



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE
CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
NATURALEZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LA PAPAÍNA COMO AGENTE ANTIANGIOGÉNICO *in vitro*

FRANKLIN OSWALDO GARCÍA CRUZ

Foz do Iguaçu
2023

EVALUACIÓN DE LA PAPAÍNA COMO AGENTE ANTIANGIOGÉNICO *in vitro*

FRANKLIN OSWALDO GARCÍA CRUZ

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz.

Foz do Iguaçu
2023

FRANKLIN OSWALDO GARCÍA CRUZ

EVALUACIÓN DE LA PAPAÍNA COMO AGENTE ANTIANGIOGÉNICO *in vitro*

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz.
UNILA

Ma. Roberta Tognareli Ruiz.
USP

Ma. Priscila Romero Mazzini Pereira.
UNILA

Foz do Iguaçu, 01 de noviembre de 2023

TÉRMINO DE SUMISIÓN DE TRABAJOS ACADÉMICOS

Nombre completo del autor: Franklin Oswaldo García Cruz

Curso: Biotecnología

	Tipo de Documento
<input checked="" type="checkbox"/> graduación	<input type="checkbox"/> artículo
<input type="checkbox"/> especialización	<input checked="" type="checkbox"/> trabajo de conclusión de curso
<input type="checkbox"/> maestría	<input type="checkbox"/> monografía
<input type="checkbox"/> doctorado	<input type="checkbox"/> disertación
	<input type="checkbox"/> tesis
	<input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuales
	<input type="checkbox"/> _____

Título del trabajo académico: **EVALUACIÓN DE LA PAPAÍNA COMO AGENTE ANTIANGIOGÉNICO *in vitro*.**

Nombre del orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz.

Fecha de la Defensa: 01 / 11 / 2023

Licencia no-exclusiva de Distribución

El referido autor:

a) Declara que el documento entregado es su trabajo original, y que sustenta el derecho de conceder los derechos contenidos en esta licencia. Declara también que la entrega del documento no infringe, a su leal saber y entender, los derechos de cualquier otra persona o entidad.

b) Si el documento entregado contiene material sobre el cual no posee los derechos de autor, declara que ha obtenido la autorización del titular de los derechos de autor para otorgar a UNILA – Universidad Federal de la Integración Latinoamericana los derechos requeridos por esta licencia, y que este material cuyos derechos son de terceros está claramente identificado y reconocido en el texto o contenido del documento entregado.

Si el documento presentado se basa en un trabajo financiado o respaldado por una institución distinta a la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, declara haber cumplido con las obligaciones exigidas por el respectivo contrato o convenio.

En la calidad de titular de los derechos del contenido mencionado, el autor autoriza a la Biblioteca Latinoamericana – BIUNILA a disponibilizar la obra, gratuitamente y de acuerdo con la licencia pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 01 de noviembre de 2023.

Firma del responsable

Dedico el presente trabajo a mis padres
por creer en mí y siempre apoyarme a
lograr mis objetivos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme salud y fuerzas para seguir adelante a lo largo de la carrera, siempre me ha bendecido con buenas personas a mi alrededor.

A mis padres Lucia Cruz y Doroteo García por ser el pilar más importante en mi vida, por su amor y apoyo incondicional desde siempre.

A Leonor López por el cariño hacia mi familia , por compartir su conocimiento, apoyo incondicional y por la confianza depositada en mí.

A mi hermana Yency García por el soporte emocional y los felices momentos que hemos compartido.

A Sofia Segura por su apoyo incondicional, por su cariño y animarme a cumplir mis objetivos.

Al Ing. Francisco Zelaya, su esposa Licda. Regina por brindarme la oportunidad de adquirir conocimiento en su empresa farmacéutica, por el aprecio que me tienen.

Al sacerdote Bernabé y Valentin por el apoyo espiritual, por sus consejos y amistad.

Al profesor Dr. Jorge Ruiz, por su paciencia, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación a pesar de la inexperiencia en el área, por inspirar a los alumnos a pensar en grande y seguir sus sueños.

A Luis Beltrán por ser un buen amigo y brindarme el soporte y aprendizaje dentro y fuera del laboratorio, por su paciencia y tiempo.

A Kevin Sánchez por su hermandad desde el inicio de la carrera.

A Roberta Tognareli y Piscila Mazzini por aceptar formar parte de la banca evaluadora.

A todas las personas que me ayudaron y motivaron antes y durante mi estancia en Brasil.

A la UNILA por haberme brindado la oportunidad de estudiar con auxilio económico y posibilitar mi permanencia en Brasil.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”.

Albert Einstein

GARCÍA CRUZ, Franklin Oswaldo. **EVALUACIÓN DE LA PAPAÍNA COMO AGENTE ANTIANGIOGÉNICO *in vitro***. 2023. 42. Trabajo de Conclusión de Curso (Graduación en Biotecnología) – Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2023.

RESUMEN

El uso de la papaína para tratar cicatrices es estudiado desde hace varios años, es utilizada como desbridante, posee acción antiinflamatoria, actuando en la contracción y unión de bordes de heridas que cicatrizan. Sin embargo, su uso sobre células endoteliales microvasculares del cerebro humano no es muy conocido en la literatura, pero se sabe que puede tener un papel importante dentro de la medicina como agente inhibidor del crecimiento vascular en tumores. En el presente trabajo se investigó la posibilidad del uso de la enzima papaína en un modelo de células endoteliales microvasculares de cerebro humano *in vitro*. La inhibición del crecimiento de células vasculares se realizó mediante la evaluación de la citotoxicidad en diferentes concentraciones de la enzima papaína purificada sobre células HBMEC mediante un ensayo colorimétrico de MTT. Fue analizada la capacidad de activación de la migración celular a partir de un ensayo de cicatriz. Fue determinado que las células HBMEC son inhibidas en su crecimiento con un IC₅₀ de 18.22 mM y su capacidad de migración fue disminuida en un 42.24%. Así, se sugiere que la papaína puede ser usada como un agente remodelador de vasos sanguíneos en bajas concentraciones y como un inhibidor de vasos sanguíneos en el cáncer pues obtuvimos buenos resultados con células HBMEC.

Palabras clave: *Angiogénesis ; célula endotelial; papaína ; cultivo celular.*

GARCÍA CRUZ, Franklin Oswaldo. **EVALUATION OF PAPAIN AS AN ANTIANGIOGENIC AGENT *in vitro***. 2023. 42. Trabajo de Conclusión de Curso (Graduación en Biotecnología) – Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2023.

ABSTRACT

The use of papain to treat scars has been studied for several years, it is used as a debridement, it has anti-inflammatory action, acting on the contraction and union of edges of healing wounds. However, its use on microvascular endothelial cells of the human brain is not well known in the literature, but it is known that it may have an important role in medicine as an inhibitor of vascular growth in tumors. In the present work, the possibility of using the enzyme papain in an *in vitro* human brain microvascular endothelial cell model was investigated. Inhibition of vascular cell growth was performed by evaluating cytotoxicity at different concentrations of the purified papain enzyme on HBMEC cells using a colorimetric MTT assay. The capacity to activate cell migration was analyzed from a scar assay. It was determined that HBMEC cells are inhibited in their growth with an IC₅₀ of 18.22 mM and their migration capacity was decreased by 42.24%. Thus, it is suggested that papain can be used as a blood vessel remodeling agent in low concentrations and as a blood vessel inhibitor in cancer since we obtained good results with HBMEC cells.

Key words: *Angiogenesis; endothelial cell; papain; cell culture.*

GARCÍA CRUZ, Franklin Oswaldo. **AVALIAÇÃO DA PAPAÍNA COMO AGENTE ANTIANGIOGÊNICO *in vitro***. 2023. 42. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2023.

