin:anti-Her2 in the human cell lines SK-BR-3 (Her2+) and
248 MDA-MB-231 (Her2-).

249 The exponentially growing cells were plated in triplicate in 96-well plates (8×10^4
250 cells/well) at a final volume of 100 μ L and incubated at 37°C for 24 h in a humidified
251 atmosphere with 5% CO₂ (v/v). These cells were then exposed to different concentrations of
252 curcin, blocked curcin, anti-Her2 or immunotoxin diluted in DMEM or McCoy's 5A medium
253 and supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin. Plates were incubated
254 another 24 h.

255 The concentrations of curcin were between 3,12 and 200,0 μ g/mL. The blocked curcin
256 was treated with anti-curcin for 30 minutes, and concentrations ranging from 15,6 to 1000,0
257 μ g/mL were prepared. Anti-Her2 was dissolved in the corresponding medium at
258 concentrations ranging from 0,7 to 45,0 μ g/mL. The concentrations of the immunotoxin

259 ranged from 0,4 to 25,0 $\mu\text{g/mL}$. All of these solutions were filtered with a 0,22 μm filter under
260 sterilized conditions.

261 To measure the degree of cell proliferation after every treatment, the final viability of the
262 cells was determined using the MTT assay (0,25 mg/mL). After 4 h of incubation under the
263 same conditions, the MTT was removed and formazan was solubilized with DMSO. The
264 absorbance was measured at 570 nm using the Bio-Rad Absorbance Microplate Reader.

265 Wells without cells and culture medium, wells with cells and culture medium, and wells
266 with cells, culture medium and buffer solution were used as controls. The percentages of cell
267 survival were calculated in reference to these controls. The data were given as the means \pm
268 the standard deviation (SD) of three independent experiments, performed in triplicate. The
269 concentration at which growth was inhibited by 50% (IC_{50}) was calculated using the
270 GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad software Inc.).

271

272 *Statistical analysis*

273 The IC_{50} results are represented as the mean \pm SD and were analyzed by one-way
274 analysis of variance (ANOVA). Significant differences were calculated using Tukey's range
275 test. GraphPad Prism software version 5.0 was used to analyze the data. P-values $<0,05$ were
276 considered to be significant.

277

278 **Results**

279

280 *Physicochemical and biological characterization of curcin*

281 The curcin isolated from *J. curcas* L. seeds was determined to have a molecular weight
282 of 32,7 kDa, a pI of 8,70, and 4,14 % sugar contents. The glycosylation of this RIP was
283 confirmed in polyacrylamide gels with the periodic acid-Schiff method provided by the
284 Glycoprotein Staining Kit. A very clear magenta band was produced at a molecular weight
285 above 26 kDa and corresponding to curcin. The band is marked with an arrow in Figure 1.

286 The sequence analysis showed a homology of 74,06% between curcin and the protein
287 with accession number K9JF38 from the UniProt PDB database. This accession number
288 corresponds to a rRNA N-glycosidase protein from *J. curcas* (Barbados nut). The enzymatic
289 activity of curcin was confirmed using RNA from *J. curcas* L. seeds. According to Endo et
290 al. [18], the aniline treatment on RNA incubated with a RIP induces strand scission on the
291 sites where N-glycosidase activity took place and the α -fragment is generated. In this

292 investigation, the α -fragment of approximately 500 nucleotides was visualized on an agarose
293 gel when the RNA was incubated with curcin and treated with aniline.

294 The glycosylation, molecular weight, pI and sugar content data are in accordance with
295 the values reported by Stirpe [29] for RIPs and Lin et al. [30] for curcin.

296

297 *In silico modelling of curcin*

298 BLASTp at NCBI [31] was used to search for similarities between the amino acid
299 sequence of curcin (accession number ACO53803.1) and other proteins, showing an absence
300 of templates with more than 40% identity. Thus, the 3D structure of curcin was modelled
301 using the I-TASSER server (Figure 2). The complete sequence of curcin was obtained from
302 ten threading templates that all belonged to the RIP family. The best predicted structure of
303 curcin had a C-Score of -1,01 and a TM-Score of 0,59 + 0,14. The Ramachandran plot of this
304 3D curcin model indicated that 94.2% of the amino acid residues were placed into the
305 favoured and allowed categories, supporting that the model has high stereochemistry and
306 conformational structure quality (Figure 3).

307 The oligosaccharide GlcNAc2Man3Xyl was constructed and the web-based tool GlyProt
308 was used to place this structure in the 3D model of curcin (Figure 4). At this point,
309 glycosylated curcin was energy-minimized with MOE software and a RMSD deviation of
310 1,73 Å was observed by superimposition of minimized curcin and cucurmosin (Type I RIP
311 from *Cucurbita moschata*).

312

313 *Preparation, analysis and characterization of the immunotoxin curcin:anti-Her2*

314 The oxidation of the sugar in curcin with NaIO₄ was followed by SDS-PAGE, which
315 demonstrated that there was no auto-conjugation between curcin molecules. In addition, the
316 aldehydes groups were analyzed with the Tollens test over the course of the oxidation, with
317 positive results for this functional group.

318 The immunotoxin, antibody and curcin were electrophoresed on a 10% polyacrylamide
319 SDS gel under non-reducing conditions, followed by Coomassie staining. Conjugation was
320 confirmed by a shift in the electrophoretic mobility of the immunotoxin to approximately 250
321 kDa (lane 3 in Figure 5) relative to oxidized curcin (32,7 kDa, lane 1 in Figure 5) and the
322 anti-Her2 antibody (130 kDa, lane 2 in Figure 5).

323 The conjugation between curcumin and the anti-Her2 was validated by western blot, with a
324 primary rabbit anti-curcumin and a secondary goat anti-rabbit or anti-mouse IgG-HRP conjugate
325 (Figure 6).

326 Curcumin was detected in the curcumin control (Lane 1) and in the immunotoxin (Lane 5), but
327 it was not detected in anti-Her2 (Lane 3). Anti-Her2 was detected in anti-Her2 control (Lane
328 4) and in the immunotoxin (Lane 6), but not in curcumin (Lane 2). According to the molecular
329 mass marker (M), curcumin was detected at approximately 30 kDa (Lane 1) and 250 kDa (Lane
330 6), and anti-Her2 was detected above 130 kDa (Lane 4) and 250 kDa.

