

**Instituto Tecnológico de Costa Rica
Escuela de Biología
Ingeniería en Biotecnología**

**Informe final del proyecto de graduación presentado como requisito
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

**Evaluación de la actividad citotóxica de dos péptidos catiónicos,
sintetizados a partir de toxinas ofídicas de *Bothrops asper* y
Agkistrodon piscivorus piscivorus, sobre células eucarióticas
normales y cancerosas**

**Instituto Clodomiro Picado
Facultad de Microbiología
Universidad de Costa Rica
Coronado, San José**

Cindy Araya Castillo

Cartago, 2004

Evaluación de la actividad citotóxica de dos péptidos catiónicos, sintetizados a partir de toxinas ofídicas de *Bothrops asper* y *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, sobre células eucarióticas normales y cancerosas

Cindy Araya Castillo¹

RESUMEN

Los péptidos Appk (KKYKAYFKLKCKK) y pEM-2 (KKWRWWLKALAKK) derivados de la región C-terminal de las FLA₂s Lys49 miotóxicas presentes en el veneno de las serpientes *Bothrops asper* y *Agkistrodon piscivorus piscivorus* respectivamente, forman parte de un grupo denominado péptidos catiónicos antimicrobianos, los cuales se caracterizan por combinar aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos/aromáticos en su estructura. Este estudio evaluó la actividad citotóxica de ambos péptidos sobre seis líneas celulares murinas, cuatro de las cuales (EMT6, B16, S180 y P3X) son tumorales y las dos restantes, C2C12 y t-End, son líneas celulares normales. Además, se evaluó el potencial anti-tumoral del péptido pEM-2 *in vivo*, en modelos murinos. Los resultados demostraron que ambos péptidos son citotóxicos, con diferencias según la línea celular evaluada. La línea más susceptible al pEM-2 fue el mieloma P3X, mientras que para Appk fueron las líneas de carcinoma mamario (EMT6) y nuevamente P3X. El péptido Appk resultó ser más citotóxico para las líneas EMT6, S-180 y C2C12 en comparación con el pEM-2. Sin embargo, dada su toxicidad *in vivo* se excluyó de las pruebas de tratamiento en los modelos tumorales murinos, siendo pEM-2 el péptido a evaluar en dichos modelos. En el modelo de carcinoma mamario EMT6, la administración de pEM-2 causó una reducción de las masas tumorales del 28%, sin embargo, esta reducción no alcanzó significancia estadística ($p > 0.05$). Es posible que al aumentar la frecuencia de las dosis la reducción de las masas tumorales sea significativa. El mecanismo mediante el cual estos péptidos actúan sobre las membranas celulares es incierto, aunque se conoce el importante papel de la hidrofobicidad y de la carga neta, además de la importancia del contenido aniónico en las membranas celulares para que estos péptidos ejerzan su actividad.

Palabras claves: Fosfolipasa A₂, péptidos catiónicos, modelo tumoral murino, citotoxicidad, células tumorales, actividad anti-tumoral.

¹ Informe de Proyecto de Graduación, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2004.

Evaluation of the cytotoxic activity of two cationic peptides, synthesized from ophidic toxins of *Bothrops asper* and *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, upon eukaryotic normal and tumor cells

Cindy Araya Castillo²

ABSTRACT

Peptides Appk (KKYKAYFKLKCKK) and pEM-2 (KKWRWWLKALAKK), derived from the C-terminal region of myotoxic Lys49 phospholipases A₂ (PLA₂) present in the venom of the snakes *Bothrops asper* and *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, respectively, are part of a group named antimicrobial cationic peptides, which are characterized by the combination of cationic and hydrophobic/aromatic amino acids in their structure. This study evaluated the cytotoxic activity of two peptides upon six murine cell lines, four of which (EMT6, B16, S180 y P3X) are neoplastic, and the rest, C2C12 and t-End, are normal cell lines. In addition, the *in vivo* anti-tumoral effect of pEM-2 was evaluated in murine models. Results showed that both peptides are cytotoxic, with differences according to the cell line evaluated. The most susceptible cell line to pEM-2 was P3X, while mammary carcinoma (EMT6) and P3X were most susceptible to Appk. Peptide Appk was more cytotoxic for the lines EMT6, S-180 and C2C12 in comparison to pEM-2. However, due to its *in vivo* toxicity, this peptide was excluded from the treatment test in the murine tumoral model, being pEM-2 the peptide evaluated in these models. In the EMT6 mammary carcinoma model, the administration of pEM-2 reduces the tumoral mass by 28%. Moreover, this reduction did not reach statistical significance ($p > 0.05$). It is possible that by increasing the frequency of the doses a significant reduction of tumoral mass would be shown. The mechanism by which these peptides act upon the cell membranes is unclear, although the important roles of hydrophobicity and the net charge are known. In addition, the importance of the anionic content in the cell membranes for the action of these peptides is also known.

Keywords: Phospholipase A₂, cationic peptides, murine tumoral model, cytotoxicity, tumor cells, anti-tumoral activity.

²Graduation Project Report, Biology School, Technological Institute of Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2004.

Evaluación de la actividad citotóxica de dos péptidos catiónicos, sintetizados a partir de toxinas ofídicas de *Bothrops asper* y *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, sobre células eucarióticas normales y cancerosas

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**Dra. Virginia Montero Campos
Profesora Guía
Instituto Tecnológico de Costa Rica**

**PhD. Bruno Lomonte Vigliotti
Representante
Instituto Clodomiro Picado**

**MSc. Jonhy Peraza
Lector
Instituto Tecnológico de Costa Rica**

DEDICATORIA

A mis padres, por su infinito amor, sacrificio y apoyo durante mis estudios.

A Luis Fernando, por regalarme su corazón y amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Bruno Lomonte, por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de graduación en el instituto, además por su apoyo, ayuda y amistad durante mi estancia en el mismo.

A la doctora Marieta Flores, por su ayuda y consejo en el diseño de los modelos tumorales murinos.

A todos mis profesores, en especial a la doctora Virginia Montero.

A Javier Núñez por su amistad y apoyo técnico durante el desarrollo del proyecto en el laboratorio.

A mis compañeros del Instituto, por brindarme su mano amiga durante mi estancia en el mismo.

INDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ACREDITACIÓN	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
INDICE GENERAL	VI
INDICE DE CUADROS	VIII
INDICE DE FIGURAS	IX
INDICE DE ANEXOS	X
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
El envenenamiento ofídico	4
Serpientes venosas y sus venenos	5
<i>Familia Viperidae</i>	7
<i>Bothrops asper</i> y <i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	8
Fosfolipasas A ₂ miotóxicas de vipéridos	9
<i>Clasificación</i>	9
<i>Miotoxicidad</i>	11
<i>FLA₂s Lys49 miotóxicas</i>	13
Péptidos sintéticos	14
<i>pEM-2</i>	15
<i>Appk</i>	16
Péptidos catiónicos antimicrobianos	16
<i>Clasificación</i>	18
<i>Estructura</i>	18
<i>Mecanismo de acción</i>	19
<i>Aplicaciones</i>	20
<i>Actividad anti-tumoral</i>	22
<i>Algunos ejemplos</i>	24
Ensayos de citotoxicidad (Wilson 1992)	26
<i>Liberación de la enzima lactato deshidrogenasa</i>	27

OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
Líneas celulares.....	30
Péptidos catiónicos	30
Establecimiento de los cultivos celulares (Lomonte et al. 1999a).....	30
Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> (Lomonte et al. 1999a).....	31
<i>Liberación de LDH (Lactato deshidrogenasa)</i>	32
Observación al microscopio.....	32
Evaluación de la acción anti-tumoral de pEM-2 <i>in vivo</i>	33
Análisis estadístico	34
RESULTADOS.....	35
Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> de Appk y pEM-2	35
Acción anti-tumoral de pEM-2 <i>in vivo</i>	36
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	49
RECOMENDACIONES	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51
ANEXOS	57

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Fosfolipasas A_2 Lys49 mitóticas aisladas del veneno de serpientes	12
Cuadro 2. Algunos péptidos antimicrobianos provenientes de plantas y animales	17

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Bothrops asper</i>	8
Figura 2. <i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	9
Figura 3. Clasificación de las fosfolipasas A ₁ , A ₂ , C y D de acuerdo con el sitio de hidrólisis de 3-sn-fosfoglicéridos.....	10
Figura 4. Representación de los grupos de aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos dentro de distintos dominios en varios péptidos antimicrobianos de diferentes clases estructurales.....	19
Figura 5. El modelo de Shai-Matsuzaki-Huang.....	20
Figura 6. Evaluación de la citotoxicidad de dos péptidos sintéticos derivados de fosfolipasas A ₂ Lys49 miotóxicas.....	38
Figura 7. Comparación de la citotoxicidad ejercida por pEM-2 y Appk sobre seis líneas celulares distintas.....	39
Figura 8. Actividad citotóxica ejercida por los péptidos sintéticos, Appk y pEM-2, sobre distintas líneas celulares murinas normales y tumores.....	40
Figura 9. Alteraciones morfológicas causadas por el péptido sintético pEM-2 sobre las líneas celulares P3X, S-180 y t-End.....	41
Figura 10. Alteraciones morfológicas causadas por el péptido sintético Appk sobre las líneas celulares P3X, EMT6 y C2C12	42
Figura 11. Acción antitumoral de pEM-2 sobre el crecimiento de tumores sólidos de carcinoma mamario EMT6.....	43

INDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Información general de las líneas celulares utilizadas en este estudio.	57
Anexo 2. Presentación comercial de los péptidos Appk y pEM-2	58
Anexo 3. Hoja de información general correspondiente al péptido pEM-2 ..	59
Anexo 4. Espectrometría de masas realizada para el péptido pEM-2.	60
Anexo 5. Hoja de información general correspondiente al péptido Appk.....	61
Anexo 6. Espectrometría de masas realizada para el péptido Appk.....	62
Anexo 7. Manual de uso correspondiente al kit utilizado para medir la actividad de la enzima LDH (I parte).....	63
Anexo 8. Manual de uso correspondiente al kit utilizado para medir la actividad de la enzima LDH (II parte).....	64
Anexo 9. Cepas de ratones utilizados en los modelos tumorales in vivo.....	65
Anexo 10. Diagrama de un hemocitómetro de Neubauer.....	66
Anexo 11. Características generales del paclitaxel.....	67

INTRODUCCIÓN

Caracterizadas por su alargado y cilíndrico cuerpo, carencia de extremidades y con un esqueleto óseo muy flexible, las serpientes son consideradas como los reptiles de mayor éxito adaptativo. Además, constituyen una herpetofauna abundante a nivel mundial, representada con alrededor de 2400 especies. En Centroamérica se pueden encontrar únicamente 31 especies venenosas, de las cuales, Costa Rica posee 18.

Actualmente, con un estimado total de 2.682.500 envenenamientos y 125 345 muertes anuales, el envenenamiento por mordedura de serpiente es considerado un importante problema de salud pública a nivel mundial. Es por esto, que el problema del ofidismo ha sido la razón por la cual el estudio de la biología de las serpientes, composición de los venenos, sus efectos y la producción de antisueros, son campos activos de una ardua investigación científica.

El veneno producido por las serpientes es una secreción compleja compuesta por toxinas y enzimas inyectadas a las víctimas por un sistema de inoculación formado por los colmillos. Dentro de estas toxinas se encuentran las fosfolipasas A₂ (FLA₂), las cuales constituyen una familia de proteínas con un diverso espectro de efectos farmacológicos que incluyen: neurotoxicidad, miotoxicidad, citotoxicidad, acción anticoagulante, y efectos inflamotogénicos. De éstas, la miotoxicidad se caracteriza por el daño de las fibras musculares (mionecrosis), cuyos efectos pueden producir desde la pérdida de tejido hasta la amputación de extremidades.

El grupo II de las FLA₂s miotóxicas de vipéridos ha sido dividido en dos categorías generales: las variantes Asp49 y Lys49. La variante Lys49 carece o muestra una actividad catalítica extremadamente baja, pero despliega una

toxicidad comparable a la variante con actividad catalítica (Asp49), por lo que se considera que la perturbación causada en las membranas celulares por estas FLA₂s no está relacionada con un mecanismo enzimático intrínseco.

A partir del aislamiento de FLA₂s Lys49 miotóxicas se propone que la región activa puede estar probablemente formada por una combinación de aminoácidos básicos e hidrofóbicos cerca del extremo carboxilo terminal de la proteína (comprende los residuos de aminoácidos 115-129), el cual permite una interacción electroestática y penetración de la bicapa celular.

Basados en la anterior conclusión, se realizó la síntesis de un péptido de 13 aminoácidos correspondiente a la región C-terminal, el cual causó citólisis de células endoteliales *in vitro* a pesar de que no indujo miotoxicidad local en ratones. Además, reprodujo el efecto bactericida mostrado por la proteína intacta (FLA₂ del tipo Lys49).

Esta clase de péptidos se ha agrupado dentro de una categoría conocida como **péptidos catiónicos**, al estar formados por aminoácidos hidrofóbicos y catiónicos (básicos), los cuales les confieren la propiedad de adoptar formas en las que estos grupos de aminoácidos son espacialmente organizados, de manera que la molécula adquiere un diseño anfipático. Estos péptidos se caracterizan por su poder como antimicrobianos, los cuales están ampliamente distribuidos en animales y plantas.

Además de las propiedades como antimicrobianos conferidas a estos péptidos catiónicos, se ha estudiado la actividad anti-tumoral mostrada por péptidos como magainina 2 de *Xenopus laevis*, cecropina B-1, B-2 y B-3 de mariposas de seda, aureina de las ranas *Litoria aurea* y *Litoria raniformis*.

