

POTENCIALES APLICACIONES FARMACOLÓGICAS DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS DE ORIGEN VEGETAL

Néstor O. Caffini

Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIPROVE), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calles 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina. E-mail: caffini@biol.unlp.edu.ar

RESUMEN	15
SUMMARY. Pharmacological potential of plant proteases inhibitors	16
INTRODUCCIÓN	16
TIPOS DE INHIBIDORES DE PROTEASAS	16
Inhibidores de serínproteasas tipo Bowman-Birk (BBIs).....	17
Inhibidores de tripsina de soja tipo Kunitz.....	17
Inhibidores de tripsina de mostaza	17
Inhibidores de tripsina/ α -amilasa de cereales	18
Inhibidores de proteinasas de papa tipo I.....	18
Inhibidores de pr oteinasas de papa tipo II	18
Serpinas	18
Inhibidores de proteinasas de zapallo.....	18
Inhibidores de proteinasas cisteínicas	19
Inhibidores de metalocarboxipeptidasas	19
Inhibidores de aspartilproteasas.....	19
POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS DE ORIGEN VEGETAL	19
CONCLUSIONES	21
REFERENCIAS	22

RESUMEN

Las proteasas constituyen un conjunto de enzimas que juegan un papel crucial en numerosos procesos celulares, tales como la degradación de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, la apoptosis, el crecimiento, la activación, adhesión, invasión y migración celular, las metástasis, las interacciones celulares, la transducción de señales, la fagocitosis y la angiogénesis, entre otros. A nivel tisular la relación entre proteasas y sus inhibidores mantiene un equilibrado balance, equilibrio que se quiebra en casos de carcinogénesis, infecciones y otros desórdenes patológicos. En efecto, las proteasas juegan un papel clave en la patogénesis. Un gran número de desórdenes fisiopatológicos resultan del desbalance de la actividad proteolítica. En este marco los inhibidores de proteasas (IPs) son parte elemental del sistema de defensa endógeno, ya que ayudan a regular y balancear las actividades proteolíticas celulares. Se ha demostrado que los IPs evitan la progresión de tumores y metástasis y también tienen el potencial de contrarrestar desórdenes hereditarios tales como el enfisema y la epilepsia. Los IPs también pueden interferir el ciclo de vida de muchos virus y en consecuencia ayudar a prevenir algunas patologías virales. Por su parte los IPs sintéticos son integrantes de la terapia combinada contra el SIDA y tienen un enorme potencial para ser utilizados contra muchas otras enfermedades. De allí que los IPs, tanto naturales como sintéticos, resultan una alternativa válida para enriquecer el arsenal farmacológico existente a la fecha.

SUMMARY. PHARMACOLOGICAL POTENTIAL OF PLANT PROTEASES INHIBITORS

Proteases represent an enzyme group that plays a crucial role in many cell processes, such as degradation of proteins involved in the regulation of cell cycle, apoptosis, cell growth and activation; adhesion, invasion, and cell migration; metastasis, cellular interactions, signal transduction, phagocytosis, and angiogenesis, among others. At a tisular level, the relationship between proteases and their inhibitors maintains an adjusted balance, which is broken in cases of carcinogenesis, infections and other pathological disorders. Indeed, proteases play a key role in pathogenesis. A large number of physiopathological disorders result from the imbalance of proteolytic activity. In this context protease inhibitors (PIs) are a key component of the endogenous defense system, helping to regulate and balance the cellular proteolytic activities. It has been shown that PIs prevent tumor progression and metastasis and also have the potential to counteract hereditary disorders such as emphysema and epilepsy. PIs may also interfere with the life cycle of many viruses and thus help to prevent some viral diseases. Synthetic PIs are part of a combined therapy against AIDS and have enormous potential for being used against many other diseases. Hence PIs, both natural and synthetic, are a valid way to enrich the pharmacological arsenal existing at the date.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas proteolíticas, usualmente denominadas proteasas o peptidasas, constituyen un grupo heterogéneo de proteínas que desempeñan un importante rol en numerosos procesos, desde la degradación de las proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular hasta la apoptosis y las metástasis. En estado normal, la relación entre proteasas y sus inhibidores mantiene un equilibrado balance dentro del organismo, equilibrio que se quiebra en casos de carcinogénesis, infecciones y otros desórdenes patológicos (Rahimi *et al.*, 2012).

En efecto, está plenamente comprobado que las proteasas juegan un papel clave en la patogénesis y que muchos desórdenes fisiopatológicos resultan del desbalance de la actividad proteolítica. En este marco los inhibidores de proteasas (IPs) son parte elemental del sistema de defensa endógeno, ya que ayudan a regular y balancear las actividades proteolíticas celulares. Se ha demostrado que los IPs evitan la progresión de tumores y metástasis y que también tienen el potencial de contrarrestar desórdenes hereditarios tales como el enfisema y la epilepsia. Los IPs también pueden interferir el ciclo de vida de muchos virus y en consecuencia ayudar a prevenir algunas patologías virales. Además, los IPs sintéticos forman parte de la terapia combinada contra el SIDA y tienen un enorme potencial para ser utilizados contra muchas otras enfermedades. De este modo los IPs, tanto naturales como sintéticos, pueden ser considerados como una alternativa válida para enriquecer el arsenal farmacológico existente a la fecha (Majumdar, 2013).