331 One of the most important characteristics of the immunotoxins is the recognition of the
332 antigen on the target cell. To confirm this property in the curcumin:anti-Her2 construct, cultures
333 of SK-BR-3 and MDA-MB-231 were incubated with the immunotoxin curcumin:anti-Her2 and
334 the interface between the antibody and antigen was evaluated using the chromogen DAB.

335 The SK-BR-3 cells were surrounded by a brown colour, while the MDA-MB-231 cells
336 did not present this colour (Figure 7). This result proved that the curcumin:anti-Her2
337 immunotoxin recognized and attached to its antigen in Her2+ SK-BR-3 cells and not in the
338 Her2- MDA-MB-231 cells.

339

340 *In vitro cytotoxicity assays of the immunotoxin curcumin:anti-Her2*

341 After checking the connection between curcumin and anti-Her2 and the differential
342 recognition of this conjugate toward both cell lines, the cytotoxic effect of the conjugate was
343 evaluated.

344 To verify whether the cytotoxic effect was caused by the toxin curcumin attached to the
345 immunotoxin, the negative controls were blocked curcumin and the anti-Her2. Curcumin was
346 blocked with the anti-curcumin polyclonal antibody.

347 The effects of curcumin on cell viability were the same in SK-BR-3 and MDA-MB-231 cell
348 cultures at all concentrations (3,12 to 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figure 8a). These results were in
349 agreement with the IC_{50} values, which were $15,5 \pm 8,3$ for SK-BR-3 and $18,6 \pm 2,4$ $\mu\text{g}/\text{mL}$
350 for MDA-MB-231 ($p < 0,05$) (Table 1). In contrast, the blocked curcumin presented a differential
351 effect between the cultures: at all concentrations (15,6 to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the viability of SK-
352 BR-3 cells was lower than MDA-MB-231 (Figure 8c), with IC_{50} values of $184,7 \pm 4,6$ and
353 $708,6 \pm 19,9$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively ($p < 0,05$) (Table 1).

354 By contrast, the anti-Her2 Mab did not affect both cultures at all the concentrations (0,7
355 to 45 $\mu\text{g/mL}$). This effect was the same in both SK-BR-3 and MDA-MB-231 (Figure 8d), and
356 the IC_{50} values were $247,3 \pm 26,1$ and $291,3 \pm 19,8$ $\mu\text{g/mL}$, respectively (Table 1).

357 The effect of the immunotoxin curcin:anti-Her2 on cell viability (Figure 8b) was evident
358 in the SK-BR-3 cell culture at concentrations ranging from 0,4 to 3,1 $\mu\text{g/mL}$ with 60% cell
359 death. From these concentrations up to 25,0 $\mu\text{g/mL}$, the cell growth was slowly inhibited. The
360 MDA-MB-231 cell culture was affected by the immunotoxin at concentrations higher than
361 6,2 $\mu\text{g/mL}$, but the cell growth inhibition was only approximately 17,0%. This very important
362 differential effect of the immunotoxin was confirmed by the IC_{50} values of $2,2 \pm 0,08$ (SK-
363 BR-3) and $147,6 \pm 2,5$ $\mu\text{g/mL}$ (MDA-MB-231) ($p < 0,05$).

364

365 Discussion

366 The N-glycosidase activity of curcin allowed use this RIP like a toxin because stops cell
367 growth by inhibiting protein synthesis, while the glycosylation of this protein served as the
368 basis for constructing the immunotoxin curcin:anti-Her2 by reductive amination as performed
369 in this research.

370 However, *in silico* analysis of a three-dimensional (3D) model of the glycosylated curcin
371 structure was performed to verify the glycosylation of curcin, as shown on the
372 polyacrylamide gel, and moreover, to determine the spatial location and the availability of
373 curcin sugars for reaction during oxidation and subsequent reductive amination.

374 According to I-TASSER, the best model of a predicted structure has a C-score between -
375 5 and 2 and a TM-score higher than 0,5. In this investigation, the best model of curcin had
376 values for these two parameters within the ranges set by this server, ensuring good quality,
377 correct topology and a reliable model.

378 I-TASSER is a hierarchical approach for protein structure prediction that consists of
379 template identification by multiple threading alignments, followed by tertiary structure
380 assembly. I-TASSER uses the best multiple templates, resulting in greater query coverage
381 and better topology, due to the TM-score like indicator of the global topology and stronger
382 similarity between the structures [32]; besides, the quality assessment of the 3D curcin model
383 was performed by inspection of the Psi/Phi Ramachandran plot obtained from PROCHECK
384 analysis, a program that checks the stereochemical quality of the protein structure. I-TASSER
385 3D curcin model and Ramachandran plot gave and confirmed a high quality of the predicted
386 conformational structure model of this protein. This aspect is critically important because,

387 ultimately, the accuracy of the model determines its suitability for specific biological and
388 biochemical experimental designs.

389 According to Lin et al. [8], the curcin protein has two sites of N-glycosylation, at the N-
390 266 and N-274 positions. Although the identity of the sugars has not been determined,
391 Daubenfeld et al. [24] found a glycosylation pattern of GlcNAc₂Man₃Xyl on gelonin (RIP)
392 and concluded that this glycan is consistent with other RIPs. With this information, the 3D
393 model of glycosylated curcin in Figure 4 shows that the two asparagines with the glycan
394 moiety are exposed and available to react. The model also shows four molecules of D-
395 mannose (arrows) with cis-diols groups that can be oxidized with NaIO₄ to create reactive
396 aldehydes.

397 The information about glycosylation and possible structure and localization of the sugar
398 moieties on curcin was essential to proceed with constructing the immunotoxin curcin:anti-
399 Her2 through sugar oxidation on curcin and reductive amination between this protein and the
400 anti-Her2.

401 The western blot and immunocytochemistry analysis confirmed the conjugation of curcin
402 to the anti-Her2 Mab. Moreover, the specific recognition of the anti-Her2 in the immunotoxin
403 to the Her2 receptor demonstrates that the conjugation reactions did not affect the quality of
404 the antibody, and that it is possible to use reductive amination to conjugate proteins and
405 construct immunotoxins.