El cáncer es una enfermedad que afecta a millones de personas en el mundo por lo que la investigación en este campo es constante. Esta enfermedad se caracteriza por la proliferación de células que desafían los controles normales (es decir, son neoplásicas), las cuales son capaces de invadir y colonizar los tejidos que las rodean (son malignas). Originan tumores secundarios o metástasis, resultando muy difícil su erradicación quirúrgica.

El desarrollo de drogas anticáncer que minimicen los diversos efectos que presentan la mayoría de las drogas como: la alta toxicidad, inactivación por fenotipos de resistencia a multidroga, respuesta incompleta, así como la escasa selectividad que presentan la mayoría de las drogas al atacar las células normales, es un campo de investigación activo.

Es así como los péptidos antimicrobianos están siendo estudiados como agentes quimioterapéuticos anti-tumorales que ofrezcan un mayor beneficio en cuanto a toxicidad, resistencia y selectividad de las células tumorales en el tratamiento de dicha enfermedad.

En este estudio se evaluará la actividad citotóxica de dos péptidos catiónicos provenientes de la región C-terminal de FLA₂s Lys49 mitotóxicas mediante el uso de líneas celulares tumorales y normales. Además, el desarrollo de modelos murinos tumorales será la base para evaluar la posible acción antitumoral que estos péptidos puedan ejercer contra las líneas celulares a probar en dichos modelos.

ANTECEDENTES

El envenenamiento ofídico

El envenenamiento por mordedura de serpiente es considerado un importante problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en Asia, África y América Latina (Arroyo *et al.* 1999). Se ha estimado que en el mundo ocurren unos dos millones de envenenamientos al año por mordeduras de serpiente, con un total estimado de aproximadamente 100.000 muertes anuales (Chippaux 1998).

Costa Rica cuenta con una abundante herpetofauna en una amplia distribución geográfica por lo que incluye un número considerable de serpientes venenosas, las cuales son causantes de una gran cantidad de accidentes en todas las zonas rurales de nuestro país (Chaves *et al.* 1996).

En un estudio realizado por Arroyo *et al.* (1999), se observó un incremento ligero para 1996, en el número total de envenenamientos con respecto a 1979 (477 en 1979 y 547 en 1996). En 1996, la incidencia de mordeduras por serpientes fue de 15.6 por 100 000 habitantes y las tasas de mortalidad y letalidad fueron de 0.75% por 100 000 habitantes y 0.18% respectivamente. Los grupos etarios más afectados correspondieron a personas menores de 30 años. El 78% de los mordidos fueron hombres y el 22% mujeres. Casi siempre los accidentes de este tipo suceden en el área de trabajo agrícola o en caminos y riberas de ríos próximos a las áreas de cultivo (Rojas *et al.* 2001).

El problema del ofidismo ha sido la razón por la cual algunos científicos se han interesado en estudiar a fondo aspectos relacionados como la biología de las serpientes, la composición de los venenos, sus efectos en animales de

experimentación y la preparación de antisueros. Es así como en 1966 nace el Programa Nacional de Sueros Antiofídicos, y para 1967 se logra dar un gran paso al introducir en nuestro país el primer lote de suero antiofídico polivalente (Chaves *et al.* 1996).

En abril de 1970, se crea el Instituto Clodomiro Picado T., en Dulce Nombre de Coronado, cuyo nombre hace honor al destacado científico costarricense, Dr Clodomiro Picado T., quién llevó a cabo una vasta labor en varios campos de las ciencias biológicas y biomédicas, en beneficio de la población de Costa Rica (Chaves *et al.* 1996).

Actualmente el Instituto Clodomiro Picado cuenta con un departamento de investigación, cuya labor se concentra en el mejoramiento y desarrollo de agentes terapéuticos para tratar estos envenenamientos, así como en el desarrollo biotecnológico de Costa Rica.

Serpientes venosas y sus venenos

Las serpientes son los reptiles de mayor éxito adaptativo puesto que están presentes en todos los continentes y todas las zonas de vida, con excepción de las zonas polares. Se conocen alrededor de 2400 especies y su ubicación taxonómica es la siguiente (Chaves *et al.* 2001):

Clase: Reptilia
Subclase: Lepidosauria
Orden: Squamata (escamosos)
Suborden: ophidia (serpentes)

Centroamérica posee una rica fauna de reptiles, que incluye más de 150 especies de serpientes, de las cuales, únicamente 31 especies se

consideran venenosas (Rojas *et al.* 2001). De estas 31 especies, Costa Rica posee 18 (Chaves *et al.* 1996).

Las serpientes venenosas son identificadas dentro de cinco familias: Elapidae, Hydrophiidae, Viperidae, Crotalidae, y Colubridae, (Harris, 1990). De éstas, Viperidae, Crotalidae, y Elapidae son las de mayor importancia médica (Warrel & Fenner, 1993).

Los componentes del veneno mejor caracterizados corresponden a proteínas (con o sin actividad enzimática) y péptidos, desplegando una amplia variedad de acciones farmacológicas y tóxicas (Lomonte 1994).

Hider *et al.* (1991) describen que el veneno de serpientes es en general una fuente rica de enzimas solubles en agua, entre ellas hidrolasas, proteinasas, exo y endopeptidasas, fosfodiesterasas y fosfolipasas. Todos estos componentes del veneno de serpientes han sido estudiados en los últimos 30 años durante los cuales se han detectado desde 26 a 39 diferentes actividades enzimáticas (Mebs 1998).

El veneno es el producto de una glándula oral, adyacente al tracto digestivo. Estas glándulas exocrinas están funcionalmente relacionadas con el páncreas al secretar enzimas similares, tanto proteasas como fosfolipasas. Sin embargo, se han encontrado potentes inhibidores para estas proteasas y fosfolipasas del veneno en la sangre de serpientes venenosas así como en las no venenosas, lo cual sugiere que durante la evolución las glándulas del veneno primero produjeron enzimas que fueron secretadas por el páncreas, por lo que los inhibidores se hicieron presentes en la sangre. En una co-evolución las enzimas de origen pancreático fueron subsecuentemente producidas también por las glándulas de veneno de las serpientes (Mebs 1998).

Familia Viperidae

Los venenos de las serpientes que pertenecen a la familia Viperidae tienen una composición química muy compleja, con presencia de diversas toxinas y enzimas que afectan múltiples procesos fisiológicos (Rojas *et al.* 2001).

La familia Viperidae es la familia más extensa de serpientes venenosas. Se encuentra representada a través de Europa, África, Asia y las Américas. Tienden a ser más pesadas y voluminosas que las elápidas, y muchas son marcadamente lentas (Harris 1991).

Las serpientes de esta familia son conocidas como “tobobas venenosas”, y se han clasificado en los géneros *Crotalus*, *Lachesis*, *Agkistrodon* y *Bothrops* (Chaves *et al.* 1996).

Los envenenamientos provocados por estas serpientes se caracterizan por sus efectos locales y manifestaciones sistémicas. Los primeros se caracterizan por la aparición de edema, el cual constituye el efecto más común en envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae, hemorragia como consecuencia de la acción de toxinas del veneno, conocidas como "hemorraginas", sobre los vasos sanguíneos, las cuales son metaloproteasas dependientes de zinc. Por último, mionecrosis causada por miotoxinas o por isquemia (Lomonte 1994, Lomonte *et al.* 1993, Rojas *et al.* 1996).

Los efectos sistémicos aparecen al cabo de 2-3 horas después de la mordedura y se manifiestan mediante cuadros hemorrágicos sistémicos, coagulopatías, choque cardiovascular e insuficiencia renal (Rojas *et al.* 1996).

Bothrops asper* y *Agkistrodon piscivorus piscivorus

El presente estudio involucra dos especies de esta familia, *Bothrops asper* y *Agkistrodon piscivorus piscivorus*.

En Costa Rica la mayor cantidad de accidentes ofídicos son causados por *Bothrops asper* (Fig. 1). Comúnmente se le denomina terciopelo o barba amarilla. Es muy abundante en todos los países de la región centroamericana, excepto en El Salvador. Se distribuyen en regiones tropicales húmedas, tanto en bosque primario como en regiones alteradas de uso agrícola o ganadero (Rojas *et al.* 2001).



Figura 1. *Bothrops asper* (Terciopelo, barba amarilla). Ovovivípara. Tamaño máximo 2.3 m. Se puede encontrar en la Vertiente Atlántica y el Pacífico hasta los 1500 m (Rojas *et al.* 2001).

Por otro lado, *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (Fig. 2), conocida como mocasín o boca de algodón se puede encontrar en la región oeste de Florida y fuera de Florida se ubica desde la parte norte y este de Alabama hasta la región central de Georgia y Virginia. El hábitat común de esta serpiente comprende riachuelos, ríos, lagos, estanques, ciénagas, pantanos, canales, y al borde de zanjas, sin embargo, ocasionalmente se pueden encontrar lejos del agua (<http://www.flmnh.ufl.edu/natsci/herpetology/flguide/Agkistrodonppiscivorus.htm>).



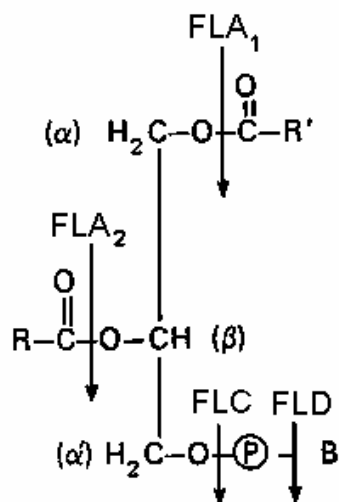
Figura 2. *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (mocasín, mocasín de agua, boca de algodón). Esta especie se distingue con facilidad por unas escamas blancas que bordean su boca. Tamaño máximo 1.89 m. Es común encontrarla en el agua (ríos, lagos, etc).

Fosfolipasas A₂ miotóxicas de vipéridos

Las miotoxinas son particularmente abundantes y difundidas en los venenos de serpientes, y hasta pueden ser encontradas en el veneno de otros organismos. Generalmente se definen como componentes naturales (usualmente pequeñas proteínas y péptidos) del veneno, que puede actuar localmente, dañando las fibras musculares (mionecrosis) en el sitio de inyección y alrededores, mientras que otras actúan sistemáticamente, causando daño muscular en sitios distantes. La mionecrosis es considerada una importante complicación médica, ya que puede causar desde la pérdida de tejido hasta amputación (Lomonte *et al.* 2003).

Clasificación

Las fosfolipasas hidrolizan los 3-sn-fosfoglicéridos y son clasificadas de acuerdo con el sitio preciso de hidrólisis, como fosfolipasa A₁, A₂, C ó D (Fig. 1) (Harris 1991).



R', R: Residuos de ácido graso

P: Fosfato

B: Colina, etanolamina, inositol o serina

Figura 3. Clasificación de las fosfolipasas A₁, A₂, C y D de acuerdo con el sitio de hidrólisis de 3-sn-fosfoglicéridos.

La fosfolipasa A₂ (FLA₂; EC 3.1.1.4), una enzima en particular que está presente en casi todas las serpientes venenosas (Elapidae, Crotalidae y Viperidae) (Mebs 1998a, Lomonte 1994), ha adquirido una considerable heterogeneidad de actividades tóxicas durante la evolución que incluyen: neurotoxicidad, miotoxicidad, citotoxicidad, actividad anticoagulante, y efectos inflamatorios (Lomonte *et al.* 1999a).

Las FLA₂s de venenos se pueden clasificar en tres grupos, basándose en su estructura primaria: el grupo I incluye las fosfolipasas A₂ pancreáticas de mamíferos y del veneno de serpientes de la familia Elapidae, el grupo II está formado por aquellas FLA₂s de mamíferos no-pancreáticas, así como las derivadas del veneno de serpientes de la familia Viperidae y por último las FLA₂s derivadas del veneno de abejas y algunos lagartos pertenecen al grupo III (Lomonte *et al.* 1999a, Páramo *et al.* 1998).

Según Mebs (1998a) las fosfolipasas A₂ miotóxicas pueden ser divididas en dos grupos:

1. Las FLA₂s neurotóxicas, las cuales pueden ser de cadena simple o proteínas complejas constituidas por FLA₂s como subunidades. Éstas son altamente tóxicas con una LD₅₀ en un rango de 0.002 a 0.2 mg/kg (inyección intravenosa en ratones).

2. FLA₂s no neurotóxicas, menos tóxicas, con una LD₅₀>1mg/kg, pero que exhiben actividad miotóxica considerable. Dentro de éste grupo se pueden distinguir dos subgrupos:

I. FLA₂s enzimáticamente activas.

II. FLA₂s enzimáticamente inactivas (Cuadro 1).

La anterior subdivisión del grupo de FLA₂s no neurotóxicas de vipéridos se debe a la presencia de las variantes Asp49 y Lys49 (Lomonte *et al.* 1999b). Esta última carece o muestra una actividad catalítica extremadamente baja, pero despliega una toxicidad comparable a la variante con actividad catalítica (Asp49), por lo tanto se llega a la conclusión de que la perturbación causada en las membranas celulares por estas FLA₂s no está relacionada con un mecanismo enzimático intrínseco. Esta carencia de actividad catalítica por parte de la FLA₂ Lys49 miotóxica es atribuida a varias sustituciones de aminoácidos, entre ellas, la del aminoácido aspartato por lisina en la posición 49 (Páramo *et al.* 1998).

Miotoxicidad

Dentro de los efectos tóxicos que producen las FLA₂s, la miotoxicidad se refiere a la capacidad de causar daño en el músculo esquelético degenerándolo, lo cual implica una alteración de la arquitectura normal de las

fibras del músculo esquelético. Este efecto se podría explicar debido a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, lo cual podría conllevar a un incremento en la inespecificidad de la permeabilidad de ésta y con ello el colapso de todos los gradientes iónicos existentes. Sin embargo, aún no se ha identificado el receptor específico ni el mecanismo por el cual su rápido efecto es ejercido (Harris 1991, Lomonte *et al.* 1999a).