TIPOS DE INHIBIDORES DE PROTEASAS

De acuerdo con el mecanismo catalítico exhibido, usualmente las proteasas suelen ser clasificadas en seis tipos: cisteínicas, serínicas, treonínicas, aspárticas, glutámicas y metaloproteasas. Las tres primeras utilizan los residuos aminoacídicos Cys, Ser y Thr como nucleófilos para atacar la unión peptídica a escindir, en tanto que las otras tres usan para ello una molécula de agua activada; las metaloproteasas tienen además un ion metálico en el sitio activo. Se pueden localizar tanto en la superficie celular como dentro de estructuras subcelulares específicas, en particular en los lisosomas (López-Otín & Bond, 2008). Desde hace mucho tiempo extractos vegetales conteniendo enzimas proteolíticas, entre ellas papaína –obtenida a partir del látex de papaya (*Carica papaya* L.)– y bromelina –aislada de frutos y tallos de *Ananas comosus* (L.) Merrill–, han sido usados en medicina tradicional y en diversos procesos industriales (Rábade *et al.* 2011).

Por su parte, los IPs se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Fritz, 2000). En el caso de los inhibidores de origen vegetal, su peso molecular varía de 4 a 85 kDa, si bien la mayoría se encuentra dentro del rango de 8 a 20 kDa (Hung *et al.*, 2003). En relación al mecanismo de acción, la mayoría de los IPs interactúan directamente con la proteasa blanco, uniéndose a su sitio activo y generando un complejo enzima-inhibidor que carece de actividad proteolítica. En cuanto a su clasificación, los IPs corrientemente son agrupados en familias en función de la similitud de sus secuencias aminoacídicas, donde el nombre de la familia usualmente está relacionado con el de su miembro más prominente.

De acuerdo con la clásica base de datos MEROPS, que incluye tanto proteasas como sus inhibidores, los IPs pueden ser agrupados en 74 familias, sobre la base de las similitudes en su secuencia primaria y estructura 3D. Además, 51 de estas familias tienen características comunes que permiten agruparlas en 38 clanes (Rawlings *et al.* 2012).

Sin embargo algunos autores consideran que los inhibidores de proteasas de origen vegetal pueden ser agrupados en un número más reducido de familias (Majumdar, 2013), tal como se consignan a continuación: inhibidores de proteasas serínicas tipo Bowman-Birk, inhibidores de tripsina de soja (usualmente denominados tipo Kunitz), inhibidores de tripsina de mostaza, inhibidores de tripsina/ α -amilasa de cereales, inhibidores de papa tipo I y tipo II, serpinas, inhibidores de zapallo, inhibidores de proteasas cisteínicas e inhibidores de metalo- y aspartil proteasas. Una excelente base de datos (<http://www.plantpis.ba.itb.cnr.it>) coordinada por investigadores de la Universidad de Bari, Italia, permite acceder fácilmente al conocimiento de la secuencia y estructuras de todos los IPs de origen vegetal existentes hasta este momento (De Leo *et al.*, 2002). A continuación se brinda una breve descripción de las características más salientes de los IPs que integran cada una de estas familias.

Inhibidores de serínproteasas tipo Bowman-Birk (BBIs)

El nombre de la familia corresponde al de los investigadores (Bowman, 1946; Birk *et al.*, 1963) que identificaron y caracterizaron al miembro típico de esta familia, el inhibidor de soja (*Glycine max* L.). Son proteínas ricas en Cys y se encuentran tanto en mono- como en dicotiledóneas, especialmente en cereales, leguminosas y pastos. El inhibidor de soja, el inhibidor de tripsina-1 de girasol (*Helianthus annus* L.) y el inhibidor de maní (*Arachis hypogæa* L.) son ejemplos típicos de BBIs.

Inhibidores de tripsina de soja tipo Kunitz

Los IPs tipo Kunitz están ampliamente distribuidos, pero la mayoría se encuentra en cereales, leguminosas y en varios miembros de las Solanaceae. El inhibidor de papa inducible por stress (Plunkett *et al.*, 1982; Ledoigt *et al.*, 2006) y el inhibidor de tripsina antifúngico aislado de las raíces de *Pseudostellaria heterophylla* Rupr. & Maxim., conocido popularmente en China como “ginseng príncipe” o “ginseng de los pulmones” (Wang & Ng, 2006), son ejemplos típicos de esta clase de inhibidores.