406 Several authors have reported the cytotoxic effects of curcin and recombinant curcin in
407 different types of cancer cell lines.[8,33-36] The IC₅₀ values reported in these studies ranged
408 from 0,23 ± 0,08 µg/mL for the gastric cancer cell line SGC-7901 [8] to 691,42 µg/mL for
409 the hepatic cancer cell line HepG2 [35], and even no toxic effects were observed for the HeLa
410 cervical cancer cell line and the healthy diploid human embryo lung cell line.[8]

411 Respect breast cancer cell lines, Mohamed et al. [36] reported the effect of curcin on
412 MDA-MB-453 and MCF-7. They explored the toxicity of curcin against normal and cancer
413 cells particularly to elucidate the biochemical and morphological events during cell death.
414 They reported 45% viability at 100 µg/mL of curcin and 55% viability at 10 µg/mL to MDA-
415 MB-453; MCF-7 was more sensitive to curcin with 30% viability at 100 µg/mL and around
416 45% viability at 10 µg/mL. These authors speculate that the cause of the difference response
417 is the drug resistance of these cultures.

418 In this investigation, the breast cancer cell lines analyzed were MDA-MB-231 and SK-
419 BR-3; both cultures are adenocarcinoma derived from metastatic site with epithelial

420 morphology and adherent growth, the principal difference between them is the expression of
421 the antigen Her2. MDA-MB-231 cells lacked Her2 overexpression, whereas SK-BR-3
422 overexpresses this protein and is catalogued like Her2+. The IC_{50} values of curcumin toward
423 breast cancer cells were $15,5 \pm 8,3$ for SK-BR-3 and $18,6 \pm 2,4$ $\mu\text{g/mL}$ for MDA-MB-231,
424 with not significant differences between them ($p < 0,05$) (Table 1). These results showed that
425 the Her2 receptor was not involved in the toxicity of this protein.

426 The toxic effect of curcumin has been attributed to its N-glycosidase activity and the
427 inhibition of protein synthesis [8], but since 2012, Zhao et al. [34] suggested that apoptosis
428 could be the cause of cell death. In 2014, Mohamed et al. [36] reported that curcumin triggered
429 several biochemical and morphological alterations, like mitochondrial dysfunction, nuclear
430 degeneration and suppression of defense mechanism, with evident alterations similar to
431 autophagy and apoptosis, predominantly.

432 The ability of curcumin to kill cells by apoptosis, especially cancer cells, affords the
433 opportunity of using this RIP as a potential therapeutic agent such as an immunoconjugate for
434 the treatment of various cancers. With this objective, Zheng et al. [37] fused curcumin with a
435 transferrin receptor binding peptide (curcumin-TfRBP9) and Mohamed et al. [38] conjugated
436 curcumin with gold nanoparticles PEGylated and attached to folate and transferrin antibody (Au-
437 PEG-FOL-CUR-Tfr).

438 With these backgrounds, the main objective of this investigation was to use this toxicity
439 of curcumin and construct an immunotoxin by directing this RIP to the Her2 receptor through an
440 antibody directed to this antigen. Thus, the target cells were SK-BR-3, which overexpresses
441 the Her2 antigen (Her2+), and the negative control cells were MDA-MB-231, with normal
442 levels of this protein (Her2-).

443 The toxicity of the curcumin and immunotoxin (Figure 8), and the IC_{50} values summarized
444 in Table 1 showed that the toxic effect of the immunotoxin was due to the curcumin, because
445 neither blocked curcumin or anti-Her2 were toxic to the cancer cell lines; that the immunotoxin
446 had different effect on MDA-MB-231 and SK-BR-3 (Figure 8b), and that the immunotoxin
447 had differential effects respect to curcumin (Figure 8a and 8b).

448 The immunotoxin was two orders of magnitude more toxic to the cancer cell line SK-
449 BR-3 (Her2+) than to MDA-MB-231 (Her2-) (Table 1). And comparing with curcumin showed
450 that, the conjugate increased the toxicity by one order of magnitude on the SK-BR-3 cell line,
451 while the toxicity decreased by one order of magnitude on the MDA-MB-231 cell line.

452 The toxin is a very important component of the immunotoxins, but antigen selection is
453 another important factor to consider when designing these conjugates, because this
454 determines the selectivity and the exclusive delivery of the toxin to the target cancer cells.
455 The ideal antigen would be uniquely expressed on the cancer cell, but such antigens have not
456 yet been identified. In this research, the antigen Her2 was selected because it presents two
457 important characteristics to the objective: first, it is a cancer-associated antigen that is
458 particularly present in breast cancer; and second, it is involved in cell regulatory processes,
459 such as proliferation, motility and resistance to apoptosis.

460 The toxicity results summarized as IC_{50} values in Table 1 clearly show that the
461 immunotoxin constructed through a reductive amination reaction between curcun and anti-
462 Her2 directs the cytotoxic effect of curcun to the target cells and at lower concentrations than
463 unconjugated curcun.

464 This behaviour was observed with curcun-TfRBP9 [37], where the conjugated had
465 significant proliferation inhibition effects on the HepG2 (liver cancer) cells that over
466 expressed transferrin receptors, and had lower inhibitory effects on the SK-BR-3 (breast
467 cancer) and LO-2 (normal liver) cells that expressed lower levels of this receptor, and
468 concluded that compared with curcun, the curcun-TfRBP9 induced higher apoptosis rates in
469 the HepG2 cells.

470 Respect the Au-PEG-FOL-CUR-Tfr conjugate, there was a very important and strong
471 specificity between cancer cells (glioma) and healthy cells (HCN-1A, normal neural cells); at
472 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, glioma had 3% viability while HCN-1A had 90% during 48 h of treatment, this
473 results were dose dependent and inversely proportional to the concentration of the
474 conjugate.[38]

475 Besides the specificity, the immunotoxins have the clear advantage to kill cells at very
476 low concentrations, even nanograms. It could be analyzed an important quantity of reports
477 where immunotoxins were very potent in their lethality, however it is difficult the comparison
478 because the RIPs and the conjugation methods were different. About conjugates of curcun,
479 Zheng et al. [37] results showed an increased toxicity (15 % to 20%) to the curcun-TfRBP9
480 between 240 and 360 nM, but at higher concentrations the difference between the conjugate
481 and the curcun was bigger, around 30-40%.

482 Although the toxic effects of the Au-PEG-FOL-CUR-Tfr conjugate were very specific
483 and dose-dependant between 1 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the authors did not compare with curcun, so
484 an analysis about the toxicity increment can not be performed.[38]

485 The toxicity of the conjugate curcin-anti:Her2 constructed in this investigation fulfilled
486 both characteristics of an immunotoxin, was specific to Her2 and increased the toxicity of
487 curcin around seven times. However, the toxicity of the immunotoxin to SK-BR-3 was not as
488 low as expected, in order of nanograms per milliliter. The possible causes of this low toxicity
489 could be several, since the introduction of the immunotoxin to the cell until the difficulty to
490 break the amine link between curcin and the anti-Her2. It is clear that is important to analyze
491 the mechanisms of entrance, movement and degradation of this conjugate.