Cuadro 1. Fosfolipasas A₂ Lys49 miotóxicas aisladas del veneno de serpientes (Lomonte *et al.* 2003).

Especies de serpientes	Nombre común de la proteína	Código de entrada	Referencias
<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	AppK49	P04361	Maraganore <i>et al.</i> (1984) and Maraganore and Heinrichson (1986)
<i>Agkistrodon bilineatus</i>	PLA ₂ -II	- ^b	Nikai <i>et al.</i> (1994)
<i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	ACL myotoxin	P49121	Johnson and Ownby (1993) and Selistre de Araujo <i>et al.</i> (1996a)
<i>Atropoides (Bothrops) nummifer</i>	Myotoxin I	- ^b	Gutiérrez <i>et al.</i> (1986a)
<i>Atropoides (Bothrops) nummifer</i>	Myotoxin I _h	- ^b	Rojas <i>et al.</i> (2001)
<i>Atropoides (Bothrops) nummifer</i>	Myotoxin II	P82950	Angulo <i>et al.</i> (2000, 2002)
<i>Bothrops asper</i>	Myotoxin II	P24605	Lomonte and Gutiérrez (1989) and Francis <i>et al.</i> (1991)
<i>Bothrops asper</i>	Myotoxin IV	- ^b	Díaz <i>et al.</i> (1995)
<i>Bothrops asper</i>	Myotoxin IV _a	- ^c	Lizano <i>et al.</i> (2001)
<i>Bothrops atrox</i>	Ba-K49	- ^b	Maraganore <i>et al.</i> (1984)
<i>Bothrops atrox</i>	BaPLA ₂ -I	- ^b	Kanashiro <i>et al.</i> (2002)
<i>Bothrops jararacussu</i>	Bothropstoxin I	Q90249	Homsí-Brandeburgo <i>et al.</i> (1988) and Cintra <i>et al.</i> (1993)
<i>Bothrops moojeni</i>	Myotoxin I	P82114	Lomonte <i>et al.</i> (1990b) and Soares <i>et al.</i> (2000a)
<i>Bothrops moojeni</i>	Myotoxin II	Q91834	Lomonte <i>et al.</i> (1990b) and Soares <i>et al.</i> (1998)
<i>Bothrops neuwiedi</i>	Myotoxin I	- ^b	Geoghegan <i>et al.</i> (1999)
<i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i>	BnSP-7	Q9IAT9	Rodrigues <i>et al.</i> (1998) and Soares <i>et al.</i> (2000b)
<i>Bothrops pirajai</i>	Pimtoxin I	P58399	Toyama <i>et al.</i> (1995, 1998)
<i>Bothrops pirajai</i>	Pimtoxin II	P82287	Toyama <i>et al.</i> (1995, 2000)
<i>Bothrops pradoi</i>	PRA-1	- ^b	Moura-da-Silva <i>et al.</i> (1991a)
<i>Bothriechis (Bothrops) schlegelii</i>	Myotoxin I	P80963	Angulo <i>et al.</i> (1997) and Tsai <i>et al.</i> (2001)
<i>Calloselasma rhodostoma</i>	CRV-K49	Q9PVF3	Tsai <i>et al.</i> (2000)
<i>Cerrophidion (Bothrops) godmani</i>	Myotoxin II	P81165	Díaz <i>et al.</i> (1992) and de Sousa <i>et al.</i> (1998)
<i>Cerrophidion (Bothrops) godmani</i>	PgoK49	Q8UVU7	Tsai <i>et al.</i> (2001)
<i>Crotalus atrox</i>	Cax-K49	Q8UVZ7	Tsai <i>et al.</i> (2001)
<i>Crotalus molossus molossus</i>	Cmm-K49	- ^b	Tsai <i>et al.</i> (2001)
<i>Deinagkistrodon (Agkistrodon) acutus</i>	Dac-K49	O57385	Wang <i>et al.</i> (1996) and Fan <i>et al.</i> (1999)
<i>Deinagkistrodon (Agkistrodon) acutus</i>	Dac-K49b	- ^c	Tsai <i>et al.</i> (2001)
<i>Trimeresurus albolabris</i>	Tal-K49	- ^b	Tsai <i>et al.</i> (2001)
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	BP-I	P20381	Yoshizumi <i>et al.</i> (1990)
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	BP-II	E48188	Liu <i>et al.</i> (1990)
<i>Trimeresurus gramineus</i>	PLA ₂ -V	P70090	Nakai <i>et al.</i> (1995)
<i>Trimeresurus gramineus</i>	PLA ₂ -VII	P70089	Nakashima <i>et al.</i> (1995)
<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	TMV-K49	P22640	Wang <i>et al.</i> (1996) and Liu <i>et al.</i> (1991)
<i>Trimeresurus okinavensis</i>	To3	Q92152	Nobuhisa <i>et al.</i> (1996)
<i>Trimeresurus puniceus</i>	Tpu-K49	- ^b	Tsai <i>et al.</i> (2001)

^aCódigo de identificación en la base de datos SwissProt. ^bSecuencia de aminoácidos parcial o no disponible. ^cSecuencia no determinada.

FLA₂s Lys49 miotóxicas

La primera FLA₂ Lys49 descubierta, en 1984, fue la proveniente del veneno de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, al contener la sustitución del aminoácido Asp49 por Lys49, considerándose un homólogo de FLA₂, enzimáticamente inactiva (Maraganore *et al.* 1984, Lomonte 1994, Núñez *et al.* 2001).

En el año de 1989, se aisló del veneno de la terciopelo *Bothrops asper* (familia Viperidae) de Costa Rica una FLA₂ miotóxica, la cual, inoculada en músculo de ratón produce necrosis de la célula muscular por lesiones degenerativas (Lomonte y Gutiérrez, 1989).

A partir del aislamiento de esta miotoxina, Gutiérrez y Lomonte (1995) proponen que la región activa puede estar probablemente formada por una combinación de aminoácidos básicos e hidrofóbicos cerca del extremo carboxilo terminal de la proteína, el cual permite una interacción electrostática y penetración de la bicapa celular.

Lo anterior se deduce al existir inhibición del efecto citotóxico de la miotoxina II de *Bothrops asper* en cultivos celulares por heparina, por lo que Lomonte *et al.* (1994a) concluyen que la región C-terminal de la molécula está involucrada con el sitio citolítico. Al unirse fuertemente la heparina a la región 115-129 (sector rico en lisina), se da una pérdida de su actividad, ya que las FLA₂s miotóxicas requieren de una superficie cargada negativamente para que haya una interacción con la membrana. Es por eso que el carácter catiónico se considera esencial para el despliegue de su actividad citotóxica, independientemente de su actividad enzimática (Mebs 1998b, Lomonte *et al.* 1994a).

Péptidos sintéticos

Lomonte *et al.* (1994a) identifican la región 115-129 de la FLA₂ miotóxica Lys49 de *B. asper* como la responsable, al menos en parte, de la perturbación en la membrana celular, debido a la presencia de una combinación de aminoácidos básicos e hidrofóbicos comprendidos en la región mencionada.

A partir de este descubrimiento se sintetiza un péptido de 13 aminoácidos (KKYRYYLKPLCKK) que corresponden a esa zona en particular, el cual causó citólisis en células de endotelio *in vitro*, a pesar de que no provocó miotoxicidad local en ratones (Lomonte *et al.* 1999b, 1994b, Páramo *et al.*, 1998).

Es así como se inicia una serie de estudios mediante el uso de péptidos sintéticos, con el fin de comprender más a fondo las propiedades de las FLA₂s miotóxicas (Lomonte *et al.* 1999a).

Páramo *et al.* (1998) demuestran que el péptido correspondiente a la región C-terminal 115-129 muestra actividad bactericida contra bacterias gram-negativas y gram-positivas, al igual que la miotoxina entera. Esta actividad bactericida refuerza la noción de que las FLA₂s Lys-49 del grupo II despliegan el efecto de perturbación de las membranas en una amplia variedad de estructuras biológicas, independientemente de una acción enzimática intrínseca, además de destacar el papel que juega la región C-terminal en estos efectos.

En otro estudio, se realizó una sustitución del aminoácido tirosina por triptófano en el péptido correspondiente a la región 115-129 (KKWRWWLKPLCKK) al cual se le denominó p115-W3. Los resultados demostraron que esta substitución incrementó drásticamente la actividad de

daño de la membrana y su poder bactericida en comparación con el péptido 115-129, además de reproducir el efecto miotóxico de la FLA₂ completa. Este descubrimiento apoya a la teoría de que la región 115-129 es una región determinante en la actividad ejercida por la miotoxina II (Lomonte *et al.* 1999b).

La actividad ejercida por estos péptidos probablemente se debe a la presencia de aminoácidos hidrofóbicos y con carga positiva (catiónicos), característica que distingue a una clase de agentes antimicrobianos distribuidos ampliamente en la naturaleza, denominados péptidos catiónicos (Lomonte *et al.* 1999b, Páramo *et al.* 1998).

Los péptidos sintéticos se consideran importantes componentes para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos principalmente por dos razones: su pequeño tamaño y por su comparable potencia bactericida con los péptidos antimicrobianos naturales (Páramo *et al.* 1998).

En el presente estudio se utilizarán dos péptidos sintéticos, pEM-2 y pAppk, provenientes de las FLA₂s Lys49 miotóxicas de *Bothrops asper* y *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, respectivamente.

pEM-2

Santamaría *et al.* (Datos no publicados) sintetizaron un péptido constituido por 13 D-aminoácidos (KKWRWWLKALAKK), derivado de la secuencia original 115-129, de la miotoxina II de *B. asper*, el cual mostró una amplia actividad bactericida contra bacterias gram-negativas y gram-positivas, así como contra la levadura *Candida*, y protozoarios tales como *Toxoplasma* y *Acanthamoeba*. Además su toxicidad hacia células eucariotas se vio reducida en comparación con otros péptidos sintéticos derivados de esta miotoxina II.

Appk

Al igual que pEM-2, éste péptido está conformado por 13 D-aminoácidos (KKYKAYFKLKCKK) correspondiente a la región C-terminal 115-129. Appk reprodujo claramente la actividad citotóxica sobre las células de músculo esquelético *in vitro*, además del efecto miotóxico en ratones. Este descubrimiento identifica esta región como la determinante estructural para la actividad miotóxica, y constituye el primer reporte de un péptido, no-modificado, derivado de una FLA₂ con la capacidad de reproducir la actividad de la toxina madre *in vivo* (Núñez *et al.*, 2001).

Péptidos catiónicos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos, como también se les conoce, son considerados como armas de defensa muy antiguas, ya que su amplia distribución dentro de los organismos eucariotas, incluyendo mamíferos, anfibios, insectos y plantas, sugiere que estos péptidos han jugado un rol fundamental en el exitoso proceso evolutivo de estos organismos multicelulares (Zasloff 2002, Kamysz *et al.* 2003). En los últimos 20 años más de 700 péptidos (Cuadro 2) antimicrobianos han sido identificados (Stark *et al.* 2002).

Estos agentes son los elementos más importantes del sistema inmune innato, al constituir la primera barrera que los microorganismos invasores tienen que vencer para entrar al organismo (Kamysz *et al.* 2003, Marshall y Arenas 2003).

Cuadro 2. Algunos péptidos antimicrobianos provenientes de plantas y animales (Zasloff 2002).

Péptidos representativos		Origen	Tejido*
α -helical			
Cecropin A	RWKLFRKKEKVGONIRDGIIKAGPAVAWVGQATQIAKa	Silk moth	E, BC, H
Magainin 2	GIGKFLHSAKKFKGKAPVGEIMNS	Frog	E
Pexiganan	GIGKFLKKAKKFGKAPVILKIKa	Synthetic	
Dermaseptin 1	ALWKTMLKKLGTMLHAGKAALGAAADTISQGTQ	Frog	E
LL-37	LLGDFFFKSKKIKGKFKRIVRIKDFLRINLVPRTES	Human	E, BC
Buforin II	TRSSPAGLQFPVGRVHRLLRK	Vertebrate	E
One disulphide bond			
Bactenecin 1	RILCRIMFVCR	Cow	BC
Thanatin	GSKKVPPIYCNIRRTGKQORM	Insect	BC
Brevinin 1T	VNPIILGVLPIKVCUTKKK	Rana frogs	E
Ranalexin	FLGGLIKVPAMICAVTKKC	Rana frogs	E
Ranaleurin 1	SMLSVLKNLGKVLGPFVACKNKCC	Rana frogs	E
Esculetin 1	GIFSKLGRKKKNLLISGLKNGKVEGMQVWRTGDIAGCKKKEC	Rana frogs	E
Two disulphide bonds			
Tachyplesin	RWC ₁ FRVC ₂ YRGC ₂ YRKC ₁ Ra	Horseshoe crab	BC
Androctonin	RSVC ₁ RDIKC ₂ RRGGC ₂ YKCC ₁ TNRPY	Scorpion	H
Prolegirin 1	RGGRLC ₁ YC ₂ RRRFC ₂ VC ₁ VGRa	Pig	BC
Three disulphide bonds			
α -defensin (HNP3)	DC ₁ YC ₂ RPAC ₃ AGERRYGTC ₂ YQGRLWAFCC ₃	Human	BC, E
β -defensin (TAP)	NPVSC ₁ VFNKGC ₂ VPIRC ₃ PGSMKQIGTC ₂ VGRAVKC ₁ C ₂ RKK	Cow	E, BC
θ -defensin	GFC ₁ RC ₂ LC ₃ RRGVC ₃ RC ₂ C ₁ TR	Monkey	BC
Defensin (sapecinA)	ATC ₁ DLLSGTGINHSA ₂ AAHC ₃ LLRGNRGGYC ₂ NGKAMC ₃ VC ₁ RN	Insect	E, BC, H
Thionin (crambin)	TTC ₁ C ₂ PSINARSNFNV ₃ RIPGTPEAC ₂ ATYTG ₂ IIPGATC ₁ PGDYAN	Plant	E
Four disulphide bonds			
Defensin	QKLC ₁ QPPSGTWSGVC ₂ GNNNAC ₂ KNQC ₂ IRLEKARHGSC ₂ NYVFAHC ₂ IC ₂ YFPC ₂	Radish	Seeds, E
Drosomycin	DC ₁ LSGRYKGFPC ₂ AWIDNETC ₃ RFVC ₂ KEEGRSSGHC ₂ SPSLKC ₃ WC ₄ EGC ₁	Drosophila	H
Hepcidin	DTHFPIC ₁ IFC ₂ CC ₃ C ₁ HRSKC ₂ GMC ₂ C ₁ KT	Human	Liver
Linear, not α -helical			
Bac 5	RFRPPRRPPRRPPFPYPPFRPPRRPPFPPIRPPFRPPLGRPPRa	Cow	BC
PR-39	RARRPPPYLPARRPPFFPPRLPPRIRPFGFPFRPPRRPPRa	Pig	BC
Indolicidin	ILPWKWPWWPWRRa	Cow	BC
Apidaecin	GNNRPVYIPQRRPPHFR	Honeybee	H
Pythococcin	VCKGSYLPRTPPRPIYNRN	Insect	H
Histatin 5	DSHAKRHGKRFHEKHHSHRIGY	Human	Saliva

*BC, células sanguíneas; H, hemolimfo; E, tejido epitelial

Muestran un amplio espectro de actividades, matando o neutralizando muchas bacterias gram-negativas y gram-positivas, incluyendo algunas cepas resistentes a antibióticos y también muchos hongos y levaduras, virus y parásitos (Start *et al.* 2002).