Inhibidores de tripsina de mostaza

Este tipo de IPs han sido aislados y secuenciados a partir de semillas de algunas especies de Cruciferae, tales como la mostaza blanca (*Sinapis alba* L.). Son inhibidores de proteasas serínicas ricos en residuos Cys y Gly (Menegatti *et al.*, 1992). A partir de semillas de nabo (*Brassica rapa* L.) han sido aislados y caracterizados Inhibidores del mismo tipo (Ascenzi *et al.* 1999). El inhibidor de tripsina de mostaza MTI2 ha sido expresado en *Pichia pastoris* (Volpicella *et al.*, 2000) y en *Escherichia coli* (Stefan *et al.*, 2009), pero si bien es activo frente

a parásitos de algunos cultivos, no existen ensayos sobre posibles aplicaciones farmacológicas.

Inhibidores de tripsina/ α -amilasa de cereales

Los miembros de esta familia se distribuyen ampliamente en cereales como trigo, cebada, centeno, maíz, sorgo, mijo perlado, avena, triticale (híbrido de trigo y centeno) y otras especies. La mayoría inhibe únicamente la α -amilasa, pero los inhibidores de la cebada y del centeno también presentan actividad inhibidora de tripsina (Odani *et al.*, 1983), constituyendo uno de los pocos ejemplos de inhibidores recíprocos de hidrolasas de carbohidratos y proteínas. Recientemente se ha informado que el inhibidor aislado del raji o mijo africano (*Eleusine coracana* Gaertn.) reduce la proliferación celular e induce la apoptosis de células tumorales en la leucemia mieloide crónica (Sen & Dutta, 2012).

Inhibidores de proteinasas de papa tipo I

Se trata de inhibidores monoméricos que en su sitio activo contienen Leu y Asn o Met y Asp. Se han aislado de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.), frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y calabaza (*Cucurbita* spp.), pero también se ha inducido su producción en hojas de tomate (Bryant *et al.*, 1976). Del trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* L.) se han aislado un par de inhibidores pertenecientes a esta familia que han mostrado efecto antiproliferativo sobre células T de la leucemia linfoblástica aguda (Park & Obha, 2004).

Inhibidores de proteinasas de papa tipo II

Los miembros de esta familia de inhibidores han sido encontrados únicamente en las Solanaceae (Bryant *et al.*, 1976). Los inhibidores de papa Tipo IIa y IIb han sido aislados de papas japonesas, hecho que soporta la hipótesis de la existencia de diferencias inter- e intravarietales (Kiyohara *et al.*, 1973).

Serpinas

El nombre en inglés (“serpins”) es un acrónimo de “serine protease inhibitors”. Se han encontrado en algas verdes, briófitas, pteridófitas, semillas de cereales, floema de zapallo y otras especies de mono- y dicotiledóneas. Son proteínas relativamente grandes (340-440 aminoácidos) que forman usualmente complejos covalentes irreversibles con las proteasas (Fluhr *et al.*, 2012). Si bien muchos insectos tienen proteasas serínicas en su tracto digestivo, aún no está plenamente demostrado el rol insecticida de estos IPs. Por otra parte algunos miembros de la familia de las serpinas aislados de cebada han demostrado ser capaces de inhibir algunos factores de la coagulación sanguínea tales como trombina, calicreína y los factores VIIa y Xa (Dahl *et al.*, 1996). Desde el punto de vista evolutivo, su presencia en tan amplio rango de representantes del mundo vegetal (de algas verdes a monocotiledóneas) robustece la idea de que se trata de inhibidores ancestrales que fueron los primeros en manifestarse a lo largo de los tiempos.

Inhibidores de proteinasas de zapallo

Son los IPs más pequeños (28-30 aminoácidos) y se encuentran sólo en las Cucurbitáceas. Los IPs aislados del zapallo han demostrado ser activos contra la tripsina bovina y también contra el factor de

Hageman (factor XII de la coagulación), comportamiento que ha estimulado sus potenciales aplicaciones farmacológicas (Hojima *et al.*, 1982).

Inhibidores de proteinasas cisteínicas

Están ampliamente distribuidos tanto en plantas como en animales y microorganismos (Oliveira *et al.*, 2003). Poseen actividad insecticida y están involucrados en la defensa de la planta. Según Barrett *et al.* (1986), los miembros de esta familia están divididos en tres subfamilias o clases: las estefinas, las cistatinas y los quinínógenos, a las que deben agregarse las fitocistatinas, que incluyen a la mayoría de los inhibidores de proteasas cisteínicas presentes en plantas (Habib & Fazili, 2007). La mayoría de los miembros de este grupo son proteínas con un solo dominio, pero algunos de ellos están estructurados como proteínas de múltiples dominios. Ejemplo de ellos son la oryzacistatina del arroz y los inhibidores aislados de soja, maíz, manzana y de varias otras mono- y dicotiledóneas (Pernas *et al.*, 1998).

Inhibidores de metalocarboxipeptidasas

Los miembros de esta familia de IPs que se unen a metalocarboxipeptidasas han sido identificados únicamente en Solanaceae. En tubérculos y hojas de papa están junto a los inhibidores tipos I y II ya citados. Se ha informado que son activos contra carboxipeptidasas de animales y microorganismos, pero no contra las que se encuentran en plantas y levaduras (Havkioja & Neuvonen, 1985).