492 From the 1980s to the present, immunotoxins have been constructed through the
493 chemical coupling of a large number and variety of antibodies and RIPs, such as ricin,
494 gelonin, saporin, PAP and momordin. In most of these conjugates, the coupling technique
495 was mediated by the derivatization of both antibodies and toxins with different crosslinkers
496 reagents, such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionate (SPDP), 4-succinimidyl-
497 oxycarbonyl- α -methyl- α -(2-pyridyldithio)-toluene (SMPT) and 2-iminothiolane (2-IT).
498 Although most of these immunotoxins have increased toxic effects to the target cells, the
499 heterogeneity and the instability of the disulfide bond in the molecule has limited their
500 advance as targeted therapies.

501 In this investigation, the objective was to conjugate curcin and the anti-Her2 without
502 derivatization with crosslinkers, without compromising the active sites of both molecules and
503 with a stable covalent bond. The conjugation was "site-directed" to the exposed mannose
504 residues in curcin (Figure 4) and the deprotonated ϵ -amine groups on lysine residues at pH
505 9,5 widely distributed across the fragment crystallizable region (Fc) of anti-Her2. The global
506 mechanism of these reactions included the conversion of the hydroxyl groups of the mannose
507 in reactive aldehyde groups through periodate oxidation, which reacted with ϵ -amines to form
508 imines or Schiff bases, which were stabilized by reduction with sodium
509 cyanoborohydride.[39-41] It is possible that this "site-specific" conjugation could reduce the
510 heterogeneity in the structure of the conjugate both the number and position of the curcin
511 molecules and ensures a stable amine bond.

512 Another way of controlling the heterogeneity of the immunotoxins is through the molar
513 ratio between the toxin and the antibody. In this research, the molar ratio of the conjugate was
514 5 mole of curcin with one mole of anti-Her2. It was observed that the constructed
515 immunotoxin had a molecular weight of approximately 250 kDa (Figure 5). This result
516 suggests that three curcin molecules were linked to every anti-Her2 molecule.

517 Clearly, future research should focus on characterizing the curcin:anti-Her2
518 immunotoxin and probing its effects in animal models. However, the results generated in this
519 study, and those provided by Mohamed et al. [36] show that curcin is able to induce death of
520 the cancer cells. Thus it is possible that this conjugated molecule could have a high potential
521 for use as a therapy directed against tumours Her2 positive.

522 Conclusions

523 In this investigation, reductive amination was used to construct an immunotoxin
524 consisting of the ribosome-inactivating protein curcin and the antibody against Her2. The link
525 between these two proteins involved the sugar residues on curcin, which were previously
526 oxidized using sodium periodate, and the ϵ -amine groups of the fragment crystallizable
527 region (Fc) of the antibody to make the construct "site-specific". The immunotoxin
528 curcin:anti-Her2 was more toxic to the SK-BR-3 cell line, which overexpressed the antigen
529 Her2, than to the MDA-MB-231 cell line, which does not overexpress this antigen.
530 Furthermore, the immunotoxin was more toxic compared to unconjugated curcin. The
531 reductive amination can be a rapid and "site-specific" method for constructing immunotoxins
532 without compromising the active sites and allowing for the action of each protein involved in
533 this type of hybrid molecules.

534 Acknowledgments

535 We acknowledge to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and
536 Instituto Politécnico Nacional (IPN) for the scholarships during the course of this
537 investigation, and to the IPN for the financial support for the research.

538 References

- 539 [1] Tan M, Yu D. Molecular mechanisms of ErbB2-mediated breast cancer chemoresistance.
540 In: Dihua Y, Mien-Chie H. eds. Breast Cancer Chemosensitivity. Landes
541 Bioscience/Springer Science+Business Media LLC. New York; 2007. p. 119-129.
- 542 [2] Kumar PS, Pegram M. HER2 targeted therapy in breast cancer...beyond Herceptin. Rev
543 Endocr Metab Disord. 2007;8:269-277.
- 544 [3] Ávila DA, Calderón FC, Pérez MR, Pons C, Pereda MC, Ortiz RA. Construction of an
545 immunotoxin by linking a monoclonal antibody against the human epidermal growth
546 factor receptor and a hemolytic toxin. Biol Res. 2007;40:173-183.

- 547 [4] Choudhary S, Mathew M, Verma RS. Therapeutic potential of anticancer immunotoxins.
548 Drug Discovery Today. 2011;16(11/12):495-503.
- 549 [5] Madhumathi J, Verma RS. Therapeutic targets and recent advances in protein
550 immunotoxins. Curr Opin Microbiol. 2012;15:300–309.
- 551 [6] Fracasso G, Stirpe F, Colombatti M. Ribosome-inactivating protein containing
552 conjugates for therapeutic use. In: Lord JM, Hartley MR. eds. Toxic Plant Proteins 18,
553 Plant Cell Monographs. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2010:225-263.
- 554 [7] Endo Y, Wool GI. The site of action of α -sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence
555 at the α -sarcin cleavage site in 28s ribosomal ribonucleic acid. J Biol Chem.
556 1982;257(15):9054-9060.
- 557 [8] Lin J, Chen Y, Xu Y, Yan F, Tang L, Chen F. Cloning and expression of curcin, a
558 ribosome-inactivating protein from the seeds of *Jatropha curcas*. Acta Bot Sin.
559 2003;45(7):858-863.
- 560 [9] Ikawati Z, Sudjadi, Sismindari. Cytotoxicity against tumor cell lines of a ribosome-
561 inactivating protein (rip)-like protein isolated from leaves of *Mirabilis jalapa* L. Malays J
562 Pharm Sci. 2006;4(1):31–41.
- 563 [10] De Virgilio M, Lombardi A, Caliendo R, Fabbri MS. Ribosome-inactivating proteins:
564 from plant defense to tumor attack. Toxins. 2010;2:2699-2737.
- 565 [11] Puri M, Kaur I, Perugini MA, Gupta RC. Ribosome-inactivating proteins: current status
566 and biomedical applications. Drug Discov Today. 2012;17(13/14):774-783.
- 567 [12] Dosio F, Brusa P, Cattel L. Immunotoxins and anticancer drug conjugate assemblies: The
568 role of the linkage between components. Toxins. 2011;3:848-883.
- 569 [13] Antignani A, Fitzgerald D. Immunotoxins: The role of the toxin. Toxins. 2013;5:1486-
570 1502.
- 571 [14] Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin treatment of cancer. Annu
572 Rev Med. 2007;58:221-237.
- 573 [15] Teicher BA, Chari RVJ. Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. Clin
574 Cancer Res. 2011;17:6389-6397.
- 575 [16] Farkaš P, Bystrický S. Chemical conjugation of biomacromolecules: a mini-review.
576 Chem Pap. 2010;64(6):683–695.
- 577 [17] Li Z, Trick HN. Rapid method for high-quality RNA isolation from seed endosperm
578 containing high levels of starch. BioTechniques. 2005;38(6):872-876.