Clasificación

Con base en sus características estructurales, los péptidos catiónicos pueden ser divididos dentro de tres clases distintas:

1. Péptidos lineales que forman estructuras de α -hélice.
2. Péptidos con terminaciones ricas en cisteína con uno o varios puentes disulfuro.
3. Moléculas ricas en aminoácidos específicos como prolina, glicina, histidina y triptófano.

Estructura

Usualmente los péptidos antimicrobianos están constituidos por 12 a 50 aminoácidos. Difieren en secuencia y estructura, sin embargo, son clasificados dentro de esta categoría al presentar una característica en común, ya que están conformados por aminoácidos hidrofóbicos y catiónicos, los cuales les confieren la capacidad de adoptar formas en las que estos grupos de aminoácidos son espacialmente organizados, de manera que la molécula adquiere un diseño anfipático (Fig. 4) (Hancock *et al.* 1999, Start *et al.* 2002, Zasloff 2002).

La región catiónica de los péptidos es capaz de interactuar con estructuras cargadas negativamente de la membrana microbiana y finalmente se logra la permeabilización (Kamysz *et al.* 2003).

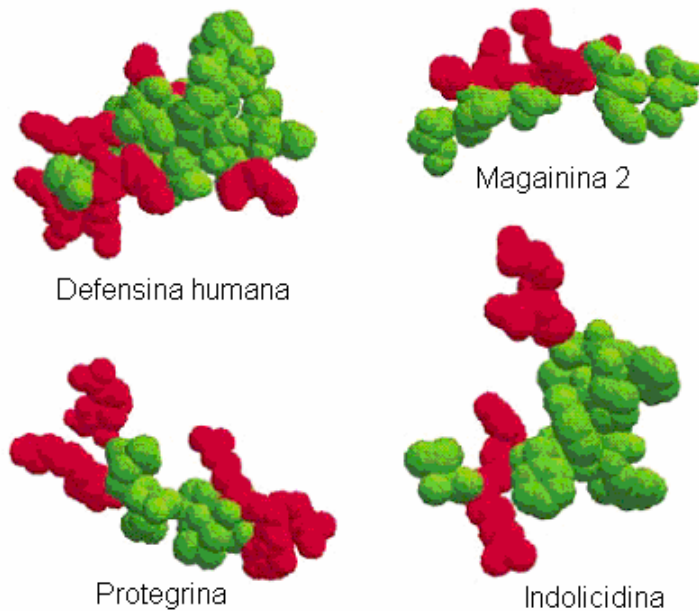


Figura 4. Representación de los grupos de aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos dentro de distintos dominios en varios péptidos antimicrobianos de diferentes clases estructurales. El color rojo representa los aminoácidos básicos (cargados positivamente) y el color verde muestra los aminoácidos hidrofóbicos (no poseen afinidad con el agua).

Mecanismo de acción

El modelo propuesto para explicar el mecanismo de acción de la mayoría de estos péptidos es el modelo de Shai- Matsuzaki-Huang (SMH) (Fig. 5). Este modelo propone que los péptidos lineales con hélices anfipáticas interactúan con las membranas bacterianas e incrementan su permeabilidad, ya sea, mediante el efecto de las cargas positivas con los lípidos aniónicos de las membranas, mediante la desestabilización a través del desplazamiento de lípidos debido al drástico cambio de la carga neta del sistema o en ciertos casos por la entrada del péptido a la célula (Zasloff 2002).

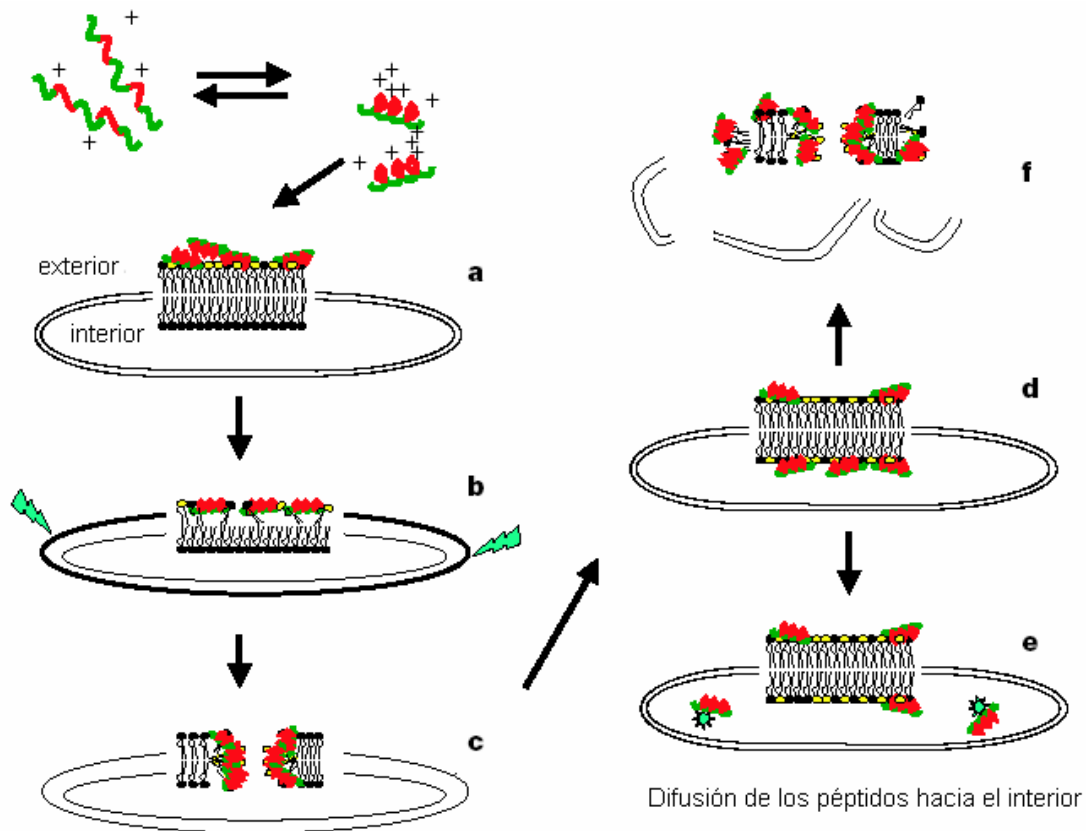


Figura 5. El modelo de Shai-Matsuzaki-Huang que explica el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos. a. Tapizando la membrana externa con los péptidos. b. Integración del péptido dentro de la membrana. El área de superficie de la parte externa se expande relativamente hacia el interior de la capa, resultando en la creación de una bicapa. c. Fase de transición y formación de poros. d. Transporte de lípidos y péptidos al interior de la capa interna. e. Difusión de péptidos hacia el interior de la bacteria (en algunos casos). f. Colapso de la membrana en fragmentos y ruptura física de la célula procarionota. Los lípidos con cabezas amarillas están cargados negativamente. Los lípidos con cabeza negra no poseen carga neta.

Aplicaciones

En los últimos años la salud pública se ha visto amenazada por varios problemas, entre ellos, el incremento de la resistencia hacia los antibióticos convencionales y por ende la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos que disminuyan el problema anterior.

Con el fin de solucionar esta problemática, se han realizado estudios clínicos y de laboratorio, los cuales demuestran que la aparición de resistencia contra péptidos antimicrobianos es menos probable en comparación con los antibióticos convencionales, ya que estos agentes actúan a nivel de la membrana bacteriana, por lo que un microorganismo tendría que rediseñar su membrana cambiando la composición y/u organización de sus lípidos, lo cual sería probablemente una solución muy costosa para la mayoría de las especies microbianas. Por esta razón se impulsa el desarrollo de esta clase de péptidos, tanto naturales como los elaborados en laboratorio, como futuros agentes terapéuticos (Zasloff 2002).

En este campo de los péptidos antimicrobianos, la biotecnología juega un papel crucial, ya que en el futuro no sólo será posible la síntesis química de estos agentes, sino que también se vislumbra la posibilidad de biosintetizar y producir péptidos antimicrobianos con utilidad terapéutica a gran escala. La razón principal por la cual se considera esto posible, es debido a que estos péptidos están codificados por pequeños genes, los cuales poseen secuencias conservadas que hacen su clonaje muy sencillo (Marshall *et al.* 2003).

El interés mostrado por la comunidad científica mundial en esta clase de moléculas ha impulsado el desarrollo de estudios en los cuales se ha propuesto a los péptidos antimicrobianos como moléculas multifuncionales. Además de jugar un papel muy importante como nuevos agentes antibióticos poseen propiedades adicionales, como actividad anti-tumoral, actividad mitogénica, señalización de rutas de transducción y respuesta en la inmunidad adaptativa (Kamysz *et al.* 2003).

Actividad anti-tumoral

El organismo humano se caracteriza por poseer una marcada estabilidad para mantener el medio interno, gran parte de este control depende de una adecuada regulación en la proliferación de las diferentes poblaciones celulares que tienen lugar en sus tejidos y órganos. Sólo una coordinada maquinaria reguladora, donde interviene un gran número de factores, puede mantener el equilibrio necesario entre los procesos que entraña la proliferación de las poblaciones celulares, definida como el incremento del número de células, resultado del comportamiento del ciclo celular y del equilibrio entre crecimiento, división y muerte celular (Sánchez *et al.* 2001).

El cáncer es considerado como una enfermedad genética de las células somáticas, pues se origina de alteraciones en la secuencia y organización del genoma celular que van desde simples sustituciones a nivel de nucleótidos hasta grandes aberraciones cromosómicas. Esto representa una desviación de la homeostasis celular, pues la estabilidad genómica no se mantiene en este tipo de células. Como resultado del desafío de los controles normales celulares se originan las células tumorales, las cuales se caracterizan por su proliferación descontrolada e inmortalidad, siendo capaces de invadir y colonizar los tejidos que las rodean (Alberts *et al.* 1996, Sánchez *et al.* 2001, Shiloh 2003).

Esta enfermedad es considerada como la segunda causa de muerte en el mundo occidental, abarcando aproximadamente un 24% de todas las muertes ocurridas. En Europa por ejemplo, cada año tres cuartos de millón de personas mueren a causa del cáncer (Sadeghi-Aliabadi *et al.* 2000).

Existen tres estrategias que son utilizadas en el tratamiento del cáncer: cirugía, radioterapia y quimioterapia. Esta última constituye un campo de

constante estudio en el cual existen muchos esfuerzos a nivel mundial para poder desarrollar agentes quimioterapéuticos que ofrezcan mayores ventajas que los que hoy día se utilizan (Aliabadi *et al.* 2000).

Entre los principales objetivos de desarrollo de estos agentes se puede mencionar el desarrollo de drogas con una fuerte selectividad únicamente hacia las células tumorales, pues se sabe que muchos de los agentes anti-tumorales disponibles actualmente pueden llegar a dañar las células normales, también se espera disminuir la resistencia múltiple a las drogas por parte de las células cancerosas (Alberts *et al.* 1996, Aliabadi *et al.* 2000, Papo *et al.* 2003).

En la búsqueda de una solución a estos problemas que actualmente afectan a millones de personas en el mundo, surge un nuevo grupo de potenciales agentes anti-tumorales, los péptidos catiónicos antimicrobianos, los cuáles forman parte de una ardua investigación pues ya se han registrado algunos péptidos con potencial anti-tumoral.

En un estudio realizado por Papo *et al.* (2003) con esta clase de péptidos, se propone que en contraste con las células eucarióticas normales, las cuales generalmente tienen bajos potenciales de membrana y cuya capa exterior consiste casi exclusivamente de fosfolípidos zwitteriónicos, las membranas celulares procarióticas y de células tumorales mantienen grandes potenciales transmembrana y tienen un alto contenido de fosfolípidos aniónicos en su capa exterior. Esta última propiedad permite que los péptidos catiónicos se unan a estas membranas celulares cargadas negativamente, debido a su estructura anfipática, permitiendo así que muchos de estos péptidos catiónicos prefieran dañar las membranas de células tumorales ante las normales.