RESUMO

O uso da papaína no tratamento de cicatrizes é estudado há vários anos, é utilizada como desbridamento, tem ação anti-inflamatória, atuando na contração e união de bordas de feridas em cicatrização. Porém, seu uso em células endoteliais microvasculares do cérebro humano não é bem conhecido na literatura, mas sabe-se que pode ter um papel importante na medicina como inibidor do crescimento vascular em tumores. No presente trabalho foi investigada a possibilidade de utilização da enzima papaína em modelo *in vitro* de células endoteliais microvasculares do cérebro humano. A inibição do crescimento de células vasculares foi realizada avaliando a citotoxicidade em diferentes concentrações da enzima papaína purificada em células HBMEC utilizando um ensaio colorimétrico MTT. A capacidade de ativar a migração celular foi analisada a partir de um ensaio de cicatriz. Foi determinado que as células HBMEC são inibidas no seu crescimento com um IC50 de 18.22 mM e a sua capacidade de migração foi diminuída em um 42.24%. Assim, sugere-se que a papaína possa ser usada como agente remodelador de vasos sanguíneos em baixas concentrações e como inibidor de vasos sanguíneos no câncer pois obtivemos bons resultados com células HBMEC.

Palavras-chave: *Angiogênese; célula endotelial; papaína; cultura de células.*

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura 1 – Viabilidad celular HBMEC.....	22
Figura 2 – Microscopía óptica de células HBMEC con tratamiento de enzima papaína.....	24
Figura 3 – Microscopía óptica de células HBMEC sin tratamiento de enzima papaína.....	25

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 – Viabilidad células HBMEC.....	23
--	----

LISTA DE ABREVIACIONES Y SIGLAS

ADN: ácido desoxirribonucleico;

ARN: ácido ribonucleico;

BBB - del inglés: Blood Brain Barrier;

cm² : centímetro cuadrado;

CTSB: catepsina B;

CTSL: catepsina L;

CTSS: catepsina S;

DMEM - del inglés: Dulbecco's Modified Eagle's Medium;

DMSO - del inglés: Dimetilsulfóxido;

HBMEC - del inglés: Human Brain Microvascular Endothelial Cells;

HUVEC - del inglés: Human Umbilical Vein Endothelial Cells;

IC50: Concentración Inhibitoria Media;

iPSCs - del inglés: induced pluripotent stem cells;

ISCT- del inglés: International Society for Cellular Therapy;

mL: mililitro;

mM: milimolar;

MTT: Ensayo de brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio;

PBS - del inglés: Phosphate Buffered Saline (Solución salina tamponada con fosfato);

PF: paraformaldehído;

Rip1-Tag2: modelo de ratón transgénico;

RPM: Revolución por minuto;

SVEC - del inglés: Splenic vascular endothelial cells;

TES: terapia enzimática sistémica;

µL: microlitro;

UNILA: Universidad Federal de la Integración Latinoamericana;

VCAM 1: Molécula de adhesión de celular vascular 1;

VEGF - del inglés: Vascular endothelial growth factor;

VEGF-A- del inglés: Vascular endothelial growth factor A;

VEGFR-1- del inglés: Vascular endothelial growth factor receptor-1;

VEGFR-2 - del inglés: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2;

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	10
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. CÁNCER	11
2.2. ANGIOGÉNESIS	12
2.2.1. Microambiente tumoral	13
2.3. QUIMIOTERÁPICOS	14
2.3.1. Tratamientos Antiangiogénicos	14
2.4. DIFERENCIA ENTRE CÉLULAS NORMALES, TUMORALES Y CANCERÍGENAS	15
2.5. CÉLULAS ENDOTELIALES	15
2.6. CÉLULAS ENDOTELIALES MICROVASCULARES DEL CEREBRO HUMANO - HBMEC	15
2.7. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS	16
2.7.1. Papaína	16
2.7.1.1. Uso de la Papaína en HBMEC	17
3. JUSTIFICATIVA	19
4. OBJETIVOS	20
4.1. OBJETIVO GENERAL	20
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. METODOLOGÍA	21
5.1. DESCONGELAMIENTO DEL LINAJE CELULAR	21
5.2. SUBCULTIVO DEL LINAJE DE CÉLULAS HBMEC	21
5.3. CONTEO CELULAR CON AZUL DE TRIPANO	22
5.4. TRATAMIENTO CON PAPAÍNA	22
5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
5.7. ANÁLISIS DE MIGRACIÓN CELULAR	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	26
6.1. CÉLULAS HBMEC	26
6.2. VIABILIDAD CELULAR HBMEC POR ENSAYO MTT	26
6.3. EVALUACIÓN DEL ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR	28
7. CONSIDERACIONES FINALES	30
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUCCIÓN

La medicina regenerativa e ingeniería de células y tejidos tienen un papel fundamental en el desarrollo de tejidos y órganos para trasplantes (LEVIN *et al.*, 2019), además de presentar resultados favorables en la regeneración de vasos sanguíneos, sin embargo, aún no se comprende totalmente los mecanismos reguladores responsables de la regeneración endotelial y reparación vascular (EVANS *et al.*, 2020).

La cicatrización cutánea involucra la interacción de varias células, las células endoteliales HBMEC se han estudiado para buscar marcadores de superficie celular. Recientemente se descubrió que la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM 1) es expresada selectivamente en HBMEC (EVANS *et al.*, 2020).

La molécula VCAM 1 es una proteína que participa de la adhesión y trans migración de leucocitos para el intersticio durante la inflamación, en el sistema cardiovascular no es bien comprendido como funciona la VCAM 1, sin embargo varios estudios demostraron que dicha molécula es expresada bajo altos niveles de inflamación y condiciones crónicas en algunas enfermedades como hipertensión, aterosclerosis, accidente vascular cerebral, entre otras (KONG *et al.*, 2018) (TRONCOSO *et al.*, 2021)

En el cáncer la VCAM 1 actúa en la angiogénesis tumoral aumentando la densidad de microvasos del cáncer de mama y en el cáncer gástrico, además se descubrió que la regulación negativa de VCAM 1 reduce la migración de células HUVEC inducida por TNF alfa y formación de tubos, dicha molécula puede ser un objetivo clave para regular la angiogénesis tumoral (KONG *et al.*, 2018).

La VCAM 1 está sobreexpresada en tejidos de cáncer de pulmón, el direccionamiento de dicha molécula puede ser un método para regular la metástasis tumoral (KONG *et al.*, 2018).

La ausencia de tratamientos exitosos de regeneración de tejidos presenta limitantes para la terapéutica de accidentes cerebrovasculares, se ha demostrado la eficacia de terapias con células madre, células madre pluripotentes inducidas, células madre mesenquimales y células neuronales (KIM *et al.*, 2021).

Por otro lado, la angiogénesis es fundamental en el desarrollo del cáncer, la nutrición de las células tumorales y formación de nuevos vasos sanguíneos dependen de ello (TAYAL *et al.*, 2019).

La enzima papaína se ha investigado para evaluar la actividad

antiangiogénica con fines terapéuticos para el descubrimiento de fármacos y como agente preventivo contra enfermedades humanas relacionadas con la angiogénesis (TAYAL *et al.*, 2019).

Existe registro de la enzima proteolítica vegetal papaína como agente antiangiogénico en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), ejerciendo un efecto inhibitor sobre el crecimiento celular, migración celular y formación de tubos (MOHR y DESSER, 2013).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un regulador indispensable para la angiogénesis fisiológica y patológica en enfermedades como el cáncer, tiene un papel importante en la regulación de la angiogénesis tumoral (MOHR y DESSER, 2013; KONG *et al.*, 2018). La papaína provoca una disminución de la proliferación, invasión y migración en líneas celulares de colangiocarcinoma humano, con una actividad citotóxica, perjudicando el crecimiento tumoral (MÜLLER *et al.*, 2016).

La actividad de las enzimas proteolíticas es importante en la regulación de la angiogénesis, invasión y metástasis. La proteólisis es necesaria para diversas etapas en el desarrollo de cánceres malignos, es por ello que es necesario su estudio para inhibir sus funciones (ELIE *et al.*, 2010).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CÁNCER

Un tumor puede ser encontrado en procesos inflamatorios e infecciosos, es sinónimo de neoplasia benigna o maligna, caracterizado por un crecimiento anormal y desordenado que excede los tejidos normales, cáncer hace referencia a tumores malignos (ANDRADE y SILVA, 2007).

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento celular descontrolado, con pérdida de estructura celular, con potencial de diseminación de tejido, proceso llamado metástasis (FRAZAO *et al.*, 2023).

En el caso de tumores sólidos presentan angiogénesis patológica o incontrolada, en tal condición el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos se realiza desorganizadamente (GOEL *et al.*, 2011).