- 579 [18]Endo Y, Tsurugi K. The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. J Biol Chem.
580 1988;263(18):8735-8739.
- 581 [19]Tuner NE, Hwang D, Bonnes M. C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral
582 protein inhibits viral infection but does not depurinate host ribosomes. Proc Natl Acad
583 Sci USA. 1997;94:3866-3871.
- 584 [20]Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for
585 determination of sugars and related substances. Anal Chem. 1956;28(3):350-356.
- 586 [21]Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities
587 of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-
588 254.
- 589 [22]I-TASSER. Available at: <http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>.
- 590 [23]PROCHECK. Available at: <http://www.ebi.ac.uk/thomson-srv/software/PROCHECK/>.
- 591 [24]Daubenfeld T, Hossan M, Trommer WE, Niedner-Schatteburg G. On the contentious
592 sequence and glycosylation motif of the ribosome inactivating plant protein gelonin.
593 Biochem Biophys Res Commun. 2005;333(3):984-989.
- 594 [25]SWEET-II. Available at: <http://www.glycosciences.de/modeling/sweet2/>.
- 595 [26]GlyProt. Available at: <http://www.glycosciences.de/modeling/glyprot/php/main.php>.
- 596 [27]MOE. http://www.chemcomp.com/MOE-Molecular_Modeling_and_Simulations.
- 597 [28]Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
598 bacteriophage. Nature. 1970;227:680-685.
- 599 [29]Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins. Toxicon. 2004;44:371-383.
- 600 [30]Lin J, Zhou X, Wang J, Jiang P, Tang K. Purification and characterization of curcin, a
601 toxic lectin from the seed of *Jatropha curcas*. Prep Biochem Biotechnol. 2010;140:107-
602 118.
- 603 [31]NCBI. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- 604 [32]Zhang Y, Skolnick J. Automated structure prediction of weakly homologous proteins on
605 a genomic scale. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101(20):7594-7599.
- 606 [33]Luo M, Yang X, Liu W, Xu Y, Huang P, Yan F, Chen F. Expression, purification and
607 anti-tumor activity of curcin. Acta Biochim Biophys Sin. 2006;38(9):663-668.
- 608 [34]Zhao Q, Wang W, Wang Y, Xu Y, Chen F. The effect of curcin from *Jatropha curcas* on
609 apoptosis of mouse sarcoma-180 cells. Fitoterapia. 2012;83:849-852.

- 610 [35] DanDan X, Bo Z, YaDong H, QiHao Z, ZhiJian S, Hua X, Qing Z. Expression of
611 recombinant curcun in *Jatropha curcas* L. and its anti-tumor activity in vitro. *Med Plant.*
612 2012;3(8):68-71.
- 613 [36] Mohamed SM, Veeranarayanan S, Minegishi H, Sakamoto Y, Shimane Y, Nagaoka Y,
614 Aki A, Poulouse CA, Echigo A, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Cytological and
615 subcellular response of cells exposed to the type-1 RIP curcun and its hemocompatibility
616 analysis. *Sci Rep.* 2014;4:5747.
- 617 [37] Zheng Q, Xiong Y-L, Su Z-J, Zhang Q-H, Dai X-Y, Li L-Y, Xiao X, Huang Y-D.
618 Expression of curcun–transferrin receptor binding peptide fusion protein and its anti-
619 tumor activity. *Protein Expres Purif.* 2013;89:181-188.
- 620 [38] Mohamed SM, Veeranarayanan S, Poulouse AC, Nagaoka Y, Minegishi H, Yoshida Y,
621 Maekawa T, Kumar DS. Type 1 ribotoxin-curcun conjugated biogenic gold nanoparticles
622 for a multimodal therapeutic approach towards brain cancer. *Biochimica et Biophysica*
623 *Acta* 2014;1840:1657–1669.
- 624 [39] Gildersleeve CJ, Oyelaran O, Simpson TJ, Allred B. Improved procedure for direct
625 coupling of carbohydrates to proteins via reductive amination. *Bioconjugate Chem.*
626 2008;19:1485-1490.
- 627 [40] Hermanson T.G. *Bioconjugate Techniques*, 3rd. ed.; Academic Press: New York; 2013.
- 628 [41] Kumar KR, Xiavour S, Latha S, Kumar V, Sukumaran. Anti-human IgG-horseradish
629 peroxidase conjugate preparation and its use in ELISA and Western Blotting experiments
630 *J Chromatograph Separat Techniq* 2014;5:211 doi: 10.4172/2157-7064.1000211.
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642

643 Table 1. Cytotoxic effects (IC_{50}) of curcun, blocked curcun, anti-Her2 and immunotoxin
 644 curcun:anti-Her2 on breast cancer cell lines SK-BR-3 (Her2+) and MDA-MB-231 (Her2-).

CELL CULTURE	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})^*$			
	CURCIN	BLOCKED CURCIN	ANTI-HER2	IMMUNOTOXIN CURCIN:ANTI-HER2
SK-BR-3 (Her2+)	$15,5 \pm 8,3^a$	$184,7 \pm 4,6^b$	$247,3 \pm 16,1^d$	$2,2 \pm 0,08^f$
MDA-MB-231 (Her2-)	$18,6 \pm 2,4^a$	$708,6 \pm 19,9^c$	$291,3 \pm 19,8^e$	$147,6 \pm 2,5^g$

645 *Different letters indicate significant differences between cell cultures ($p < 0,05$).