Inhibidores de aspartilproteasas

Existen pocos informes sobre IPs de aspartilproteasas en plantas. El inhibidor de catepsina D hallado en papas es un ejemplo de ello, que sorprendentemente no inhibe otras proteasas aspárticas como pepsina o renina, pero sí inhibe proteasas serínicas como tripsina y quimotripsina (Habib & Fazili, 2007). Otros ejemplos incluyen IPs aislados de tomate, girasol y zapallo; en este último caso este IP es capaz de inhibir a la proteasa digestiva pepsina (Christeller *et al.*, 1998).

POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS DE ORIGEN VEGETAL

Como ya se ha mencionado, la relación entre proteinasas e inhibidores es celosamente mantenida por los organismos, de modo que siempre se encuentren en un estado de equilibrio, que se disturba en casos de carcinogénesis, infecciones y otros desórdenes patológicos. Este hecho ha sido fehacientemente comprobado en casos de lesiones dérmicas de origen fúngico y/o bacteriano, quemaduras, infecciones oculares y esencialmente en los casos de carcinogénesis (García-Carreño, 1996; Thorburn *et al.*, 2003). En el caso del cáncer existen diversas rutas para su desarrollo, pero siempre los cambios bioquímicos y metabólicos conducen a un incontrolado crecimiento celular, existiendo una estrecha correlación entre la progresión del tumor y el contenido de proteasas celulares, ya que la invasión de los tejidos cercanos al tumor primario requiere la disolución de la barrera que representa la membrana celular y también de las uniones intercelulares (Duffy *et al.*, 2000). Se sabe que la tripsina activa a su vez a las metaloproteasas de la matriz, que promueven la invasión tisular que implica el proceso de metástasis (Nyberg *et al.*, 2002, 2006). También ha sido informada la existencia de una correlación positiva entre el nivel de elastasa y el grado de mortalidad en cáncer de mama (Foekens *et al.*, 2003), hecho que confirma el posible rol de la elastasa en la progresión de este tipo de cáncer (Akizuki *et al.*, 2007; Mittendorf *et al.*, 2012).

Las primeras investigaciones relacionadas con la posibilidad de utilizar los inhibidores de proteasas de origen vegetal para combatir desórdenes clínicos como la alergia y procesos inflamatorios datan de mediados del siglo pasado (Vogel *et al.*, 1968), pero su potencial terapéutico quedó más claramente evidenciado con el uso de inhibidores de trombina, plasmina y calicreína en la coagulación y fibrinólisis (Hojima *et al.*, 1971).

Las Solanaceae han demostrado ser una excelente fuente de IPs. Mediante cultivos celulares de *Scopolia japonica*, planta herbácea que crece en Japón y Corea, denominada coloquialmente la belladona japonesa, se han aislado compuestos con un amplio espectro inhibitorio, ya que son activos contra tripsina, quimotripsina, plasmina, calicreína y pepsina, siendo el único caso de un inhibidor de origen vegetal activo contra esta última proteasa (Sakato *et al.*, 1975). De tubérculos de papa y de frutos maduros de tomate se han aislado y caracterizado inhibidores de metaloexopeptidasas pancreáticas, así como de las carboxipeptidasas A y B (Ryan *et al.*, 1974; Hass & Ryan, 1980); en el caso de los inhibidores de metaloexopeptidasas aislados de tomate se logró posteriormente establecer la secuencia del cDNA (Martineu *et al.* 1991).

Las semillas son una importante fuente de inhibidores de proteasas. Se sabe que la incidencia de cáncer de mama, colon y próstata es significativamente más reducida en poblaciones que consumen elevadas proporciones de semillas tales como porotos, maíz y arroz (Correa, 1981); hay similares reportes de baja incidencia de cáncer bucal y faríngeo entre poblaciones con alto porcentaje de ingesta de cereales y productos panificados (Winn *et al.*, 1984), así como de la disminución de cánceres colorectal y mamario en el caso de individuos con elevado consumo de inhibidores de proteasas de origen vegetal (Blondell, 1988).

Los porotos de soja y los productos derivados de ellos son ricos en IPs y está comprobada la baja ocurrencia de cáncer y la reducida mortalidad provocada por esta clase de enfermedades en poblaciones con alto consumo de productos de soja (Kennedy, 1993). A pesar que la soja es rica en productos naturales anticarcinogénicos como isoflavonoides, saponinas y otros compuestos polifenólicos, la efectividad anticancerígena obedece a la presencia de IPs, en especial del tipo Bowman-Birk (Kennedy, 1995). El mecanismo anticancerígeno de los BBIs en cáncer de mama ya ha sido elucidado: actuaría suprimiendo la actividad proteasomal tipo quimotripsina dentro de la célula, provocando la inhibición de la proliferación celular a través de la acumulación de MAP quinasa fosfatasa-1 (Chen *et al.*, 2005). Los BBIs de semillas han demostrado inhibir el sarcoma de ovario mediante el incremento de la expresión de conexina 43, un componente del sistema supresor de tumores (Suzuki *et al.*, 2005) y también inducir la apoptosis en células provenientes de cáncer de próstata (Tang *et al.*, 2009), de cáncer de colon humanas (Caccialupi *et al.*, 2010) y de cáncer de mama (Joanitti *et al.*, 2010).