Lo anterior puede constituir un posible camino hacia la selectividad propuesta para estos péptidos, sin embargo el mecanismo mediante el cual estos actúan es incierto, pero el campo de estudio está abierto para que en un futuro se pueda dilucidar y con ello sintetizar esta clase de péptidos en busca de tratamientos más eficientes y menos dañinos que proporcionen una pequeña esperanza de vida a todas aquellas personas que padecen enfermedades de este tipo (Howe *et al.* 2001).

Algunos ejemplos

Como se mencionó anteriormente, se están realizando muchos estudios para el desarrollo de nuevos agentes anti-tumorales, dentro de los cuales el campo de los péptidos antimicrobianos cuenta con una considerable participación ya que existen varios péptidos de esta clase que se han reconocido como potenciales agentes anti-tumorales.

Chen *et al.* (1997) al realizar estudios con cecropina B (péptido antimicrobiano proveniente de mariposas de seda) y sus análogos, CB-1 y CB-2 (con cinco residuos extra de lisina en la posición de 1-10) proponen que el diseño sintético de péptidos antimicrobianos con residuos de aminoácidos catiónicos extra son más efectivos en la lisis de células cancerosas. Chiu *et al.* (1998) proponen que el diseño anfipático de CB-1/CB-2 presenta una mayor actividad contra células tumorales, además los resultados de este estudio proveen evidencia de que existen diferentes rutas por las cuáles estos péptidos lisan las células tumorales.

Por otro lado, Rozek *et al.* (2000) proponen la actividad anti-tumoral de 2 péptidos aislados de la piel de ranas australianas, *Litoria aurea* y *Litoria raniformis*.

Estos péptidos antimicrobianos se denominan aureinas y la secuencia de estos dos péptidos se muestra a continuación: aureina 1.2 (GLFDIIKKIAESF-NH₂) y aureina 3.1 (GLFDIVKKIAGHIAGSI-NH₂)

Otro péptido que ha sido estudiado es la magainina 2, el cual fue aislado de la piel de la rana Africana *Xenopus laevis*. Tanto la magainina 2 como sus análogos magainina A y magainina G fueron probados contra líneas celulares tumorales. Los resultados sugieren que MAG A y MAG G tuvieron actividad anti-tumoral contra células de cáncer de pulmón y que la magainina 2 presenta actividad contra el cáncer de ovario en ratones (Ohsaki *et al.* 1992, Baker *et al.* 1993).

Scott *et al.* (2000) estudiaron un péptido al que denominaron híbrido cecropina/melitina (CEMA), el cual fue más selectivo hacia las células tumorales que hacia las no transformadas.

Por último, Winder *et al.* (1998) proponen la expresión de péptidos antimicrobianos (melitina y cecropina) en células de carcinoma como terapia génica en la erradicación de células tumorales.

Los estudios citados anteriormente constituyen una muestra de la intensa búsqueda de agentes quimioterapéuticos en respuesta a los diversos efectos que presentan la mayoría de las drogas utilizadas contra el cáncer. Algunos de estos efectos son: la alta toxicidad, inactivación por fenotipos de resistencia a multidrogas, respuesta incompleta, así como la escasa selectividad que presentan la mayoría de las drogas al atacar las células normales (Papo *et al.* 2003).

Es así como surge la necesidad de desarrollar nuevas clases de drogas anticáncer con nuevos modos de acción que permitan diferenciar entre una

célula normal y una tumoral, y este es el caso de los péptidos catiónicos antimicrobianos citados anteriormente.

Ensayos de citotoxicidad (Wilson 1992)

El uso de sistemas de ensayo a nivel *in vitro* en la búsqueda de potenciales agentes anti-tumorales ha sido una práctica muy común desde los inicios de la quimioterapia clínica en cáncer en 1946, desde entonces los programas de desarrollo de drogas para la identificación de nuevos agentes quimioterapéuticos involucran una extensa evaluación preclínica de un vasto número de agentes químicos para la detección de la actividad antineoplásica, en los cuales los sistemas de citotoxicidad *in vitro* juegan un papel muy importante.

Los ensayos de citotoxicidad miden las alteraciones inducidas por una droga en una ruta metabólica específica o en la integridad estructural celular, la cual puede o no estar relacionada con la muerte celular. Mediante estos ensayos es posible identificar componentes potencialmente activos, identificar el mecanismo mediante el cual estos componentes ejercen su efecto tóxico, predecir la eficacia de la citotoxicidad de un componente para el tratamiento de pacientes con cáncer, identificar las poblaciones celulares más susceptibles así como relacionar la concentración con el tiempo de exposición del componente a probar.

La técnica de cultivo en monocapa ha sido la más frecuente en los ensayos de citotoxicidad para probar en líneas celulares tumorales ya que ofrece flexibilidad en términos de tiempo de exposición a la droga y en métodos de cuantificación del efecto de la droga, además es el método que requiere el número más bajo en células, permite ensayar con un amplio rango de drogas en variadas concentraciones y provee facilidad de automatización.

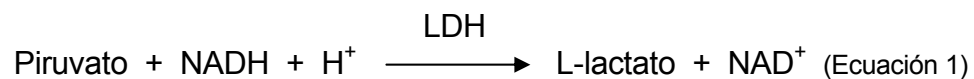
Dentro de los ensayos de citotoxicidad existen muchas técnicas que pueden ser evaluadas, de las cuáles, las que se utilizan para determinar el daño en la membrana plasmática provocado por la droga en cuestión son las más comúnmente utilizadas. En este estudio se utilizará una de estas técnicas, la cual se basa en la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al exterior celular.

Liberación de la enzima lactato deshidrogenasa

La LDH es una enzima citosólica presente dentro de todas las células mamíferas. La membrana plasmática es impermeable a la LDH, pero el daño en la membrana celular resulta en un cambio en la permeabilidad de la membrana y la subsecuente liberación de la enzima hacia el fluido extracelular (Arechabala *et al.* 1999).

Esta técnica es ampliamente utilizada para determinar el efecto de la sustancia en estudio sobre cultivos celulares, mediante la cual las células se exponen a diferentes concentraciones de la sustancia en estudio para que actúe en un determinado período de tiempo. La liberación de LDH hacia el sobrenadante de los cultivos celulares está relacionada con la cantidad de células muertas y daño celular, lo que provee una medida precisa de la toxicidad celular inducida por la sustancia en estudio (Allen *et al.* 1994).

Como resultado, la liberación de LDH es una prueba confiable y muy popular para medir citotoxicidad en diversos tipos de estudios y se basa en la capacidad de la enzima para catalizar la reacción:



El cambio en la absorbancia óptica, medida a 340nm, refleja el cambio en la concentración de NADH, y a su vez, el nivel de LDH presente en la muestra analizada. La actividad de la enzima puede ser expresada directamente en términos de absorbancia o en unidades internacionales (UI) (Allen *et al.* 1994).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la citotoxicidad de los péptidos pEM-2 y Appk sintetizados a partir de la secuencia de las FLA₂s Lys49 mitotóxicas provenientes de *Bothrops asper* y *Agkistrodon piscivorus piscivorus* respectivamente, mediante ensayos con líneas celulares normales y tumorales, así como el potencial de acción anti-tumoral de los péptidos en un modelo murino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer cultivos de diversas líneas celulares eucarióticas normales y tumorales.
2. Determinar la citotoxicidad *in vitro* de cada uno de los péptidos sobre dichas líneas celulares.
3. Establecer un modelo de ratón para las líneas celulares tumorales EMT6, B16 y P3X.
4. Evaluar la posible acción anti-tumoral del péptido pEM-2, utilizando los anteriores modelos de ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Para la realización de este estudio se utilizaron un total de seis líneas celulares de origen murino. Cuatro de estas corresponden a líneas celulares tumorales, B16 (melanoma), EMT6 (carcinoma mamario), P3X (mieloma) y S-180 (sarcoma), y dos a líneas celulares normales, t-End (endotelio capilar) y C2C12 (músculo esquelético) (Anexo 1).

Péptidos catiónicos

Dos péptidos sintéticos fueron utilizados, pEM-2 (KKYRYYLKALAKK) (Santamaría *et al*, datos no publicados) y Appk (KKYKAYFKLKCKK) (Nuñez *et al*, 2001), provenientes de la región C-terminal de las FLA₂s Lys49 mitotóxicas de *Bothrops asper* y *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, respectivamente (Anexo 2). Ambos péptidos están compuestos de 13 D-aminoácidos y fueron sintetizados mediante la estrategia Fmoc [N-(9-fluorenilmetoxicarbonilo)] (Fields *et al*. 1990) por la compañía estadounidense SynPep (Anexo 2). La pureza de los péptidos fue determinada por esa misma compañía por RP-HPLC en una columna C-18 y se realizó un análisis de espectrometría de masas. Para ambos péptidos el porcentaje de pureza fue >95 %. La medida de la masa molecular para pEM-2 y Appk fue de 1742,9 y 1677,0 Daltons, respectivamente (Anexo 3-6). Los péptidos se mantuvieron a -20°C y justo antes de su utilización se disolvieron en NaCl 0,12 M y fosfato de sodio 40 mM (PBS), pH 7,2.

Establecimiento de los cultivos celulares (Lomonte et al. 1999a)

Se procedió a descongelar las células que se encontraban conservadas en nitrógeno líquido a -196°C. Las líneas B16, t-End, C2C12 y P3X se cultivaron en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma D- 5796), y las

dos líneas restantes, EMT6 y S-180, en el medio RPMI 1640 (GibcoBRL). Ambos medios fueron suplementados con 15% de suero fetal bovino (SFB; Sigma F-2442), 2mM de glutamina, 1 mM de ácido pirúvico, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (0,1 mg/ml), y anfotericina B (0,25 µg/ml).

Las células se cultivaron en monocapas subconfluentes, en botellas de 25 cm² para su multiplicación, por un período de 2-3 días bajo una atmósfera húmeda de crecimiento al 7% de CO₂, a 37°C.

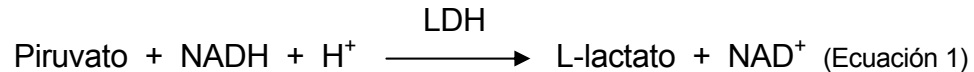
El desprendimiento de las células se realizó mediante la adición de tripsina (1500 U/ml) 5,3 mM de EDTA. Se dejó en reposo por 5 minutos a 37°C. Posteriormente los grumos celulares se disgregaron y se lavaron mediante centrifugación y resuspensión en medio de cultivo fresco en una microplaca de 96 hoyos, en una densidad aproximada de $1 - 4 \times 10^4$ células en el mismo medio, de 2-3 días bajo las mismas condiciones del cultivo inicial (botellas de 25 cm²).

Ensayo de citotoxicidad *in vitro* (Lomonte *et al.* 1999a)

Al finalizar el tiempo de crecimiento de las líneas celulares en la microplaca de 96 hoyos, se aspiró el medio de cultivo con cuidado de no llevarse las células con este. Posteriormente se procedió a ajustar las concentraciones de los péptidos pEM-2 y Appk a 8, 15, 30, 60 y 120 µg/hoyo en los medios DMEM o RPMI suplementados con 1% de SFB. Se adicionó 150 µl de cada una de las diluciones de los péptidos a las células cultivadas en las microplacas de 96 hoyos. Se dejó reposar por 3 horas a 37°C y luego se midió la actividad relacionada con la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en una muestra del sobrenadante. Se prepararon controles de 0% y 100 % de toxicidad como valores de referencia, con el medio solo y con 0.1% de Tritón X-100, respectivamente.

Liberación de LDH (Lactato deshidrogenasa)

Para la determinación de la actividad de la enzima LDH (EC. 1.1.1 27) se utilizó el método LDH - P UV optimizado por la Sociedad Francesa de Biología Clínica (SFBC), elaborado por Wiener laboratorios (Anexo 7-8). El fundamento del método está basado en la reacción representada en la ecuación 1:



El kit consta de una solución buffer Tris, pH 7,2 que contiene piruvato y cloruro de sodio, además de los viales de NADH. Estos últimos se reconstituyeron con 20 ml del buffer. Se trabajó con 1ml del sustrato reconstituido al cual se le adicionó 80 µl del sobrenadante de las células incubadas por 3 horas a 37°C con las diferentes cantidades adicionadas de los péptidos (8, 15, 30, 60 y 120 µg/hoyo). Posteriormente, se procedió a medir la reacción (disminución de absorbancia) en un espectrofotómetro UV-visible, a una longitud de onda de 340 nm, a 30°C, con un tiempo de reacción de 160 segundos y utilizando un factor de cálculo de 8,095.

Los resultados se expresaron como el promedio del porcentaje de las UI/I de LDH ± el error estándar de duplicados (Lomonte *et al.* 1999a). A partir de este cálculo se estimó la Concentración Letal media, LC₅₀, para cada péptido con cada una de las seis líneas celulares estudiadas. Este valor expresa la concentración a la cual se produjo el 50% de citotoxicidad en los cultivos celulares evaluados.

Observación al microscopio

Las células de los cultivos se observaron después de las tres horas de incubación con los péptidos directamente en su microplaca de 96 hoyos utilizando un microscopio invertido.