En el cáncer las células humanas normales pasan a adquirir capacidades funcionales cruciales para formar tumores malignos, pasan a estados de crecimiento

neoplásico (HANAHAN, 2022). En la actualidad el cáncer aumenta su tasa de mortalidad global con aproximadamente 6 millones de muertes anualmente, lo que representa mayores inversiones destinadas a investigaciones para tratamientos oncológicos (BRITO *et al.*, 2022).

Las células cancerígenas se mueven y se filtran en el estroma y tejidos adyacentes con pocas limitaciones, es por ello que la remoción completa de los tumores es un procedimiento complejo, con la posibilidad de proliferar nuevos tumores (FRAZAO *et al.*, 2023).

La urbanización, industrialización y mayor expectativa de vida de la población son factores que aumentan los agentes cancerígenos ambientales o posibilitan la una prolongada exposición a dichos agentes, de esta forma contribuyen a un aumento de la incidencia del cáncer (ANDRADE y SILVA, 2007).

2.2. ANGIOGÉNESIS

La formación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso fisiológico para la reparación de tejidos, desarrollo embriológico y crecimiento normal. Sin embargo, su desregulación es una característica del cáncer o tumor maligno y ocurre por varias patologías (GOEL *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2023).

La eficiencia de la quimioterapia se ve interrumpida por anomalías que impulsan la progresión tumoral como la creación de una red vascular anormal caracterizada por vasos dilatados, hiperpermeables y tortuosos (GOEL *et al.*, 2011). En las células tumorales factores angiogénicos desencadenan la angiogénesis, es caracterizada por el establecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de estimulación de proliferación endotelial (DA SILVA *et al.*, 2021).

El cáncer depende de la angiogénesis para satisfacer demandas metabólicas de proliferación de células cancerígenas mediante la neovasculatura, el desarrollo de agentes antiangiogénicos ha logrado importantes avances en el tratamiento contra el cáncer (DA SILVA *et al.*, 2021).

El conocimiento de la importancia de un rico suministro de sangre para el crecimiento de un tumor surgió por primera vez hace más de 100 años y solo fue en la década de los 70 que se describió más detalladamente como que un tumor adquiere la capacidad angiogénica (GOEL. *et al.*, 2011).

La molécula de adhesión de celular vascular 1 (VCAM-1) está intrínsecamente asociada a la angiogénesis tumoral y la metástasis en el cáncer (KONG *et al.*, 2018). Factores pro-angiogénicos como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico, angiopoyetina, factor de crecimiento de hepatocitos, factores antiangiogénicos conteniendo trombospondina, endostatina y angiostatina regulan la angiogénesis (KONG *et al.*, 2018).

Las células cancerosas pueden realizar cooptación vascular o formación de nuevos vasos sanguíneos con el fin de obtención de nutrientes para el crecimiento celular y diseminación en órganos lejanos (GOEL *et al.*, 2011). La angiogénesis disfuncional puede ser el resultado de un daño en la barrera hematoencefálica (BBB), es observada en estados neuro inflamatorios (MOTTA *et al.*, 2023).

La angiogénesis tumoral relaciona la vasculatura asociada al tumor, el tumor necesita eliminar restos metabólicos y dióxido de carbono. La angiogénesis tumoral está continuamente activa formando nuevos vasos sanguíneos aberrantes para ayudar en el mantenimiento y crecimiento del tumor (POTENTE *et al.*, 2011).

2.2.1. Microambiente tumoral

El microambiente tumoral es un entorno compuesto por células normales, células endoteliales, fibroblastos (células madre), células inmunitarias (macrófagos), moléculas, vasos sanguíneos y componentes de la matriz extracelular que interactúan y alimentan a las células tumorales. Dentro de este microambiente están presentes las catepsinas que desempeñan la función de regular los procesos proteolíticos que contribuyen con la progresión del cáncer (HOLZEN *et al.*, 2020).

Los macrófagos son esenciales para el crecimiento de las células tumorales porque promueven el crecimiento, invasión y metástasis, debido a que los macrófagos pueden expresar catepsinas como CTSS, CTSL y CTSB (HOLZEN *et al.*, 2020).

Algunos estudios relacionados con el cáncer de mama han demostrado que las CTSS promueven a la metástasis pulmonar, por lo que al reducir la expresión de CTSS en el microambiente tumoral reduce significativamente a las células pulmonares tumorales. Las CTSS fue identificado como un factor prometastático en el cáncer de

mama que facilitaba la supervivencia y trans migración de las células tumorales (HÖLZEN *et al.*, 2020).

Estudios relacionados a las CTSL demostraron que pueden existir diferentes efectos en diferentes tipos de tumores, por ejemplo al eliminar el CTSL en el cáncer neuroendocrino de páncreas (Rip1-Tag2) suprimió el incremento de la formación y desarrollo de tumores. Mientras que en la carcinogénesis de la epidermis y el tracto intestinal las CTSL aumentan la formación y desarrollo de tumores (HÖLZEN *et al.*, 2020).

2.3. QUIMIOTERÁPICOS

Fármacos y sustancias químicas han sido empleados para tratar el cáncer, estos medicamentos quimioterápicos pueden actuar como: agentes alquilantes (dañando el ADN, previniendo la replicación), inhibiendo la topoisomerasa (previniendo el desarrollo y replicación del ADN), antimetabolitos (bloqueando la división celular y síntesis del ADN y ARN), terapias hormonales y moleculares dirigidas (bloqueando o interfiriendo en vías específicas), agentes antimicrotubulares (interrumpiendo los microtúbulos, división celular), antibióticos (interfiriendo en el ADN y ARN) y finalmente como antiangiogénico (Inhibiendo la vascularización) (MAKIN, 2018).

La quimioterapia tiene como objetivo principal inhibir la proliferación celular y la multiplicación tumoral, con el fin de evitar la invasión y metástasis (AMJAD. *et al.*, 2023). Medicamentos quimioterapéuticos actúan matando células, tienen como objetivo las células en división (MAKIN, 2018).

2.3.1. Tratamientos Antiangiogénicos

La terapia antiangiogénica ha sido aprobada para el tratamiento de varios tipos de cáncer en los últimos 20 años, los medicamentos más utilizados han sido el bevacizumab y sorafenib. El Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal que es capaz de ligarse al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A), el cual es un ligante que se une y activa receptores VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2) en las células endoteliales (HUANG *et al.*, 2022).

De esta manera el bevacizumab bloquea la activación inducida por el VEGF-A y reduce la formación de nuevos vasos sanguíneos inhibiendo la proliferación

migración y supervivencia de las células endoteliales interrumpiendo de esta manera el proceso de angiogénesis (HUANG *et al.*, 2022).

El sorafenib es un inhibidor antiangiogénico de la tirosina quinasa que suprime las vías de señalización VEGFR y PDGFR. Además actúa en VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Raf quinasas, c-kit, PDGFR α y PDGFR β . De esta manera el sorafenib inhibe el crecimiento de vasos sanguíneos y células tumorales que producen efectos antitumorales (HUANG *et al.*, 2022).

Ocasionalmente se produce una resistencia a dichos fármacos antiangiogénicos en el tratamiento, lo que conduce a malos resultados y el fracaso del tratamiento (HUANG *et al.*, 2022).

2.4. DIFERENCIA ENTRE CÉLULAS NORMALES, TUMORALES Y CANCERÍGENAS

Existen varias diferencias entre células normales y células tumorales que pueden ser tumores no cancerosos y tumores cancerosos.

Con respecto a las células normales, tiene un patrón de crecimiento regulado por lo que responde a los diferentes tipos de señales que son producidas por las células vecinas y el microambiente (ELDRIDGE, 2023).

El crecimiento de este tipo de células es controlado, pues cuando alcanzan o llegan a la cantidad necesaria para proliferar asegurando así la integridad del tejido y evitando malformaciones. Las células normales pueden sufrir apoptosis o reparación cuando las células se dañan o envejecen (ELDRIDGE, 2023).

Por lo general las células humanas crecen y proliferan a través de la división celular formando así nuevas células, aunque en ocasiones el proceso puede formar células anormales o dañadas. Este tipo de células forman tumores cancerosos (malignos) o no cancerosos (benignos) (ELDRIDGE, 2023).