El inhibidor de tripsina obtenido de batata ha demostrado ejercer efecto antiproliferativo en células de leucemia promielocítica, induciendo la apoptosis en un proceso que involucra a miembros que regulan procesos de permeabilización mitocondrial tales como p53, Bcl-2, Bax y el citocromo c, que constituyen un punto clave en la vía intrínseca de apoptosis celular (Huang *et al.*, 2007). Por su parte el inhibidor de tripsina aislado de semillas de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert, conocido como "ibirá pitá", induce la apoptosis en células de leucemia humanas (Troncoso *et al.*, 2007).

En cuanto a los IPs tipo Kunitz, en el caso de *Bauhinia bauhinioides* (Mart.) J.F.Macbr., el inhibidor aislado es capaz de reducir la formación de edema en pulmón de conejos causada por los neutrófilos activados vía liberación de elastasa (Neuhof *et al.*, 2003), en tanto que de las raíces del ginseng príncipe se aisló otro IPs de la misma familia con actividad antifúngica sobre *Fusarium oxysporum* (Wang & Ng, 2006). Por su parte Kobayashi *et al.*, (2004) constataron que el inhibidor de tripsina de soja tipo Kunitz impide la invasión celular del cáncer de ovario mediante sobrerregulación de la uroquinasa.

Como ya se mencionó anteriormente, se han aislado de inhibidores de proteinasas de papa tipo I con efecto antiproliferativo sobre células T de la leucemia linfoblástica aguda, induciendo la apoptosis por fragmentación del ADN (Park & Obha, 2004). El mecanismo molecular de la inducción de la apoptosis en tumores sólidos por parte del inhibidor de tripsina aislado de la misma especie obedecería a la pérdida del potencial transmembrana mitocondrial y a la activación de la caspasa (Li *et al.*, 2009). El inhibidor del mijo africano, ejemplo de IPs bifuncionales (tripsina/ α -amilasa), ha demostrado asimismo ser capaz de reducir la proliferación celular e inducir la apoptosis en células de leucemia mieloide crónica (Sen & Dutta, 2012).

Finalmente, algunos IPs vegetales han demostrado poseer otras propiedades, tal el caso de un inhibidor de subtilisina aislado de una variedad de cebada (*Hordeum vulgare* L cv. Kikaihadaka) que exhibe una potente acción antibacteriana (Yoshikawa, 1976). Recientemente, cuatro diferentes IPs aislados y purificados de las semillas de *Lavatera cashmeriana* Camb. han demostrado ser muy activos contra las bacterias patógenas *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Rakashanda, 2012), que además son capaces de inhibir proteasas como tripsina, quimotripsina y elastasa *in vitro* y que luego de explorarse su actividad antitumoral revelaron suprimir el crecimiento de difentes líneas celulares cancerosas (Rakashanda, 2013).

CONCLUSIONES

No existen dudas en este momento acerca de que los inhibidores de proteasas (IPs) son los actores clave en la regulación de la actividad proteolítica. Las proteasas son necesarias en el cuerpo humano en cantidades adecuadas en cada momento y para cada función, por lo que cualquier desequilibrio en la actividad de estas enzimas puede dar como resultado graves desórdenes orgánicos. Al poder disponerse del conocimiento de la estructura tridimensional de muchas proteasas responsables de diferentes trastornos patológicos, se ha podido diseñar y desarrollar en base a técnicas *in silico* una serie de IPs específicos, por lo que muchos IPs sintéticos ya están en uso terapéutico en varias enfermedades. Muchas compañías farmacéuticas están vivamente interesadas en el tema y varios nuevos inhibidores están en ensayo en humanos. La Tabla 1 proporciona un breve resumen de los inhibidores sintéticos más utilizados, el tipo de cáncer y las líneas celulares sobre las que se han ensayado.

Nombre	Tipo de cáncer	Líneas celulares
Amprenavir	Tumores de próstata	LNCaP
Lopinavir e Indinavir	Cáncer cervical	SiHa, CaSki, C33A, C33A-E6 y NIH/373
Nelfinavir	Cáncer de pulmón y de mama	A549, H460 y MCF7
Nelfinavir	Cáncer cervical	SiHa
Nelfinavir y Atazanavir	Glioma maligno	U251 y LN229
Ritonavir	Cáncer de pulmón y de mama	A549, H522, H23 y H838
	Cáncer de ovario	MDH-2774 Y SKOV-3
	Cáncer de mama	MCF7, T47D, MDA-MB-436 Y MDA-MB-231
	Leucemia mieloide	HL-60
Saquinavir	Leucemia	K562, K562R y KCL22-R
	Glioma y melanoma	C6 y B16
Saquinavir-NO	Cáncer de próstata	PC-3
Saquinavir, Amprenavir y Nelfinavir	Cáncer de pulmón	SQ20B, T24 MIAPACA2 y A549

Tabla 1. Inhibidores de proteasas sintéticos, tipos de cáncer y líneas celulares sobre las que se ha ensayado su acción (tomado de Rahimi, *et al.*, 2012).