Evaluación de la acción anti-tumoral de pEM-2 in vivo

Se utilizaron las cepas de ratones C57BL/6 y Balb/c (hembras y machos) con un peso entre 17-21g (Anexo 9). Se procedió a contar las células en un hemocitómetro de Neubauer mediante la tinción con azul tripán, el cual tiñe las células muertas, por lo que las células viables se distinguen perfectamente de las no viables (Anexo 10). El número de células por mililitro se determinó de la siguiente manera:

$$\text{células/ml} = \frac{\text{\# células contadas}}{\text{\# cuadrados contados}} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$$

$$\text{total de células} = \text{células/ml} \times \text{volumen original de la suspensión celular}$$

Las células de melanoma B16 se inyectaron subcutáneamente (s.c) en el lomo de 14 ratones C57BL/6 (2×10^2 células; 7 ratones/grupo (Hu y Garen 2000). Al igual que las anteriores, las células de carcinoma mamario EMT6 se inyectaron de manera subcutánea, pero en 21 ratones Balb/c (8×10^5 células; 7 ratones/grupo). El tercer modelo se desarrolló inyectando intraperitonealmente 10 ratones Balb/c con células de mieloma P3X (1.9×10^6 células; 5 ratones/grupo). Se trabajó con un grupo control (PBS, 200 μ l) y otro de tratamiento con péptido (pEM-2, 250 μ g en 200 μ l de PBS) para los tres modelos, además para EMT6 se trabajó con un grupo de control positivo con paclitaxel (90 μ g en 200 μ l de PBS), un agente antimitótico utilizado para el tratamiento de distintos tipos de cancer (Jennings *et al.* 2002, Kobayashi *et al.* 2004, Patel 1998, Schmitt-Sody *et al.* 2003) (Anexo 11). Las células se dejaron establecer por 2 días, al cabo de los cuales se administró a los ratones el tratamiento (péptido pEM-2), PBS (para los grupos control) o paclitaxel por la ruta intraperitoneal (i.p.) en las concentraciones especificadas. Después de los dos días, se realizaron 5 aplicaciones de cada tratamiento a las dosis especificadas anteriormente para cada modelo

de día por medio, y al cabo de 13 días los ratones fueron sacrificados, los tumores (melanoma B16, y carcinoma mamario EMT6) fueron extirpados y pesados. El potencial de acción antitumoral de pEM-2 en el modelo del mieloma P3X se evaluó mediante el peso corporal de los ratones. Los resultados se expresaron como el peso promedio \pm el error estándar de la media.

Análisis estadístico

Los resultados de este estudio se analizaron en el programa de análisis estadístico STATISTICA, versión 5.1. Se realizó un análisis de variancia (ANOVA) de dos vías con el fin de evaluar la interacción entre los péptidos y las líneas celulares. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre la citotoxicidad de ambos péptidos para cada línea se realizó una t-Student. Además, para analizar el comportamiento de las líneas celulares con cada uno de los péptidos utilizados, se realizó una ANOVA de una vía y se realizó la prueba de confirmación a posteriori (Tukey HSD) para determinar en cuáles líneas existían las diferencias significativas. .

Para determinar la significancia en la reducción de los tumores sólidos de EMT6 se utilizó una ANOVA de una vía ya que el número de grupos a comparar eran 3, y para el caso de los tumores sólidos de B16 se realizó una t-Student, pues se contaba con dos grupos. Para todos los análisis se determinó un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de Appk y pEM-2

Mediante los ensayos de citotoxicidad realizados se pudo determinar que los péptidos Appk y pEM-2 son citotóxicos tanto hacia las líneas celulares tumorales (S-180, B16, EMT6 y P3X) como hacia las normales (C2C12 y t-End) (Fig. 5). Sin embargo, cabe destacar que al evaluar la interacción entre los péptidos y las líneas celulares (Fig. 6) se determinó la existencia de diferencias significativas en la citotoxicidad entre las líneas celulares según el péptido evaluado ($F_{5, 12} = 11,43$, $p = 0,0003$). Además, se puede notar que para las líneas celulares S-180, EMT6 y C2C12, el péptido Appk fue significativamente más tóxico que el péptido pEM-2 ($p < 0,05$) (Fig. 6).

Por otro lado, el análisis de variancia demuestra que para el caso del péptido pEM-2, existen diferencias entre las seis líneas celulares evaluadas con éste ($F_{5, 6} = 34,36$, $p = 0,0002$). El análisis demuestra que la línea más susceptible corresponde al mieloma P3X (LC_{50} de 0,13 mg/ml), y que la línea celular más resistente fue la del sarcoma S-180 con un LC_{50} de 0,58 mg/ml ($p < 0,05$). Las líneas t-End, B16, EMT6 y C2C12 presentaron un comportamiento muy similar (Fig. 7a).

Las alteraciones morfológicas ocasionadas por el péptido pEM-2 se analizaron por medio de la visualización de las células, después de las 3 horas de incubación con el péptido, en un microscopio invertido y se fotografiaron. Se pudo observar alteraciones en la morfología de las células de P3X a partir de 15 µg/hoyo (0.1 mg/ml), mientras que para la línea de sarcoma S-180 este patrón se observó hasta los 60 µg/hoyo (0.4 mg/ml) (Fig. 8).

En el caso del péptido Appk, también se encontró diferencias entre las líneas celulares analizadas ($F_{5, 6} = 13,28$, $p = 0,003$). Se determinó que las líneas celulares más susceptibles al péptido Appk fueron las líneas de carcinoma mamario EMT6 y mieloma P3X ($p > 0,05$) presentando valores de LC_{50} de 0,01 y 0,15 mg/ml, respectivamente (Fig. 7b). Las líneas celulares t-End, B16, S-180 y C2C12 mostraron un comportamiento muy similar. Al igual que con el péptido pEM-2, las alteraciones morfológicas provocadas por el péptido a las células fueron visualizadas en un microscopio invertido y fotografiadas. En las fotografías (Fig. 9) se observan alteraciones a partir de 15 $\mu\text{g}/\text{hoyo}$ (0.1 mg/ml) del péptido en las células EMT6 y P3X, mientras que en las demás células este tipo de alteraciones se observa a partir de 30 $\mu\text{g}/\text{hoyo}$ (0.2 mg/ml).

Acción anti-tumoral de pEM-2 *in vivo*

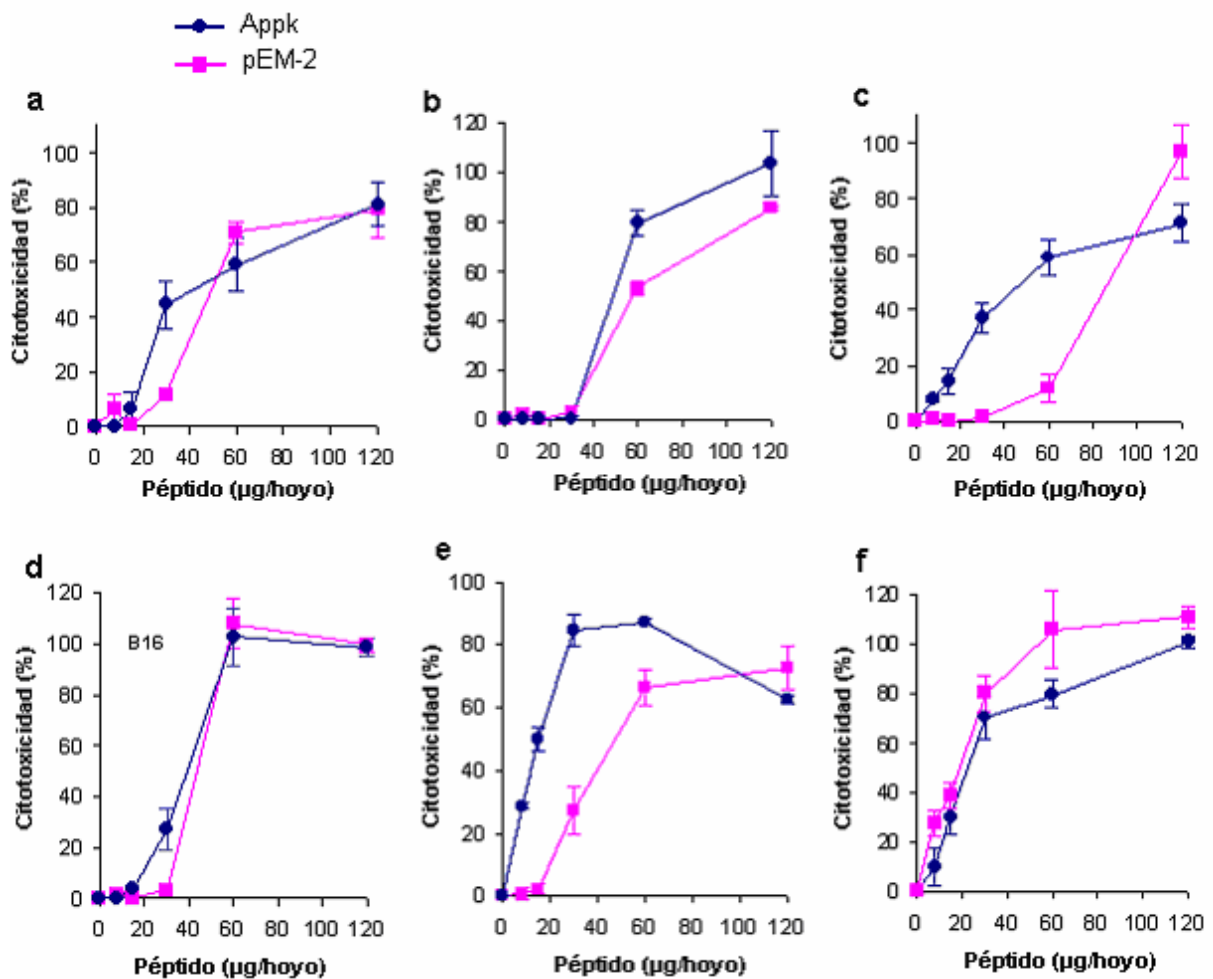
Se analizó la actividad antitumoral *in vivo* del péptido pEM-2 sobre 3 modelos tumorales (EMT6, B16 y P3X) mediante la evaluación de su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral inducido en los ratones C57BL/6 y Balb/c, cuando se inyectó 250 μg de éste por ruta i.p.

La observación más importante de esta sección, es la reducción en un 28% (mismo porcentaje de reducción en el grupo de ratones tratados con paclitaxel) en el peso de las masas tumorales producidas de manera s.c. con la línea celular EMT6 cuando se les inyectó el péptido sintético pEM-2 (Fig. 10). Sin embargo, al realizar el análisis de variancia respectivo, se determinó que esa reducción no era estadísticamente significativa ($F_{12, 17} = 1,18$, $p = 0,33$).

En el caso del modelo desarrollado con la línea de melanoma B16 (inoculada de manera subcutánea) no se observó reducción alguna en el grupo tratado con el péptido pEM-2 respecto al grupo control tratado con PBS. Por último,

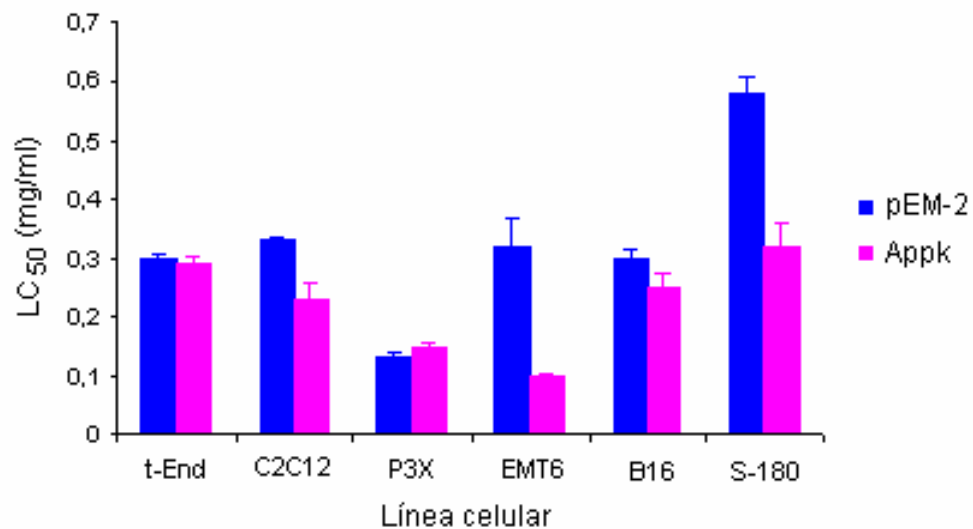
en el modelo del mieloma P3X (tumor ascítico) no se pudo evaluar la acción anti-tumoral del pEM-2, debido a que las células no proliferaron de manera exitosa en el peritoneo de los ratones inoculados.

Durante el desarrollo de estos ensayos se observó que los ratones presentaban anomalías motoras y respiratorias después de que el péptido era inyectado, sin embargo, estas desaparecían al cabo de dos horas, restableciendo su comportamiento habitual; además, este comportamiento inusual después de la inyección del péptido fue cada vez menor al cabo de las 5 dosis aplicadas. A pesar de estos signos observados los ratones mantuvieron estable su peso corporal.