Los tumores benignos no sufren metástasis por lo que no forman nuevos tumores aunque estos pueden tener diferentes tamaños. Los tumores malignos o cancerígenos son capaces de sufrir metástasis pudiendo invadir tejidos próximos o situados en diferentes partes del cuerpo. Además, no responden a las señales que

indican el momento en que estas células deben dejar de crecer, siendo capaces de tener un crecimiento rápido y descontrolado (ELDRIDGE, 2023).

2.5. CÉLULAS ENDOTELIALES

La formación de nuevos vasos sanguíneos involucra el desarrollo de nuevas células endoteliales y su ordenamiento en estructuras tubulares (vasculogenesis), además de la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes (angiogénesis) (POTENTE *et al.*, 2011). Las células endoteliales tumorales no presentan apoptosis y senescencia a través de vías de supervivencia celular como sucede en las células endoteliales normales (BUSSOLATI *et al.*, 2003).

2.6. CÉLULAS ENDOTELIALES MICROVASCULARES DEL CEREBRO HUMANO - HBMEC

Las células endoteliales microvasculares del cerebro humano (HBMEC - siglas en inglés) suministran nutrientes a los tejidos cerebrales y protegen el cerebro ante sustancias tóxicas presentes en la sangre (PERSIDSKY *et al.*, 2006). Las células HBMEC son una de las cuatro células clave de la barrera hematoencefálica (BBB o BHE), también lo son los astrocitos, células perivasculares (pericitos) y neuronas (STONE *et al.*, 2019).

La barrera hematoencefálica separa el suministro de sangre periférica y el tejido neuronal (STONE *et al.*, 2019), las HBMEC se distinguen por ser tener uniones estrechas entre las células vecinas formando una barrera similar a un sello, es por ello que la barrera hematoencefálica es más restringida debido a la menor cantidad de poros o fenestraciones en comparación con otras células endoteliales presentes en otros órganos (PERSIDSKY *et al.*, 2006).

Las células comúnmente usadas en investigaciones son células endoteliales microvasculares cerebrales primarias de animales vertebrados, células HBMEC inmortalizadas, células microvasculares primarias del cerebro humano y también pueden ser obtenidas a partir de células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSCs), (KATT *et al.*, 2016).

2.7. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

La actividad proteolítica es fundamental en la invasión, metástasis y angiogénesis, debido a que necesitan de la degradación de la membrana basal y matriz extracelular para formar vasos sanguíneos y diseminar las células cancerígenas desde el tumor (ELIE *et al.*, 2010). Estudios demostraron los beneficios de la terapia enzimática sistémica (TES) usando una mezcla padronizada de tripsina, quimotripsina, papaína y bromelina pueden presentar actividad antitumoral y antimetastática (BEUTH, 2008).

Experimentos *in vivo* realizados en animales demostraron efecto antitumoral y se observó que las enzimas proteolíticas prolongaron el tiempo de supervivencia de ratones con melanoma y cáncer de pulmón, con respecto a estudios *in vitro* utilizando células de sarcoma de ratón, se observó una reducción del crecimiento tumoral y metástasis debido al contacto con la enzima proteolítica bromelina (BEUTH, 2008).

La terapia enzimática sistémica redujó la incidencia y la gravedad de efectos colaterales inducidos por el cáncer de mama o por la quimioterapia y radioterapia en los pacientes. En pacientes con cáncer colorrectal también se presentaron mejoras en los síntomas específicos del cáncer y la terapia (BEUTH, 2008).

2.7.1. Papaína

La papaína es un complejo de enzimas proteolíticas y peroxidasas, que promueve la proteólisis en tejidos necrosados y/o debilitados (SILVA *et al.*, 2020). Es muy utilizada en el tratamiento de lesiones tisulares, posee alta eficiencia en la lisis específica de tejidos muertos (LIMA *et al.*, 2021).

La papaína es una sustancia extraída de la fruta de la especie *Carica papaya L* conocida por diferentes nombres como papaya, mamón, fruta bomba y olocotón,

la extracción del látex se realiza cuando el fruto se encuentra verde. Existen diversos métodos de purificación para la obtención de la papaína como extracción acuosa bifásica mediante cromatografía con fases ion-polímero siendo más económica, o polímero-polímero que genera mayor rendimiento con menos materia prima (LIMA *et al.*, 2021).

Es comercializada en forma líquida, gel o liofilizada, presenta un olor característico. Es soluble en agua y glicerol, siendo insoluble en alcohol y éter (SILVA *et al.*, 2020). Un desafío que se presenta en el uso de papaína es la estabilidad y mantenimiento de la acción enzimática, por lo que es importante el almacenamiento para detectar pérdida de la actividad enzimática, es necesario congelar la enzima para preservar sus propiedades ya que la mayoría de las enzimas no son estables en temperatura ambiente, lo que provoca la pérdida de la actividad biológica en un corto periodo de tiempo (SILVA *et al.*, 2020).

Según CABRAL *et al.*, (2017) la papaína al ser una enzima proteolítica podría reaccionar y destruir el tejido sano, pero eso es evitado debido a la presencia de una antiproteasa plasmática (anti tripsina), caso la acción proteolítica sea mayor ocurrirá la destrucción del tejido sano provocando sangramiento y sensación de dolor.

El autor FERREIRA *et al.*, (2008) señala que la papaína quiebra cualquier proteína que contenga residuos de cisteína, esa propiedad no la torna selectiva tomando en consideración que muchas proteínas e incluso factores de crecimiento contienen residuos de cisteína. El colágeno al no poseer residuos de cisteína no sufre la acción de la papaína.

2.7.1.1. Uso de la Papaína en HBMEC

En la literatura no fueron encontrados antecedentes de la enzima proteolítica papaína utilizando las células endoteliales microvasculares del cerebro humano (HBMEC) como modelo de aplicación *in vitro*, sin embargo se sabe que el genoma humano codifica un grupo de 11 peptidasas de cisteína endolisosomales conocidas como catepsinas de cisteína semejantes a la papaína (HÖLZEN *et al.*, 2020).

Las catepsinas de cisteína tienen funciones en la regulación de la proliferación, muerte y motilidad de células cancerígenas. En ratones hubo cambios angiogénicos y reducción del crecimiento invasivo en tumores pancreáticos revelando la

importancia de las catepsinas (MOHAMED y SLOANE, 2006; OLSON y JOYCE, 2015).

Basado en estudios realizados usando enzimas proteolíticas similares a la papaína en modelos celulares endoteliales como HUVEC y SVEC se propone su estudio en células HBMEC, ya que esas enzimas son multifuncionales en el cáncer y es posible conocer su actividad en la metástasis y angiogénesis.

A pesar de que las catepsinas reciclan proteínas para la sobrevivencia y proliferación de células cancerígenas, también modifican irreversiblemente el microambiente tumoral. Aún no se tiene la total comprensión de la actividad de la catepsina en el microambiente tumoral (OLSON y JOYCE, 2015).

3. JUSTIFICATIVA

En ocasiones los fármacos antiangiogénicos no han sido eficaces en la terapia debido a una resistencia, esa resistencia es desarrollada por un gran porcentaje de los pacientes durante el tratamiento clínico o no responden completamente (HUANG *et al.*, 2022). La resistencia a los medicamentos se ha convertido en el principal obstáculo que dificulta la eficiencia de la terapia antiangiogénica, es necesario controlar esa resistencia y aumentar la respuesta terapéutica (HUANG *et al.*, 2022).

Estos fármacos son utilizados en el tratamiento de enfermedades como artritis, retinopatía diabética y tumores, estos padecimientos tienen como característica una angiogénesis descontrolada, células cancerígenas necesitan de suministro de sangre para su crecimiento y proliferación (LANDROVE y MOREIRA, 2021).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo (BACHAPALLE *et al.*, 2023) en ese sentido se investigó la enzima proteolítica papaína extraída del látex del fruto verde de *Carica papaya* como potencial agente antiangiogénico usando células endoteliales microvasculares del cerebro humano (HBMEC) como modelo.

Con la finalidad de reducir el desarrollo descontrolado de vasos sanguíneos en tumores e inhibir el crecimiento y proliferación de células endoteliales. Existen antecedentes utilizando células derivadas del endotelio de las venas del cordón umbilical humano (HUVEC) y células endoteliales de venas safenas humanas (SVEC) como modelo de investigación de la angiogénesis (DECICCO SKINNER *et al.*, 2014).