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669 Figure 1. Glycosylation of curcin on a reducing 12% SDS-PAGE. Lane 1: mass molecular
670 marker; lane 2: 10 µg of curcin (Glycoprotein Staining Kit, Thermo Scientific Co.).
671

672 Figure 2. Schematic representation of the 3D structure of curcin accession number
673 ACO53803.1 (I-TASSER server). Red: alpha helix; yellow: extended beta; blue: turn; white:
674 coil.
675

676 Figure 3. Ramachandran plot of 3D model of curcin accession number ACO53803.1. The
677 most favoured regions are colored red; allowed regions are colored yellow; generously
678 allowed regions are colored light yellow; and disallowed regions are white (PROCHECK
679 Analysis).
680

681 Figure 4. Schematic representation of glycosylated curcin showing the glycan
682 GlcNAc2Man3Xyl at positions N-266 and N-274 (GlyProt). Red: alpha helix; yellow:
683 extended beta; blue: turn; white: coil; green: oligosaccharide moiety; red: four mannose
684 residues (arrows).
685

686 Figure 5. SDS-PAGE analysis during construction of the immunotoxin curcin:anti-Her2.
687 Coomassie stained 10% non-reducing polyacrylamide gel of oxidized curcin with NaIO₄
688 (32.7 kDa, lane 1), anti-Her2 (130 kDa, lane 2), and immunotoxin curcin:anti-Her2 (250 kDa,
689 lane 3). M: molecular mass marker.
690

691 Figure 6. Western blot analysis of a 10% non-reducing SDS-PAGE of curcin, anti-Her2 and
692 the immunotoxin curcin:anti-Her2. Lane 1 and 2, curcin; lane 3 and 4, anti-Her2; lane 5 and
693 6, immunotoxin curcin:anti-Her2. The curcin was detected with a primary rabbit anti-curcin
694 antibody on lanes 1, 3 and 5. The anti-Her2 was detected with a secondary goat anti-mouse
695 IgG-HRP conjugated antibody on lanes 2, 4 and 6. M: molecular mass marker.
696

697 Figure 7. Immunocytochemistry of the immunotoxin curcin:anti-Her2. SK-BR-3 and MDA-
698 MB-231 cell cultures were incubated with the immunotoxin (1:250) and treated with anti-
699 mouse IgG-HRP conjugated and 3,3'-diaminobenzidine (DAB).
700

701 Figure 8. *In vitro* cytotoxic activity of curcumin (a), immunotoxin curcumin:anti-Her2 (b), blocked
702 curcumin (c) and the antibody anti-Her2 (d) on the cell lines SK-BR-3 (—●—) and MDA-MB-
703 231 (-●-). The cell cultures were incubated for 24 h with different concentrations of each
704 protein at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. The viability was determined using the MTT
705 assay. Every point is the mean \pm standard deviation of three independent experiments with
706 three repetitions.
707

For Peer Review

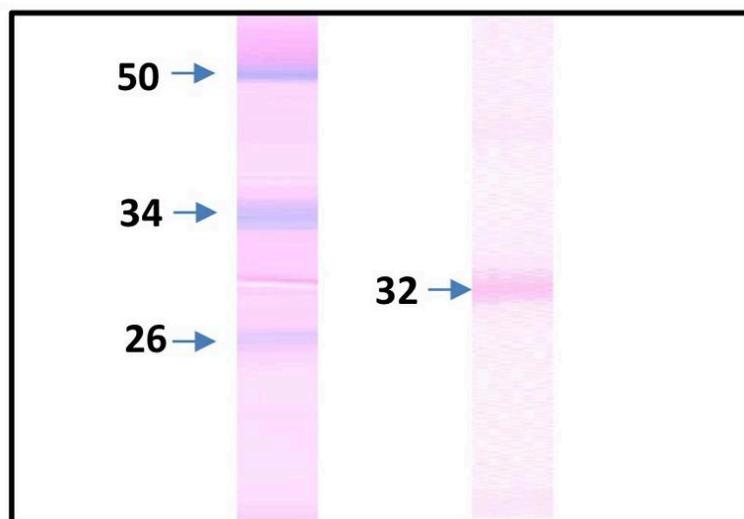


Figure 1 Glycosylation of curcumin on a reducing 12% SDS-PAGE. Lane 1: mass molecular marker; lane 2: 10 μ g of curcumin (Glycoprotein Staining Kit, Thermo Scientific Co.).
317x227mm (72 x 72 DPI)

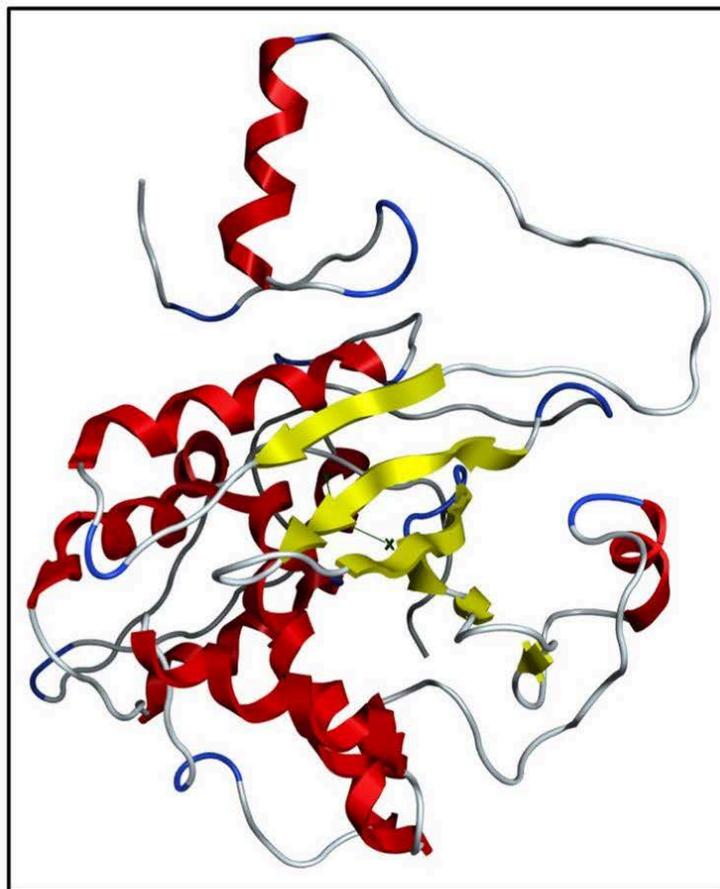


Figure 2 Schematic representation of the 3D structure of curcin accession number ACO53803.1 (I-TASSER server). Red: alpha helix; yellow: extended beta; blue: turn; white: coil.
297x365mm (72 x 72 DPI)