En cuanto a los IPs de origen vegetal, se han aislado y caracterizado a partir de diferentes plantas un considerable número de IPs. La secuencia aminoacídica y la estructura cristalina de muchos de ellos están disponibles, pero sin embargo sólo unos pocos se usan en medicina o se encuentran en ensayo clínico, siendo los de tipo Bowman-Birk los candidatos más prometedores, que está bajo prueba en humanos. Existirían varias ventajas de la utilización de IPs de origen natural sobre los sintéticos, entre ellas el hecho de que los inhibidores presentes en la planta también se pueden suministrar a través de la dieta (por ejemplo, arroz, legumbres, soja, etc.). Por lo tanto la posibilidad de prevenir el desarrollo de muchas enfermedades (incluidos los diferentes tipos de cáncer) se puede lograr tan sólo mediante la adición de algunas preparaciones alimenticias a base de plantas que no tendrán efectos secundarios en el cuerpo humano.

Esta breve revisión ilustra el estado actual del conocimiento de los inhibidores de proteasas provenientes de plantas, siendo creciente el aporte de nuevas y contundentes investigaciones que demuestran la aplicabilidad de los IPs en la prevención y/o el tratamiento de diversas enfermedades. La continuidad de estos estudios seguramente permitirá cimentar el enorme potencial de los inhibidores IPs vegetales en medicina.

REFERENCIAS

- Akizuki, M., T. Fukutomi, M. Takasugi, S. Takahashi, T. Sato, M. Harao, *et al.* (2007) Prognostic significance of immunoreactive neutrophil elastase in human breast cancer: long-term follow-up results in 313 patients. *Neoplasia* **9**: 260-4.
- Ascenzi, P., M. Ruoppolo, A. Amoresano, P. Pucci, R. Consonni, L. Zetta, *et al.* (1999) Characterization of low-molecular-mass trypsin iso-inhibitors from oil-rape (*Brassica napus* var. *oleifera*) seed. *Eur. J. Biochem.* **261**: 275-84.
- Barrett, A.J., H. Fritz, A. Grubb, S. Isemura, M. Järvinen, N. Katunuma, *et al.* (1986) Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem. J.* **236**, 312.
- Birk, Y., A. Gertler & S. Khalef (1963) A pure trypsin inhibitor from soybean. *J. Biochem.* **87**: 281-4.
- Blondell, J.M. (1988) Urban-rural factors affecting cancer mortality in Kentucky, 1950-1969. *Cancer Detect. Prev.*, **11**: 209-23.
- Bowman, D.E. (1946) Differentiation of soybean antitryptic factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **63**: 547-50.
- Bryant, J., T.R. Green, T. Gurusaddaiah & C.A. Ryan (1976) Proteinase Inhibitor II from potatoes: isolation and characterization of its protomer components. *Biochemistry* **15**: 3418-24.
- Caccialupi, P., L.R. Ceci, R.A. Siciliano, D. Pignone, A. Clemente & G. Sonnante (2010) Bowman-Birk inhibitors in lentil. Heterologous expression, functional characterization and anti-proliferative properties in human colon cancer cells. *Food Chem.* **120**: 1058-66.
- Chen, Y.W., S.C. Huang, S.Y. Lin-Shiau & J.K. Lin (2005) Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis* **26**: 1296-306.
- Christeller, J.T., P.C. Farley, R.J. Ramsay, P.A. Sullivan & W.A. Laing (1998) Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudates. *Eur. J. Biochem.* **254**: 160-7.
- Correa, P. (1981) Epidemiological correlations between diet and cancer frequency. *Cancer Res.* **41**: 3685-90.
- Dahl, S.W., S.K. Rasmussen, L.C. Petersen & J. Hejgaard (1996) Inhibition of coagulation factors by recombinant barley serpin BSZX. *FEBS Lett.* **394**: 165-8.
- De Leo, F., M. Volpicella, F. Licciulli, S. Liuni, R. Gallerani & L.R. Ceci (2002) PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Res.* **30**: 347-8.
- Duffy, M.J., T.M. Maguire, A. Hill, E. McDermott & H. O'Higgins (2000) Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.* **2**: 252-7.
- Fluhr, R., N. Lampl & T.H. Roberts (2012) Serpin protease inhibitors in plant biology. *Physiologia Plantarum* **145**: 95-102.
- Foekens, J.A., C. Ries, M.P. Look, C. Gippner-Steppert, J.G. Klijn & M. Jochum (2003) The prognostic value of polymorphonuclear leukocyte elastase in patients with primary breast cancer. *Cancer Res.* **63**: 337-41.