Se sabe que la actividad proteolítica es importante para la angiogénesis, invasión y metástasis, procesos que requieren degradación de la matriz extracelular y la membrana basal para conseguir diseminar las células cancerígenas de la masa tumoral primaria y formación de los vasos sanguíneos (ELIE *et al.*, 2010).

Se utilizaron células inmortalizadas HBMEC debido a que se dividen indefinidamente, no presentan senescencia. En la senescencia ocurre una parada estable del ciclo celular, en tumores es inducida cuando se presenta un estrés oncogénico generando la pérdida de los genes supresores de tumor en células primarias o tumorales (CALCINOTTO *et al.*, 2019)

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Investigar la actividad antitumoral de la enzima proteolítica papaína en el cultivo de células endoteliales microvasculares del cerebro humano.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar los niveles de inhibición de la enzima papaína en células inmortalizadas HBMEC.
- Determinar la concentración de papaína necesaria para la inhibición del crecimiento y disminución de la migración celular en células endoteliales.

5. METODOLOGÍA

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada a la Salud de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana (UNILA), ubicado en el Jardín Universitario (JU).

5.1. DESCONGELAMIENTO DEL LINAJE CELULAR

Las HBMEC estaban almacenadas en un criotubo a una temperatura de -80°C . En un tubo tipo falcon de polipropileno 15 mL previamente esterilizado se colocó el material del criotubo y 5 mL de medio de cultivo DMEM completo. En seguida, se homogeneizó y centrifugó por 10 min a 1200 rpm.

El sobrenadante se descartó por inversión, se adicionó 1 mL de medio de cultivo para resuspender las células y en seguida se adicionaron 9 mL de DMEM completo. Se homogeneizó y se agregó la suspensión celular en un frasco de cultivo de células de 75 cm^2 (BIOFIL, China). Se reservó en la estufa a 37°C con 5% de CO_2 realizando el cambio de medio de cultivo a cada 3 días.

5.2. SUBCULTIVO DEL LINAJE DE CÉLULAS HBMEC

Se removió el medio de cultivo del frasco a tripsinizar y se lavó 2 veces la superficie revestida de HBMEC adicionando PBS, con el objetivo de desagregar las células del frasco de cultivo se adicionaron 1.5 mL de tripsina- EDTA (0.25%) durante 3 minutos a 37°C . Después de 3 min se observó el frasco de cultivo de células en el microscopio invertido, se neutralizó la tripsina-EDTA agregando 5 mL de medio de cultivo DMEM completo.

Luego se agregó el contenido en un tubo tipo falcon de polipropileno de 15 mL y se centrifugó por 10 min a 1200 rpm, en seguida se retiró el sobrenadante y se recuperó el pellet para resuspender, además de realizar la transferencia de células HBMEC para otros frascos.

5.3. CONTEO CELULAR CON AZUL DE TRIPANO

Se contaron las células en la cámara de Neubauer aplicando colorante azul de tripano para determinar su densidad por mililitro de medio de cultivo. Esta técnica es utilizada para diferenciar células viables de las inviables, las células inviables serán azules mientras que las células viables no serán permeables al colorante.

Después del paso 5.2, se llevaron los frascos de medio de cultivo (BIOFIL, China) a la cabina de seguridad biológica y fue destacado el medio de cultivo, se adicionaron 3 mL de PBS para realizar dos lavados y se descartó (REGALADO MARTINEZ, 2021).

En seguida, se agregaron 1.5 mL de tripsina-EDTA en cada frasco y se reservaron en la incubadora de CO₂ por 3 a 5 minutos o hasta que las células se desprendieran de los frascos, luego se agregaron 4.5 mL de medio de cultivo DMEM completo para neutralizar la tripsina.

El contenido celular de los frascos de cultivo se trasladó para tubos tipo falcon de polipropileno de 15 mL, se descartó el sobrenadante obtenido después de centrifugar por 10 min a 1500 rpm. El precipitado fue resuspendido con 1 mL de medio DMEM para realizar el conteo (REGALADO MARTINEZ, 2021).

Para ser colocado en la cámara de Neubauer se preparó en un microtubo (eppendorf) 10 µL de las células HBMEC y 10 µL del colorante azul de tripano, luego se trasladó a la cámara de Neubauer y se contabilizaron las células, se buscó el porcentaje de viabilidad celular para realizar el cálculo de la concentración deseada (REGALADO MARTINEZ, 2021).

5.4. TRATAMIENTO CON PAPAÍNA

La enzima proteolítica papaína fue adquirida liofilizada de la empresa Atená Biotecnología en la concentración 0.43 M, posteriormente fue disuelta con agua ultrapura y experimentada en las HBMEC para analizar el efecto antiangiogénico.

La proliferación e invasión de las células endoteliales se realizó mediante el ensayo de cicatrización y el potencial antiangiogénico sería posible descubrirlo mediante un ensayo de formación de tubos de células endoteliales (JIANG *et al.*, 2020).

Este último se refiere al método rápido y cuantitativo para determinar genes o vías relacionadas en la angiogénesis, basado en que las células endoteliales consiguen retener la capacidad de dividirse y migrar rápidamente en respuesta a señales angiogénicas (DECICCO SKINNER *et al.*, 2014).

El ensayo de formación de tubos es ventajoso en relación a otros ensayos debido a que es fácil de configurar y barato en comparación con otros, es posible identificar factores que potencializan o inhiben la angiogénesis. Además de ser implementado en experimentos usando líneas celulares humanas como HUVEC, HBMEC y SVEC (DECICCO SKINNER *et al.*, 2014).

5.5. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Se realizó la evaluación citotóxica mediante el ensayo colorimétrico de brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio (MTT), en una placa de 96 pocillos se adicionó 50 μL de medio de cultivo DMEM con la concentración de 1×10^4 de células/pocillo, se conservó en la incubadora de CO_2 por 24 horas para que ocurriera su fijación.

Después de 24 horas se procedió a realizar 8 diluciones seriadas de la enzima papaína para agregar 50 μL en cada pocillo, las concentraciones utilizadas fueron 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13%, 1.56%, 0.78% y 0.39%.

Cada concentración fue probada en sextuplicata, para el control positivo se utilizó DMSO al 10% para obtener la muerte celular y para el control negativo se agregó 50 μL del medio de cultivo solamente, la placa de 96 pocillos fue posteriormente incubada por 24 horas para que la papaína reaccionara en las células (REGALADO MARTINEZ, 2021; SELL, 2021).

Al pasar 24 horas se adicionaron 20 μL de MTT en cada pocillo y se incubó por 4 horas a 37°C . Después incubado se eliminó el medio conteniendo MTT y se adicionaron 100 μL de DMSO a cada pocillo para solubilizar los cristales de formazán incubando por 15 min en temperatura ambiente (CHAMBY ESPEJO, 2023).

Posteriormente, se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 570 nm y 630 nm, con el objetivo de determinar la viabilidad celular. Los valores de absorbancia obtenidos fueron transformados en porcentajes utilizando de referencia los controles negativos.

El parámetro de evaluación del ensayo fue mediante el IC₅₀ que es una medida cuantitativa que indica la cantidad de una sustancia inhibidora particular que se necesita para inhibir en este caso el crecimiento celular, es determinado en un 50%, a partir de esos datos se realizó una curva de viabilidad celular en función de la concentración de papaína (REGALADO MARTINEZ, 2021; SELL, 2021).

5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos a partir del ensayo de MTT que representan la viabilidad celular fueron normalizados utilizando el programa estadístico GraphPad Prism versión 6.0 por medio de una regresión no lineal y el IC₅₀.

5.7. ANÁLISIS DE MIGRACIÓN CELULAR

Se realizó el ensayo de cicatrización de heridas para medir la migración celular en conjunto. Para el experimento se cultivaron las células HBMEC a 5×10^5 células/ mL en una placa de 6 pozos con la finalidad de obtener una confluencia del 90%. Se adicionó medio de cultivo conteniendo 1% de suero y se incubó por 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Al día siguiente se realizaron “heridas” en los pozos conteniendo las células, para ello se utilizaron puntas estériles de 200 µL se realizaron trazos por la monocamada de células con un ángulo de inclinación de 30 grados. Posteriormente se lavó una vez con PBS para descartar los restos celulares desprendidos de la zona de “herida”.