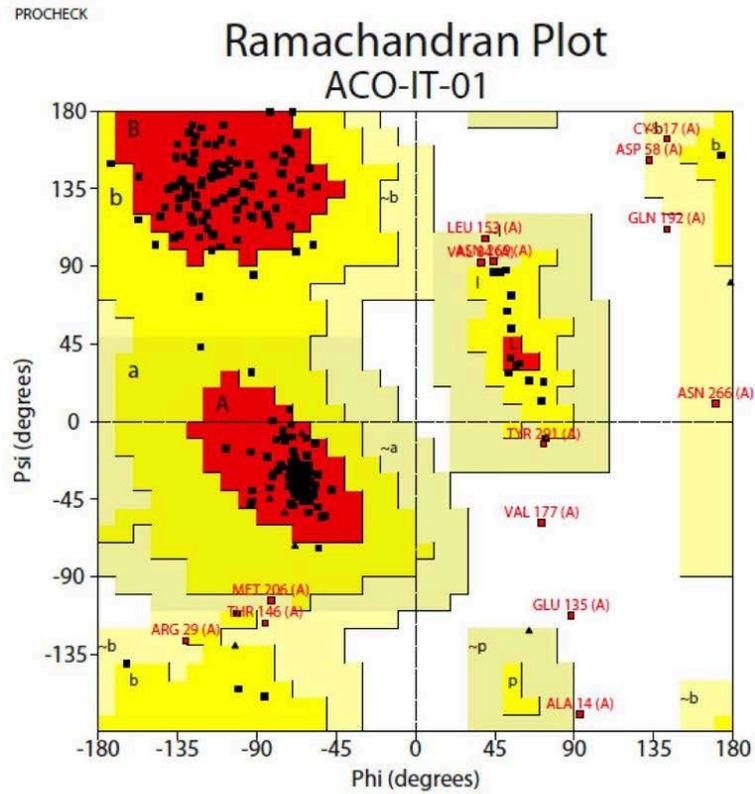


Figure 3 Ramachandran plot of 3D model of curcin accession number ACO53803.1. The most favoured regions are colored red; allowed regions are colored yellow; generously allowed regions are colored light yellow; and disallowed regions are white (PROCHECK Analysis).
380x407mm (72 x 72 DPI)

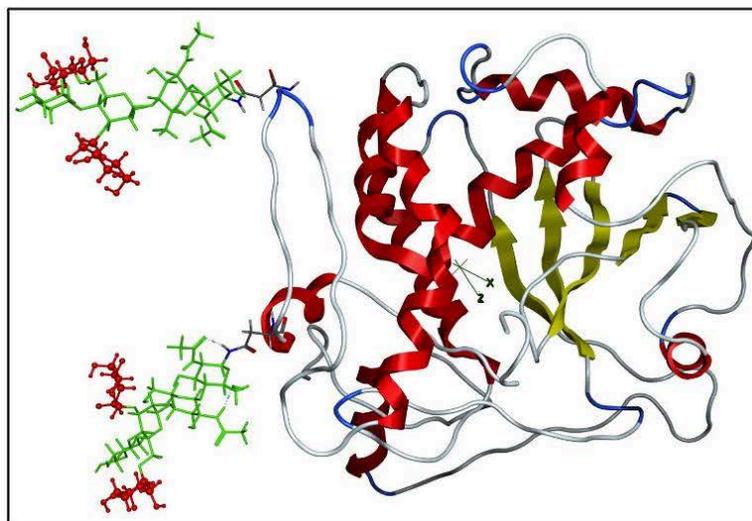


Figure 4 Schematic representation of glycosylated curcin showing the glycan GlcNAc2Man3Xyl at positions N-266 and N-274 (GlyProt). Red: alpha helix; yellow: extended beta; blue: turn; white: coil; green: oligosaccharide moiety; red: four mannose residues (arrows).
524x372mm (72 x 72 DPI)

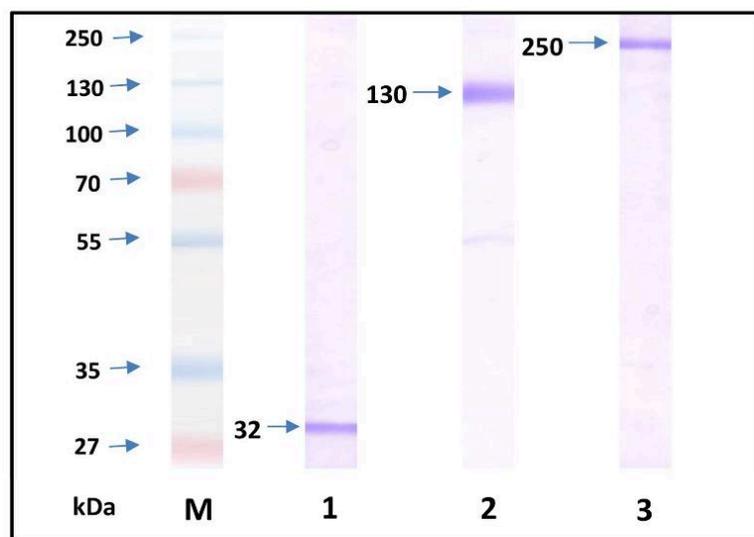


Figure 5 SDS-PAGE analysis during construction of the immunotoxin curcin:anti-Her2. Coomassie stained 10% non-reducing polyacrylamide gel of oxidized curcin with NaIO₄ (32.7 kDa, lane 1), anti-Her2 (130 kDa, lane 2), and immunotoxin curcin:anti-Her2 (250 kDa, lane 3). M: molecular mass marker.
494x356mm (72 x 72 DPI)