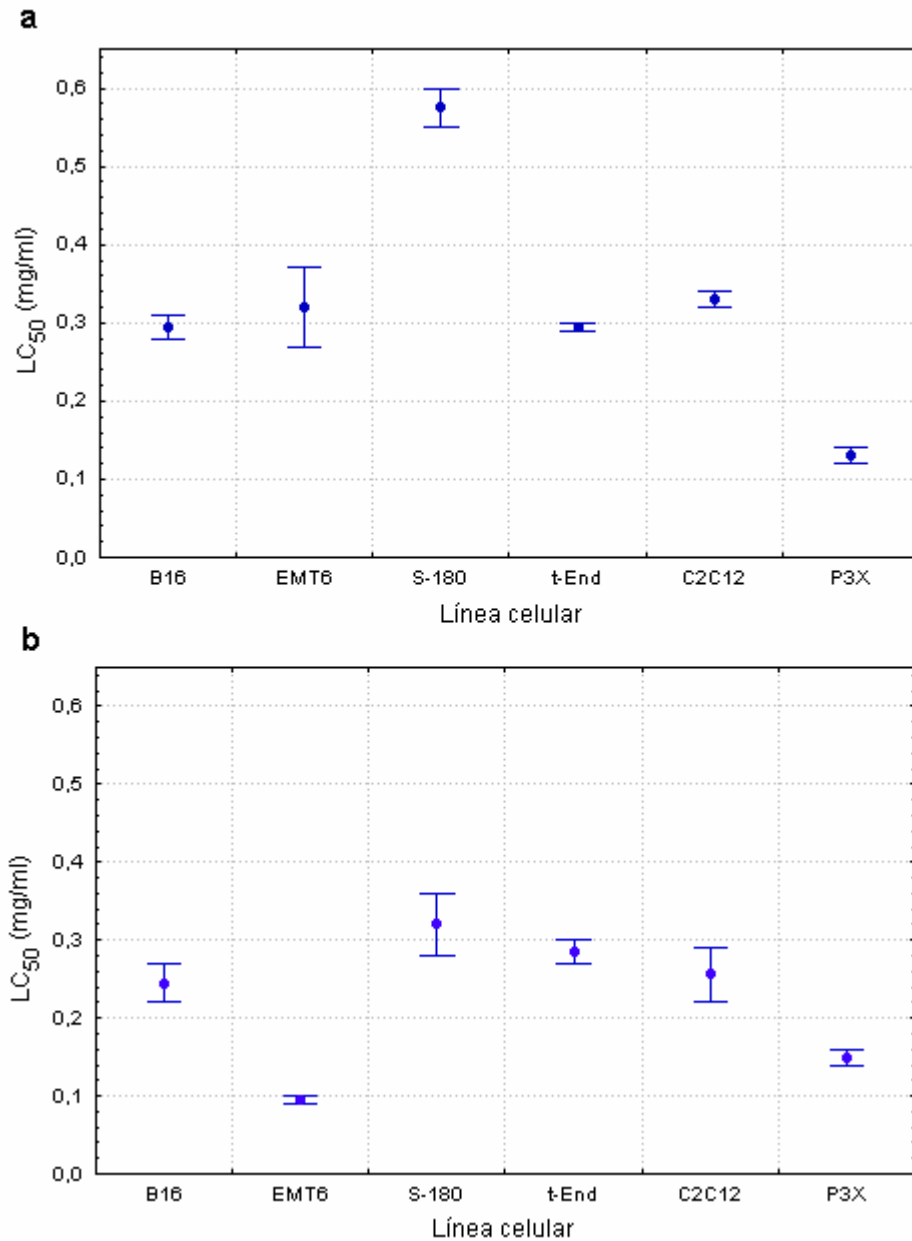
EXCEL, PAINT

Figura 6. Evaluación de la citotoxicidad de dos péptidos sintéticos derivados de fosfolipasas A₂ Lys49 mitóticas sobre seis diferentes líneas celulares. a. C2C12, b. t-End, c. S-180, d. B16, e. EMT6 y f. P3X. Todas las células fueron cultivadas en microplacas de 96 hoyos de 2-3 días. Posteriormente se determinó la actividad de la enzima LDH al incubar las células por 3 horas a 37°C con diferentes cantidades de los péptidos (8, 15, 30, 60 y 120 µg/hoyo). Los valores se expresaron como porcentajes, considerando el medio solo y con 0.1% de Tritón x-100 como el 0% y 100% respectivamente. Cada punto representa el promedio ± error estándar de duplicados.



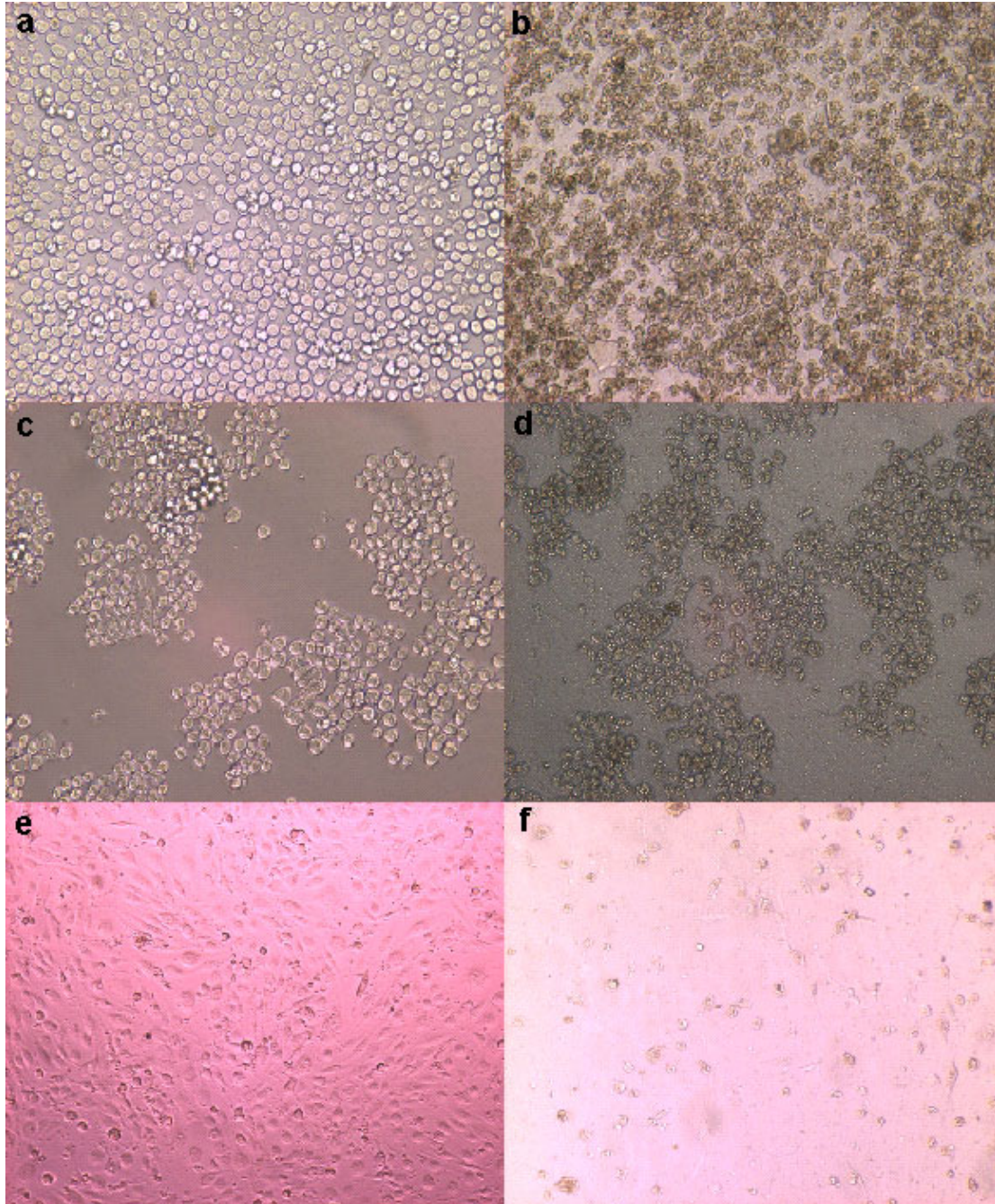
EXCEL, PAINT

Figura 7. Comparación de la citotoxicidad ejercida por pEM-2 y Appk sobre seis líneas celulares distintas. Se determinó la existencia de diferencias entre las líneas celulares según sea el péptido analizado. Los resultados fueron expresados como el promedio de la concentración a la cual existió el 50% de citotoxicidad, LC50 (mg/ml) como una estimación del porcentaje de citotoxicidad calculado según las UI/I de LDH liberadas del sobrenadante analizado, \pm el error estándar de duplicados.



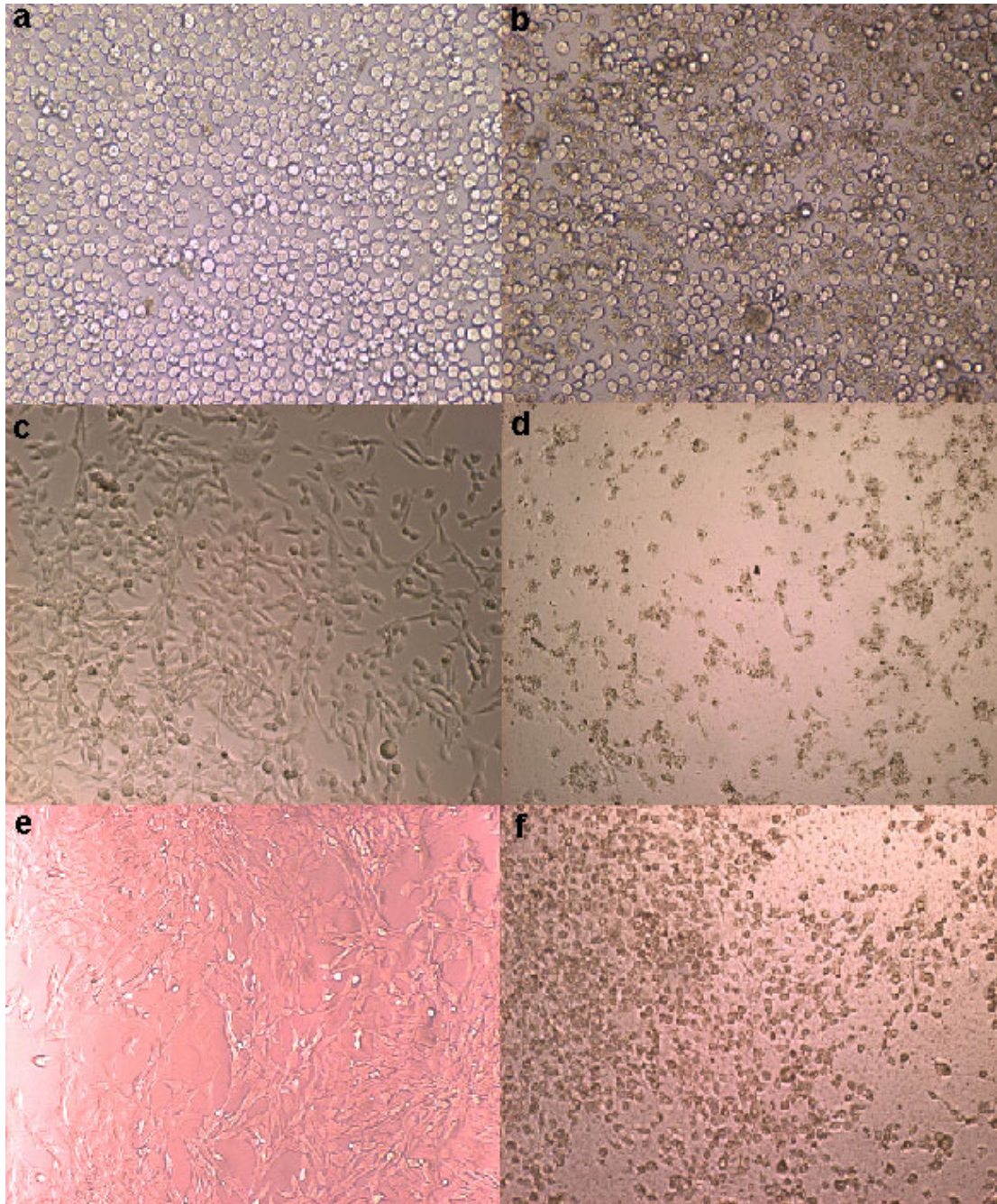
STATISTICA, PAINT

Figura 8. Actividad citotóxica ejercida por los péptidos sintéticos, Appk y pEM-2, sobre distintas líneas celulares murinas normales: C2C12 (músculo) y t-End (endotelio capilar); y tumorales: B16 (melanoma), EMT6 (carcinoma mamario), P3X (mieloma) y S-180 (sarcoma). a. pEM-2 y b. Appk. Se determinó la existencia de diferencias entre las líneas celulares para cada péptido. Los resultados se expresaron como la LC50 (concentración a la cual se obtuvo un 50% de citotoxicidad) como una estimación del porcentaje de citotoxicidad calculado según las UI/l de LDH liberadas del sobrenadante analizado. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de duplicados.