La concentración escogida para hacer el ensayo fue 25 mM de la enzima papaína, en triplicata fue adicionado 100 uL de medio de cultivo DMEM conteniendo la concentración de la enzima y en otra triplicata fue adicionado solamente el medio DMEM en 100 uL como control. Al transcurrir 24 horas fue analizada la migración celular en cada pozo bajo el microscopio invertido marca Nikon de rango medio y fue fotografiado. El cálculo del área de cicatrización de herida fue analizado con el software Image J. Fiji.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. CÉLULAS HBMEC

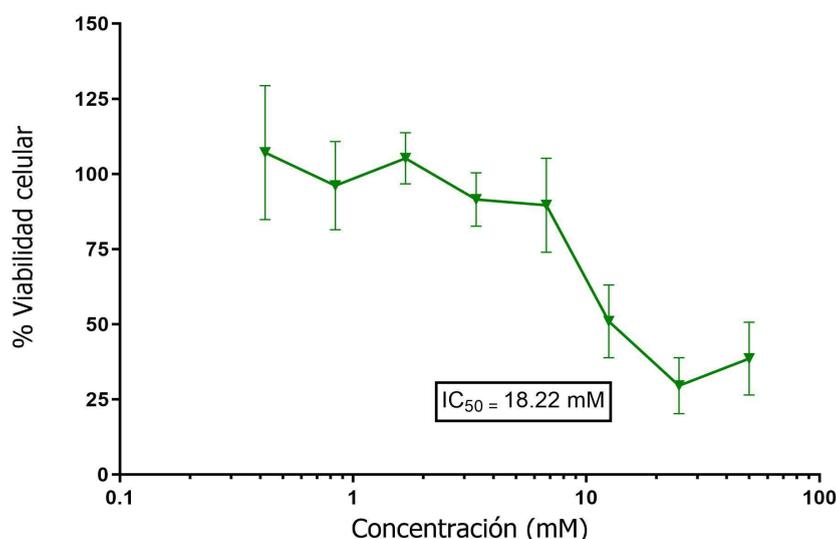
Las células HBMEC fueron descongeladas a partir de las reservas criogenizadas, se presentaron varios casos de contaminación principalmente con hongos, por lo que no se consiguió realizar los otros ensayos que se tenían planeados, debido a la falta de células. Sin embargo, se logró realizar el ensayo de cicatrización y ensayo de viabilidad celular con MTT.

6.2. VIABILIDAD CELULAR HBMEC POR ENSAYO MTT

Se evaluó la citotoxicidad de la papaína en las células HBMEC, previamente se realizó el conteo celular con azul de tripano confirmando la cantidad de células vivas y muertas para posteriormente realizar el ensayo de MTT, se tomó en consideración las botellas de cultivo con un 80 - 90% de confluencia.

Luego de realizar ocho diluciones seriadas de la enzima papaína se cultivaron las células HBMEC bajo las diferentes concentraciones. En la figura 1 se muestra el gráfico de la concentración de la enzima papaína en relación con la viabilidad de las células HBMEC, a medida que la concentración de papaína aumenta, la viabilidad celular disminuye, obteniendo un IC₅₀ de 18.22 mM.

Figura 1. Viabilidad celular HBMEC



Fuente: Autoría propia.

Nota. Capacidad citotóxica de la enzima papaína en modelo celular HBMEC, con un IC50 de 18.22 mM calculado mediante una regresión no lineal. Para el ensayo colorimétrico se realizó sextuplicata para cada una de las ocho concentraciones estudiadas. La desviación padrón está indicada en las líneas verdes.

Tabla 1. Valores de la viabilidad celular.

Concentraciones (mM)	HBMEC	
	Media (%)	Desvío estándar (mM)
50	38.56	12.15
25	29.54	9.36
12.5	50.96	12.12
6.75	89.60	15.60
3.37	91.50	8.86
1.68	105.20	8.52
0.84	96.13	14.71
0.42	107.11	22.30
C- sin tratamiento	100.00	13.44

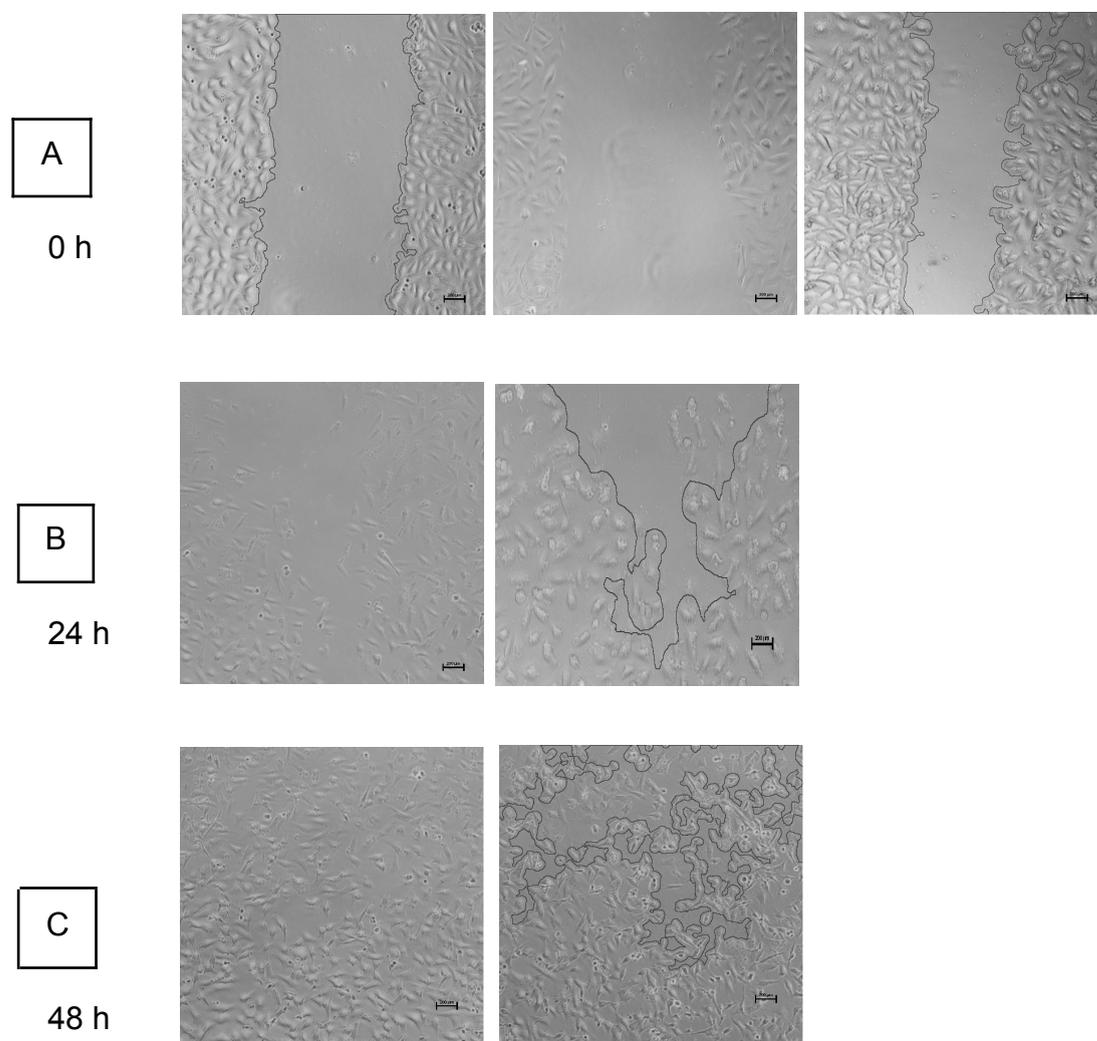
El IC50 de 18.22 mM representa la concentración inhibitoria media o capacidad de la enzima papaína para matar células endoteliales HBMEC. El resultado obtenido de la papaína en las células HBMEC es asociado a lo detallado en la literatura que muestra la enzima proteolítica papaína como un potencial agente antiangiogénico actuando en las células (BEUTH, 2008).