- Fritz, H. (2000) *Foreword*. In *Proteases as targets for therapy* (K. von der Helm, B.D. Korant, & J.C. Cheronis, eds.). Berlin: Springer-Verlag, V-VI.
- García-Carreño, F.L. (1996) Proteinase inhibitors. *Trends Food Sci. Technol.* **7**: 197-204.
- Habib, H. & K.M. Fazili (2007) Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **2**: 68-85.
- Hass, G.M. & C.A. Ryan (1980) Carboxypeptidase inhibitor from ripened tomatoes: purification and properties. *Phytochemistry* **19**: 1329-33.
- Havkioja, E. & L. Neuvonen (1985) Induced long-term resistance to birch foliage against defoliators: defense or incidental. *Ecology* **66**: 1303-8.
- Hojima, Y., H. Moriya & C. Moriwaki (1971) Studies of kallikrein inhibitors in potatoes. I. Partial purification and some properties. *J. Biochem.* **69**: 1019-25.
- Hojima, Y., J.V. Pierce & J.J. Pisano (1982) Pumpkin seed inhibitor of human factor XIIa (activated Hageman factor) and bovine trypsin. *Biochemistry* **21**: 3741-6.
- Huang, G.J., M.J. Sheu, H.J. Chen, Y.S. Chang & Y.H. Lin (2007) Growth inhibition and induction of apoptosis in NB4 promyelocytic leukemia cells by trypsin inhibitor from sweet potato storage roots. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 2548-53.
- Hung, C.H., C.C. Huang, W.S. Tsai, H.L. Wang & Y.L. Chen (2003) Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Brassica campestris* seeds. *J. Yuanpei Univ. Sci. Tech.* **10**: 13-22.
- Joanitti, G.A., R.B. Azevedo & S.M. Freitas (2010) Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Cancer Lett.* **293**: 73-81.
- Kennedy, A.R. (1993) *Overview: anticarcinogenic activity of protease inhibitors*. In: *Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents*, (W. Troll & A.R. Kennedy, eds.), pp. 9-64. Plenum Publishing Corp., New York and London.
- Kennedy, A.R. (1995) The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *J. Nutr.* **125** (Suppl.): 733s-43s.
- Kiyohara, T., T. Iwasaki & M. Yoshikawa (1973) Chemical and physicochemical characterization of potato proteinase inhibitor I and comparison of its specificity with those of inhibitors II-a and II-b. *J. Biochem.* **73**: 89-95.
- Kobayashi, H., M. Suzuki, N. Kanayama & T. Terao (2004) A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation. *Clin. Exp. Metast.* **21**: 159-66.
- Ledoigt, G., B. Griffaut, E. Debiton, C. Vian, A. Mustel, G. Evray, *et al.* (2006) Analysis of secreted protease inhibitors after water stress in potato tubers. *Int. J. Biol. Macromol.* **38**: 268-71.
- Li, Y.Y., Z. Zhang, Z.H. Wang, H.W. Wang, L. Zhang & L. Zhu (2009) rBTI induces apoptosis in human solid tumor cell lines by loss in mitochondrial transmembrane potential and caspase activation. *Toxicol. Lett.* **189**: 166-75.
- López-Otín, C. & J.S. Bond (2008) Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* **283**: 30433-7.
- Majumdar, D.D. (2013) Recent updates on pharmaceutical potential of plant protease inhibitors. *Int. J. Med. Pharm. Sci.* **3**: 101-20.
- Martineau, B., K.E. McBride & C.M. Houck (1991) Regulation of metallocarboxypeptidase inhibitor gene expression in tomato. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 281-6.
- Menegatti, E., G. Tedeschi, S. Ronchi, F. Bortolotti, P. Ascenzi, R.M. Thomas, *et al.* (1992) Purification, inhibitory properties and amino acid sequence of a new serine proteinase inhibitor from white mustard (*Sinapis alba* L.) seed. *FEBS Lett.* **301**: 10-14.
- Mittendorf, E.A., G. Alatrash, N. Qiao, Y. Wu, P. Sukhmalchandra, L.S. St John, *et al.* (2012) Breast cancer cell uptake of the inflammatory mediator neutrophil elastase triggers an anticancer adaptive immune response. *Cancer Res.* **72**: 3153-62.
- Neuhof, C., M.L.V. Oliva, D. Maybauer, M. Maybauer, C.D. Oliveira, M.U. Sampaio, *et al.* (2003) Effect of plant Kunitz inhibitors from *Bauhinia bauhinioides* and *Bauhinia rufa* on pulmonary edema caused by activated neutrophils. *Biol. Chem.* **384**: 939-44.
- Nyberg, P., M. Moilanen, A. Paju, A. Sarin, U.H. Stenman, T. Sorsa, *et al.* (2002) MMP-9 activation by tumor trypsin-2 enhances in vivo invasion of human tongue carcinoma cells. *J. Dent. Res.* **81**: 831-5.