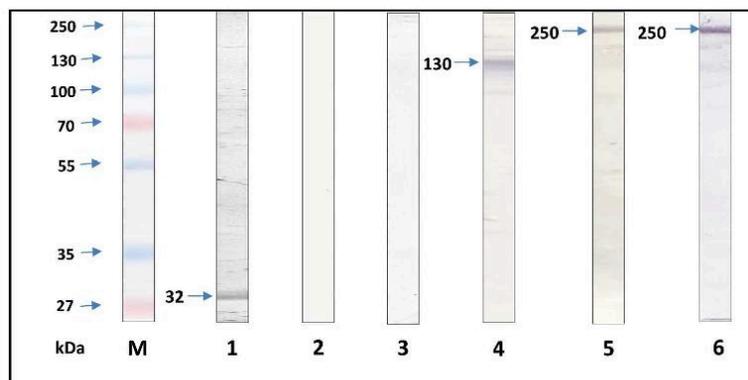


Figure 6 Western blot analysis of a 10% non-reducing SDS-PAGE of curcin, anti-Her2 and the immunotoxin curcin:anti-Her2. Lane 1 and 2, curcin; lane 3 and 4, anti-Her2; lane 5 and 6, immunotoxin curcin:anti-Her2. The curcin was detected with a primary rabbit anti-curcin antibody on lanes 1, 3 and 5. The anti-Her2 was detected with a secondary goat anti-mouse IgG-HRP conjugated antibody on lanes 2, 4 and 6. M: molecular mass marker.
720x367mm (72 x 72 DPI)

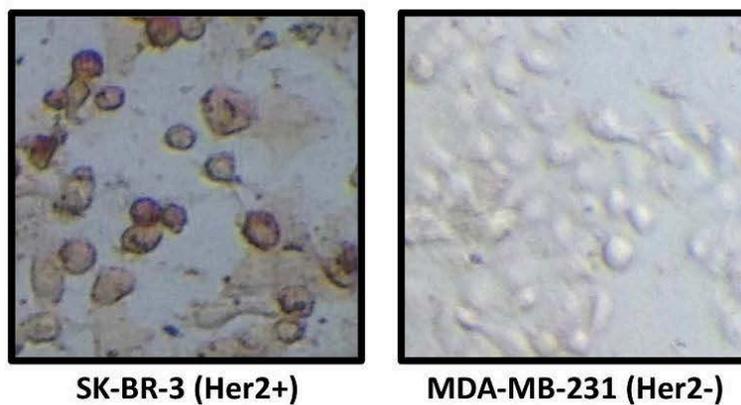


Figure 7 Immunocytochemistry of the immunotoxin curcin:anti-Her2. SK-BR-3 and MDA-MB-231 cell cultures were incubated with the immunotoxin (1:250) and treated with anti-mouse IgG-HRP conjugated and 3,3'-diaminobenzidine (DAB).
469x256mm (72 x 72 DPI)

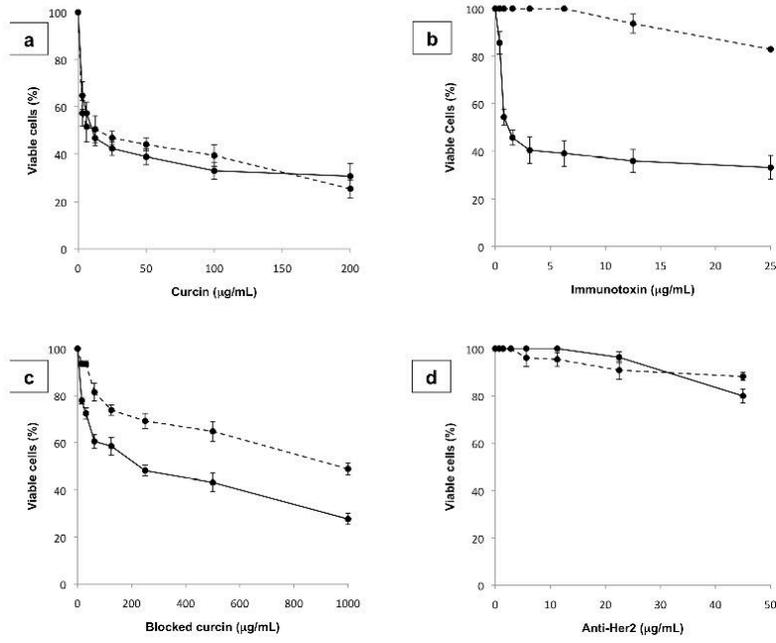


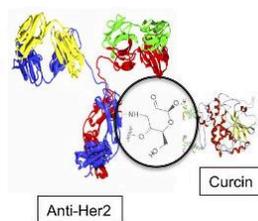
Figure 8 In vitro cytotoxic activity of curcumin (a), immunotoxin curcumin:anti-Her2 (b), blocked curcumin (c) and the antibody anti-Her2 (d) on the cell lines SK-BR-3 (—●—) and MDA-MB-231 (- -●- -). The cell cultures were incubated for 24 h with different concentrations of each protein at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. The viability was determined using the MTT assay. Every point is the mean + standard deviation of three independent experiments with three repetitions.

934x781mm (72 x 72 DPI)

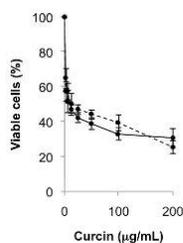
Table 1. Cytotoxic effects (IC_{50}) of curcumin, blocked curcumin, anti-Her2 and immunotoxin curcumin:anti-Her2 on breast cancer cell lines SK-BR-3 (Her2+) and MDA-MB-231 (Her2-).

CELL CULTURE	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})^*$			
	CURCIN	BLOCKED CURCIN	ANTI-HER2	IMMUNOTOXIN CURCIN:ANTI-HER2
SK-BR-3 (Her2+)	$15,5 \pm 8,3^a$	$184,7 \pm 4,6^b$	$247,3 \pm 16,1^d$	$2,2 \pm 0,08^f$
MDA-MB-231 (Her2-)	$18,6 \pm 2,4^a$	$708,6 \pm 19,9^c$	$291,3 \pm 19,8^e$	$147,6 \pm 2,5^g$

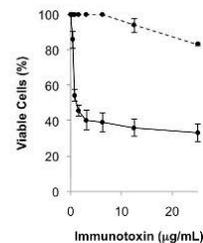
*Different letters indicate significant differences between cell cultures ($p < 0,05$).



In vitro cytotoxic activity of curcin and immunotoxin curcin:anti-Her2 on the cell lines SK-BR-3 (—●—) and MDA-MB-231 (-●-)



CELL LINE	IC ₅₀ (µg/mL)	
	CURCIN	IMMUNOTOXIN
SK-BR-3	15.5 ± 8.3	2.2 ± 0.08
MDA-MB-231	18.6 ± 2.4	147.6 ± 2.5



Graphical Abstract
595x517mm (72 x 72 DPI)