En la tabla 1. se puede observar una desviación estándar baja, además de un análisis de las concentraciones utilizadas donde podemos afirmar la capacidad citotóxica de la papaína, en función de los resultados fue escogida la concentración de 25 mM para dar continuidad a los próximos experimentos, dicha concentración fue elegida ya que se obtuvieron mejores resultados de inhibición y crecimiento celular en el ensayo de MTT donde fueron analizadas 8 concentraciones de la enzima papaína en cultivo celular de HBMEC.

6.3. EVALUACIÓN DEL ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR

Las imágenes del ensayo de cicatriz o herida fueron obtenidas mediante el microscopio invertido Nikon, se realizó dicho ensayo para analizar la inhibición del crecimiento y migración de las células HBMEC cuando utilizado papaína en la concentración de 25 mM.

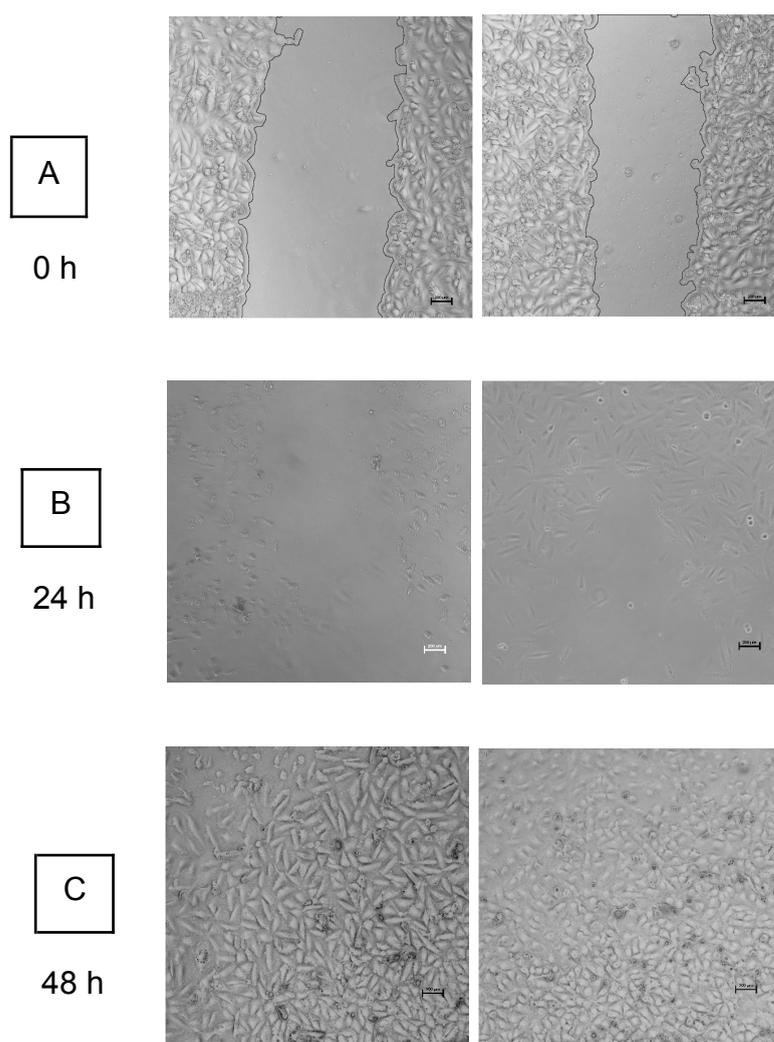
Figura 2. Microscopía óptica de células HBMEC con tratamiento de enzima papaína.



Nota. Imágenes de microscopía invertida representando el área de crecimiento y migración celular de las células HBMEC sometidas a la concentración 25 mM de papaína. A. (0 h) se presentan tres

imágenes de cultivo celular HBMEC sometidas al tratamiento de enzima papaína, medio de cultivo DMEM y almacenadas a 37° C en incubadora de cultivo celular. B. (24h) se presentan los mismos dos cultivos celulares HBMEC superiores después de transcurridas 24 horas con el mismo tratamiento. C. (48 h) se presentan los mismos cultivos celulares HBMEC después de ser sometidos por 48 horas al tratamiento con la enzima papaína y medio DMEM.

Figura 3. Microscopía óptica de células HBMEC sin tratamiento de enzima papaína.



Nota. Imágenes de microscopía invertida representando el área de crecimiento y migración celular de las células HBMEC conteniendo apenas medio de cultivo DMEM. A. (0 h) representa dos imágenes del cultivo de las células endoteliales HBMEC con un corte al medio creando una cicatriz. B. (24 h) representa los mismos cultivos de células anteriores después de 24 horas en la incubadora. C. (48 h) representa las mismas células endoteliales después de transcurridas 48 horas en condiciones de cultivo.

Mediante el software ImageJ fue posible analizar las imágenes obtenidas del ensayo de cicatriz y conocer cambios del área de cultivo. Es posible observar que hubo inhibición del crecimiento en la figura 2 después de 24 h de tratamiento de hasta un 42.24% en comparación con el control.

Se puede observar que las células HBMEC sometidas al tratamiento con papaína después de 48 h adquieren una organización más distanciada entre células, a diferencia del cultivo de control que después de 48 h logra una confluencia mayor de 90%. Pese a que no se pudo realizar una buena lectura de algunas imágenes en el software ImageJ para descubrir cambios en el área de cultivo, es evidenciable observar cambios en la confluencia celular.

7. CONSIDERACIONES FINALES

Se sabe que la angiogénesis está relacionada con el cáncer, los tumores dependen de la angiogénesis para poder desarrollarse. Dentro del ambiente residual la angiogénesis está promovida por factores proangiogénicos y es inhibida por factores antiangiogénicos.

Las células tumorales inducen la angiogénesis mediante un proceso similar al de la angiogénesis normal (SAAVEDRA *et al.*, 2017). Evitar la propagación del tumor se puede llevar a cabo por medio de la inhibición de la neovascularización, ya que el tumor necesita de un aporte sanguíneo que le brinde oxígeno y nutrientes para su crecimiento y migración celular.

Las enzimas proteolíticas están muy relacionadas con el desarrollo metastásico e invasivo de diversos tipos de cáncer, son esenciales para la remodelación del microambiente tumoral. Clases de proteasas miembro de la familia papaína, cisteína y catepsinas son implicadas funcionalmente en el cáncer (ELIE *et al.*, 2010).

En ese sentido se propuso la enzima proteolítica papaína como agente antiangiogénico en el tratamiento contra enfermedades neurovasculares y cáncer, donde existe la formación de una red vascular desorganizada. Se propuso el estudio de la enzima proteolítica papaína en células HBMEC para evaluar su potencial como agente antiangiogénico y combatir la angiogénesis tumoral.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye que la enzima papaína presentó buenos resultados citotóxicos en la inhibición del crecimiento celular con un IC₅₀ de 18.22 mM y reduciendo la capacidad de migración de las células HBMEC en hasta un 42.24% al utilizar la enzima en la concentración de 25 mM, pese a que no se pudieron realizar más ensayos en el laboratorio como de fenotipaje o tinción con fluorescencia para mayor entendimiento de la enzima papaína en las células estudiadas.

Se sugiere que la enzima papaína podría ser utilizada como inhibidor y remodelador de vasos sanguíneos en cultivo celular considerando los resultados de este trabajo, pudiendo ser explorada para experimentos *in vivo* o para otros tipos celulares.

Se recomienda la realización de más investigaciones para mayor esclarecimiento del tema. Es importante tomar cuidados en el desarrollo de los experimentos ya que la contaminación del cultivo celular representa un contratiempo que pospone la investigación y afecta en los resultados.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M; SILVA, S. R. **Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem.** Rev. Bras Enferm. 2007.

AMJAD, MT; CHIDHARLA, A; KASI, A. **Cancer Chemotherapy.** 2023.

BACHAPALLE, P. P. et al. **Evaluation of antiangiogenic activity C. papaya ethanolic extract by sponge implantation method in mouse model.** The Pharma Innovation Journal, v.12 n.5 p.4157-4160, 2023.

BUSSOLATI, B. et al. **Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells.** The FASEB Journal, v.17 n.9 p.1159-1161, 2003.

BEUTH, J. **Proteolytic Enzyme Therapy in Evidence-Based Complementary Oncology: Fact or Fiction?.** Integrative Cancer Therapies, v.7 n.4 p.311-316, 2009.