- Nyberg, P., M. Ylipalosaari, T. Sorsa & T. Sal (2006) Trypsin and their role in carcinoma growth. *Exp. Cell Res.* **312**: 1219-28.
- Odani, S., T. Koide, T. Ono & K. Ohnishi (1983) Structural relationship between barley (*Hordeum vulgare*) trypsin inhibitor and castor-bean (*Ricinus communis*) storage protein. *J. Biochem.* **213**: 543-5.
- Oliveira, A.S., J.X. Filho & M.P. Sales (2003) Cysteine proteinases cystatins. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **46**: 91-104.
- Park, S.S. & H. Obha (2004) Suppressive activity of protease inhibitors from buckwheat seeds against human T-Acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Applied Biochem. Biotechnol.* **117**: 65-74.
- Pernas, M., M.R. Sanchez, L. Gomez & G. Salcedo (1998) A chestnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinases from closely related pests. *Plant Mol. Biol.* **38**: 1235-42.
- Plunkett, G., D.F. Senear, G. Zuroske & C.A. Ryan (1982) Proteinase inhibitors I and II from leaves of wounded tomato plants: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **213**: 463-72.
- Rábade, G.N., J.A. Badillo-Corona, J.S. Aranda-Barradas & M.C. Oliver-Salvador (2011) Production of plant proteases *in vivo* and *in vitro* - A review. *Biotechnol. Adv.* **29**: 983-6.
- Rahimi, H.R., E. Hasanli & H. Jamalifar (2012) A Mini Review on New Pharmacological and Toxicological Considerations of Protease Inhibitors' Application in Cancer Prevention and Biological Research. *Asian J. Cell Biol.* **7**: 1-12.
- Rakashanda, S., M. Ishaq, A. Masood & S. Amin (2012) Antibacterial activity of a trypsin-chymotrypsin-elastaseinhibitor isolated from *Lavatera cashmeriana* Camb. seeds. *J. Animal Plant Sci.* **22**: 983-6.
- Rakashanda, S., A.K. Qazi, R. Majeed, S. Rafiq, I.M. Dar, A. Masood, *et al.* (2013) Antiproliferative Activity of *Lavatera cashmeriana*-Protease Inhibitors towards Human Cancer Cells. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **14**: 3975-8.
- Rawlings, N.D., A.J. Barrett & A. Bateman (2012) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **40**: D343-50.
- Ryan, C.A., G.M. Hass & R. W. Kuhn (1974) Purification and properties of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes. *J. Biol. Chem.* **249**: 5495-9.
- Sakato, K., H. Tanaka & M. Misawa (1975) Broad specificity proteinase inhibitors in *Scopolia japonica* (Solanaceae) cultured cells. *Eur. J. Biochem.* **55**: 211-9.
- Sen, S. & S.K. Dutta (2012) Evaluation of anti-cancer potential of ragi bifunctional inhibitor (RBI) from *Eleusine coracana* on human chronic myeloid leukemia cells. *Eur. J. Plant Sci. Biotechnol.* **6**: 103-8.
- Stefan, A., L. Ugolini, E. Martelli, S., Palmieri & A. Hochkoeppler (2009) Expression and purification of the recombinant mustard trypsin inhibitor (MTI2) in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **108**: 282-5.
- Suzuki, K., T. Yano, Y. Sadzuka, T. Sugiyama, T. Seki & R. Asano (2005) Restoration of connexin 43 by Bowman-Birk protease inhibitor in M5067 bearing mice. *Oncology Reports* **13**: 1247-50.
- Tang, M.X., M. Asamoto, K. Ogawa, A. Naiki-Ito, S. Sato, S. Takahasi, *et al.* (2009) Induction of apoptosis in the LNCaP human prostate cancer cell line and prostate adenocarcinoma of SV40T antigen transgenic rats by the Bowman-Birk inhibitor. *Pathol. Int.* **59**: 790-6.
- Thorburn, J., L.M. Bender, M.J. Morgan & A. Thorburn (2003) Caspase and serine protease dependent apoptosis by the death domain of FADD in normal epithelial cells. *Mol Biol Cell.* **14**: 67-77.
- Troncoso, M.F., V.A. Biron, S.A. Longhi, L.A. Retegui & C. Wolfenstein-Todel (2007) *Peltophorum dubium* and soybean Kunitz-type trypsin inhibitors induce human Jurkat cell apoptosis. *Int. Immunopharmacol.* **7**: 625-36.
- Vogel, R., I. Trautschold & E. Werle (1968) *Natural proteinase inhibitors*. New York: Academic Press.
- Volpicella, M., A. Schipper, M.A. Jongsma, N. Spoto, R. Gallerani & L.R. Ceci (2000) Characterization of recombinant mustard trypsin inhibitor 2 (MTI2) expressed in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* **468**: 137-41.
- Wang, H.X. & T.B. Ng (2006) Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**: 349-53.
- Winn, D.M., R.G. Ziegler, L.W. Pickle, G. Gridley, W. J. Blot & R.N. Hoover (1984) Diet in the etiology of oral and pharyngeal cancer among women from the southern United States. *Cancer Res.* **44**: 1216-22.
- Yoshikawa, M., T. Iwasaki, M. Fujii & M. Oogaki (1976) Isolation and some properties of a subtilisin inhibitor from barley. *J. Biochem.* **79**: 765-73.