BRITO, J. S. et al. **Perfil clínico e epidemiológico de mulheres diagnosticadas com câncer de mama no estado da Bahia.** Research, Society and Development, v. 11, n. 9. 2022.

CABRAL, J. F. F. et al. **Potencial da papaína em relação ao seu efeito na cicatrização de feridas crônicas: revisão integrativa.** RETEP - Rev. Tendên. da Enferm. Profis. 2017.

CALCINOTTO, A. et al. **Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury.** Physiol Rev. 2019.

CASTILLO, L. F. G; LÓPEZ, E. A. P. **“Evaluación del efecto cicatrizante de los aceites esenciales de las hojas del *Origanum Vulgare L.* “orégano” sobre heridas en modelos de experimentación in vivo”.** 2018.

CHAMBY ESPEJO, Esmeralda Raissa. **Avaliação do efeito curativo de euphorbia ingens em modelo experimental in vitro.** 2022.

COLIN, E. E. et al. **Mechanisms of Endothelial Regeneration and Vascular Repair and Their Application to Regenerative Medicine.** The American Journal of Pathology, v.191 n.1 p.52-65, 2020.

DA SILVA, C. D. et al. **Antitumor effect of isoquercetin on tissue vasohibin expression and colon cancer vasculature.** Oncotarget, v.13 p.307-318, 2022.

DE ANDRADE JÚNIOR, F. P. et al. **Uso de babosa (aloe vera l.) como pró – cicatrizante em diferentes formas farmacêuticas: uma revisão integrativa.** Revista de Ciências Médicas e Biológicas. v. 19, n. 2, p. 347-352, mai./ago. 2020.

DE SOUZA, V. V. et al. **Quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas.** Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer. Jandaia-GO, v.17, n.34; p.444-461, 2020.

DECICCO SKINNER, K. L. et al. **Endothelial Cell Tube Formation Assay for the In Vitro Study of Angiogenesis.** 2014.

ELDRIDGE, L. **Cancer Cells vs. Normal Cells: How Are They Different?.** Verywell Health. 2023.

ELIE, T. B. et al. **Identification and pre-clinical testing of a reversible cathepsin protease inhibitor reveals anti-tumor efficacy in a pancreatic cancer model.** Biochimie, v.92 p.1618-1624, 2010.

EVANS, W. S et al. **Sitting decreases endothelial microparticles but not circulating angiogenic cells irrespective of lower leg exercises: a randomized cross-over trial.** 2020.

FERREIRA, A. M, et al. **Atividade antibacteriana in vitro de géis com diferentes concentrações de papaína.** Rev. Eletr.Enf;10(4):1035-40. 2008.

FRANCO, N. G. **Histología de la piel**. Revista de la Facultad de Medicina, UNAM. v.46 n.4 p.130-133, 2003.

FRAZAO, L. F. N. et al. **Neoplasia maligna e mastectomia: uma abordagem reflexiva do cuidado com pacientes mastectomizadas**. Research, Society and Development, v. 12, n. 3. 2023.

GOEL, S. et al. **NORMALIZATION OF THE VASCULATURE FOR TREATMENT OF CANCER AND OTHER DISEASES**. Physiol Rev, v.91 p.1071-1121, 2011.

GOETZ, P.; GHEDIRA, K. **Origanum vulgare L. (Lamiaceae): organ commun**. In Phytothérapie anti-infectieuse; Springer: Paris, 2012; pp 327–332.

GUANO GUANO, G. E. **Evaluación de la actividad cicatrizante del extracto de hojas de tomate (Solanum Lycopersicum) en lesión, inducida en ratones (Mus Musculus)**. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2015.

HANAHAN, D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions**. Cancer Discovery, p.31-46, 2022.

HÖLZEN, L. et al. **Tumor cell- and microenvironment-specific roles of cysteine cathepsins in mouse models of human cancers**. 2020.

HUANG, M. et al. **New insights into antiangiogenic therapy resistance in cancer: Mechanisms and therapeutic aspects**. Drug Resistance Updates, v.64 p.1-22, 2022.

JIANG, Y. et al. **The U2AF2 /circRNA ARF1/miR-342–3p/ISL2 feedback loop regulates angiogenesis in glioma stem cells**. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2020.

KATT, M. E. et al. **Human Brain Microvascular Endothelial Cells Derived from the BC1 iPS Cell Line Exhibit a Blood- Brain Barrier Phenotype**. 2016.

KIM, M. et al. **Development of brain metastases in patients with non–small cell lung**

cancer and no brain metastases at initial staging evaluation: cumulative incidence and risk factor analysis. American Journal of Roentgenology, 2021.

KONG, D. H et al. **Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1(VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer.** 2018.

LANDROVE, EE; MOREIRA, DL. **Hipertensión arterial inducida por el tratamiento con antiangiogénicos en el paciente oncológico.**2021.

LEVIN, G. et al. **Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos.** Genética na Escola, v.14 n.1 p.26-33, 2019.

LIMA, S. H. P. de, et al. **O uso da papaína no tratamento de feridas ulceradas e sua toxicidade.** Brazilian Journal of Development. v.8, n.1, p.6501-6507. 2021.

MAKIN, G. **Principles of chemotherapy.** 2018.

MOTTA, S. C. et al. **Human Brain Microvascular Endothelial Cells Exposure to SARS-CoV-2 Leads to Inflammatory Activation through NF- κ B Non-Canonical Pathway and Mitochondrial Remodeling.** Viruses, v.15 n.3 p.1-25, 2023.

MOHR, T.; DESSER, L. **Plant proteolytic enzyme papain abrogates angiogenic activation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in vitro.** BMC Complementary and Alternative Medicine, v13 n.231 p.1-9, 2013.

MOSTAFA MOHAMED, M; SLOANE, B. F. **Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer.** 2006.

MÜLLER, A. et al. **Comparative study of antitumor effects of bromelain and papain in human cholangiocarcinoma cell lines.** International Journal Of Oncology, n.48 p.2026-2034, 2016.

OLSON, O. C; JOYCE, J. A. **Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response.** 2015.

PERSIDSKY, Y. et al. **Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions.** Journal of Neuroimmune Pharmacol, v.1 n.3 p.223-236, 2006.

PORSANI, M. Y. H. et al. **The use of papain gel cream and sunflower oil in promoting healing in a wound in dogs: three case reports.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2016.

POTENTE, M. et al. **Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis.** Cell Press Journal, v.146 p.873-887, 2011.

REGALADO MARTÍNEZ, Johana Esther. **EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES DE *Genipa americana*.** 2021.

SCHLESINGER, M; BENDAS G. **Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)—An increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis.** Int J Cancer. 2014.

SELL, S. M. **AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Cereus repandus* EM LINHAGEM CELULAR DE GLIOBLASTOMA in vitro.** 2021

SILVA, C. de S. et al. **Atualização sobre o uso de papaína em feridas.** Revista Brasileira Interdisciplinar de Saúde. 2(1):55-8. 2020.

SILVA, M. V. M; NOGUEIRA, J. L. **Terapia celular: revisão de literatura.** Revista científica eletrônica de medicina veterinária. 2010.

STONE, L. N. et al. **A Novel Transwell Blood Brain Barrier Model Using Primary Human Cells.** Frontiers in Cellular Neuroscience, Article:230 v.13 p.1-11, 2019.

TAYAL, N. et al. **Anti Angiogenic Activity of *Carica papaya* Leaf Extract.** J Pure Appl Microbiol, v.13 p.567-571, 2019.

TEYSSIER, C. **O poder do mel na cicatrização de feridas.** Instituto Universitário Egas Moniz. 2019.

TORRES, S. S. J. et al. **El rol de VEGF en la angiogénesis fisiológica y tumoral.** Revista Medicina, v.39 n.118 p.190-209, 2017.

TRONCOSO, F. M. et al. **VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease.** BBA - Molecular Basis of Disease, v.1867 166170 ,2021.

WANG, C. et al. **Emerging nanotechnological approaches to regulating tumor vasculature for cancer therapy.** Journal of Controlled Release: official journal of the Controlled Release Society, v.362 p.647-666, 2023.

WOLF, K. et al. **Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion.** Nature Cell Biology, v.9 n.8 p.893-904 supplementary information 1-9, 2007.