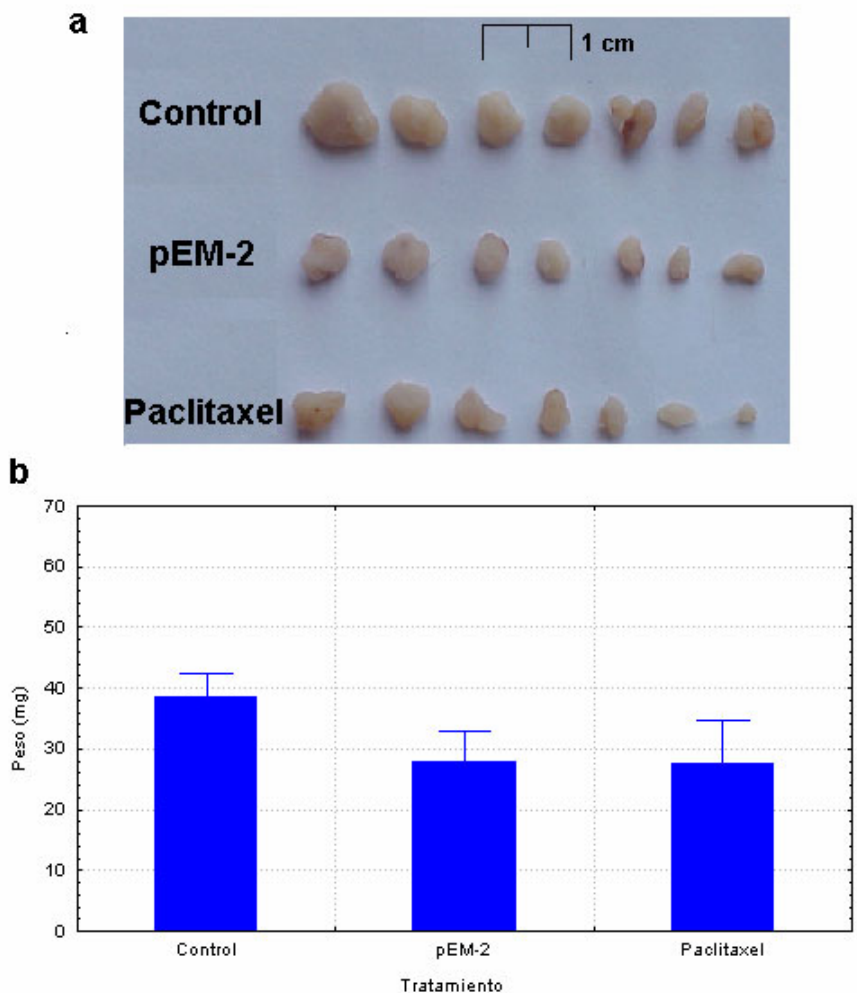
PAINT

Figura 9. Alteraciones morfológicas causadas por el péptido sintético pEM-2 sobre las líneas celulares P3X, S-180 y t-End. a. control de células de mieloma P3X sin péptido; b, células de mieloma P3X tratadas por 3 horas con 15µg/hoyo del péptido; c. control de células de sarcoma S-180 sin péptido; d, células de sarcoma S-180 tratadas por 3 horas con 120 µg/hoyo del péptido; e, control de células de endotelio t-End sin péptido; f, células de endotelio t-End tratadas por 3 horas con 60 µg/hoyo del péptido. Aumento: 100X.



PAINT

Figura 10. Alteraciones morfológicas causadas por el péptido sintético Appk sobre las líneas celulares P3X, EMT6 y C2C12. a, control de células de mieloma (P3X) sin péptido; b, células de mieloma (P3X) tratadas por 3 horas con 15µg/hoyo del péptido; c, control de células de carcinoma mamario (EMT6) sin péptido; d, células de carcinoma mamario (EMT6) tratadas por 3 horas con 15µg/hoyo del péptido; e, control de células de músculo (C2C12) sin péptido; f, células de músculo (C2C12) tratadas por 3 horas con 60 µg/hoyo del péptido. Aumento: 100X.



STATISTICA, PAINT

Figura 11. Acción antitumoral de pEM-2 sobre el crecimiento de tumores sólidos de carcinoma mamario EMT6. Se inocularon 8×10^5 células de EMT6 de forma s.c. en ratones Balb/c. El péptido pEM-2 (250 μ g), PBS (control) o paclitaxel (90 μ g) fueron inyectados i.p. Se utilizaron 7 ratones para cada grupo de tratamiento, los cuales recibieron 5 dosis de cada tratamiento y al cabo de 13 días (el día de la inoculación de las células corresponde al día 0) fueron sacrificados, los tumores se extirparon y pesaron. Para el caso del grupo control se eliminó un valor de peso de una masa tumoral mediante el coeficiente de rechazo debido a que sobresalía claramente de los 6 restantes. En a se observa el tamaño de las masas tumorales para cada tratamiento y el gráfico (b) representa el efecto de la inhibición de los tratamientos pEM-2 y paclitaxel sobre las masas tumorales. Para pEM-2 y paclitaxel se observó una disminución en un 28% del peso en las masas tumorales, sin embargo, ésta no fue estadísticamente significativa $p > 0,05$. Los resultados se expresaron como el peso promedio (mg) \pm el error estándar.

DISCUSIÓN

Este estudio arroja resultados en cuanto a la posible actividad anti-tumoral desplegada por Appk y pEM-2, ambos péptidos sintéticos relacionados con la región C-terminal de FLA₂s Lys49 miotóxicas, en el cual se evaluó la actividad citotóxica de estos, demostrando que ambos péptidos ejercen citotoxicidad tanto hacia las líneas celulares tumorales como hacia las normales (Fig. 6).

Es probable que la citotoxicidad desplegada por Appk y pEM-2 se base en un mecanismo mediante el cual esta clase de péptidos sintéticos provocan daño en las membranas celulares como consecuencia de la combinación de residuos catiónicos e hidrofóbicos, puesto que los residuos catiónicos pueden actuar electroestáticamente con los grupos aniónicos de un sitio aceptor (todavía desconocido), mientras que los residuos hidrofóbicos y específicamente los aromáticos podrían interactuar con y posiblemente penetrar la bicapa de fosfolípidos, resultando en una desestabilización de la membrana celular (Núñez *et al.* 2001, Lomonte *et al.* 1999b, Papo *et al.* 2003).

A pesar de que ambos péptidos mostraron citotoxicidad hacia todas las líneas celulares, el péptido Appk resultó ser significativamente más tóxico hacia las líneas S-180, EMT6 y C2C12 (Fig. 7).

Pueden existir varias razones que expliquen el hecho de que Appk sea más tóxico, entre estas, en un estudio realizado por Núñez *et al.* (2001), se demuestra que Appk reproduce el efecto miotóxico de la toxina intacta, con lo cual se convierte en el primer péptido sintético derivado de una FLA₂, sin modificar, con la capacidad de reproducir el efecto de la toxina madre *in vivo*.

Por otro lado, Chen *et al.* (1997), en un estudio realizado con cecropina B y dos análogos (péptidos catiónicos con actividad antitumoral provenientes de

polillas) proponen que el hecho de tener un número mayor de residuos catiónicos podría aumentar la toxicidad de los péptidos. Es así como, al comparar las secuencias de ambos péptidos, se observa que Appk posee siete residuos catiónicos, mientras que pEM-2 presenta seis residuos, es decir que Appk posee un residuo catiónico adicional a la secuencia de pEM-2, lo cual podría aumentar su toxicidad.

Además, cabe destacar que a pesar de que Appk posee residuos de tirosina se podría especular que la fenilalanina presente en este incrementa el carácter hidrofóbico del péptido (Núñez *et al.* 2001), ya que la tirosina es como la fenilalanina pero con un grupo hidroxilo en su anillo aromático, lo que lo hace menos hidrofóbico que la fenilalanina (Mathews y Van Holde 2002), por lo tanto es posible que el incremento en el carácter hidrofóbico de Appk puede estar relacionado con su alto potencial en el daño de la membrana celular.

Sin embargo, a pesar de que Appk mostró mayor citotoxicidad hacia las líneas S-180, EMT6 y C2C12 en comparación con pEM-2, el hecho de saber que a la misma concentración (250 µg) con la que se llevó a cabo los modelos tumorales murinos, este péptido reproduce el efecto miotóxico de la toxina intacta *in vivo*, lo excluyó como tratamiento para el desarrollo de estos modelos tumorales.

Como se indicó en los resultados, sólo en el modelo de carcinoma mamario EMT6 se observó una reducción del 28% de las masas tumorales tratadas con pEM-2, el cual fue el mismo para el grupo tratado con paclitaxel. A pesar de que esta reducción no fue estadísticamente significativa, los resultados mostrados en la Fig. 11 muestran que existe una tendencia a la reducción de las masas tumorales luego de la administración del péptido pEM-2.

Pese a lo anterior, es posible que el hecho de que a los ratones se les administrara la dosis (250 µg) de manera más frecuente, por ejemplo todos los días en lugar de día por medio (Chen *et al.* 2001), podría aumentar la concentración del péptido en el cuerpo del ratón y por lo tanto habría una mayor cantidad del péptido en el torrente sanguíneo, con lo cual, las células tumorales estarían en contacto con una mayor concentración del péptido y en este caso lo más probable es que el porcentaje de reducción obtenido sea mucho mayor al determinado en este estudio.

Una ventaja que presentan estos péptidos frente a otros péptidos de esta clase, por ejemplo ante dermaseptina o melitina (Kustanovich *et al.* 2002, Perez-Paya *et al.* 1994) es que no son hemolíticos (Lomonte *et al.* 1999b), sin embargo, es importante estudiar y analizar como mejorar la selectividad de Appk y pEM-2, es decir que no sean citotóxicos contra las células normales pero que despliegan una potente acción ante las células tumorales.

El hecho de que la toxicidad de los péptidos variara según la línea celular evaluada ($p < 0.05$) (Fig. 8), podría basarse en que la discriminación puede estar relacionada con la composición lipídica de la membrana celular, es decir, fluidez, densidad de la carga negativa así como el potencial eléctrico transmembrana (Kustanovich *et al.* 2002).

En cuanto a este último punto, se ha desarrollado una probable teoría de discriminación ya que en contraste con las células eucarióticas normales, las cuales generalmente tienen bajos potenciales de membrana y cuya capa exterior consiste casi exclusivamente de fosfolípidos zwitteriónicos, las membranas celulares procarióticas y de células tumorales mantienen grandes potenciales transmembrana y tienen un alto contenido de fosfolípidos aniónicos en su capa exterior. Esta última propiedad permite que estos péptidos se unan a estas membranas celulares cargadas negativamente,

debido a su estructura anfipática, permitiendo así que muchos de estos péptidos catiónicos prefieran dañar las membranas procarióticas y tumorales ante las eucarióticas (Papo *et al.* 2002).

Además de la composición de las membranas celulares el estudio de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos como, composición, estructura tridimensional y la organización molecular en solución así como su interacción con las membranas celulares juega un papel muy importante tanto en la definición de la selectividad, así como en la elucidación del mecanismo mediante el cual estos péptidos ejercen su actividad hacia las células tumorales (Takeshima *et al.* 2002).

El mecanismo mediante el cual estos péptidos causan la muerte de las células todavía permanece incierto, sin embargo existen varios postulados en los que se considera que la asociación de los péptidos provoque el desarrollo de poros o canales a través de la membrana celular, por otro lado, también existe la posibilidad de que se de un recubrimiento de la membrana celular como especie de una alfombra mediante la cual se logra desestabilizar los lípidos contenidos en la membrana celular (Cruciani *et al.* 1991, Hung *et al.* 1999, Kustanovich *et al.* 2002).

Una posible vía mediante la cual estos péptidos antimicrobianos, como es el caso de tachyplesin y un derivado de magainina 2, muestran actividad antitumoral es por medio de la inducción de apoptosis (muerte celular programada) en las células tumorales. Este hecho se basa en que así como estos péptidos pueden interactuar con las membranas procariotas también pueden interactuar con la membrana mitocondrial de las células eucariotas (Chen *et al.* 2001, Takeshima *et al.* 2003); estudios recientes han indicado que la mitocondria juega un papel crítico en la regulación de apoptosis de las células eucariotas, por lo que las alteraciones de las mitocondrias resultan en

la liberación de proteínas como el citocromo c y Samc, las cuales son activadoras de caspasas, quienes a su vez son las disparadoras de la cascada apoptótica (Du *et al.* 2000, Li *et al.* 2000).

A pesar de que el mecanismo mediante el cual estos péptidos ejercen su actividad aún no está claro, lo que sí se conoce es que no existen diferencias de actividad entre los isómeros compuestos de aminoácidos D y los enantiómeros L, lo cual quiere decir que su mecanismo de acción no está mediado por la interacción de los péptidos con un blanco estereoespecífico, tales como proteínas receptoras o enzimas que sean reconocidas por los péptidos (Kustanovich *et al.* 2002, Santamaría *et al.*, datos no publicados).

Por otro lado, también se han estudiado péptidos compuestos tanto por aminoácidos D como con aminoácidos L. Papo *et al.* (2003) consideran que estos péptidos tienen mejor efecto que los compuestos formados solo por residuos D o L, ya que al reemplazar ciertos residuos D por L en péptidos con actividad lítica tanto para células normales como para células tumorales; como resultado estos péptidos perdieron su efecto citotóxico contra las células normales e incrementaron su capacidad de permeabilizar las membranas cargadas negativamente.

Parece ser concluyente en todos los estudios relacionados con las propiedades de estos péptidos catiónicos, la importancia de la carga e hidrofobicidad como los principales factores involucrados en la lisis de membranas celulares, así como la significancia del contenido aniónico de la membrana en la habilidad de los péptidos para inducir la lisis de la membrana celular (Hung *et al.* 1999, Zasloff 2002).

CONCLUSIONES

Ambos péptidos ejercen actividad citotóxica tanto hacia las líneas celulares tumorales como hacia las normales, es decir, que no hubo una selectividad marcada hacia las líneas celulares tumorales.

El péptido Appk resultó ser significativamente más tóxico que el pEM-2 contra las líneas celulares S180, EMT6 y C2C12.

La reproducción del efecto mitotóxico de la toxina intacta por parte del péptido Appk, así como la carga positiva adicional y la presencia de fenilalanina, podrían explicar el hecho de que Appk sea más tóxico que pEM-2 contra las líneas mencionadas anteriormente.

La línea celular de mieloma P3X resultó ser la más susceptible frente al péptido pEM-2, por lo que se espera que en el modelo tumoral murino *in vivo* exista una reducción tumoral significativa.

De los modelos tumorales desarrollados, únicamente en el modelo del carcinoma mamario EMT6 se produjo una reducción en el peso de la masa tumoral (28%), sin embargo esta no fue significativa.

A pesar de que la reducción no fue significativa, indica que es posible que al aumentar la frecuencia de las dosis del péptido se puede mantener una mayor concentración del péptido que esté en contacto con las células tumorales, lo cual podría favorecer una mayor reducción de las masas tumorales.

RECOMENDACIONES

En vista de que el modelo tumoral *in vivo* con el mieloma P3X no se desarrolló con éxito, sería un gran aporte a este estudio poder optimizar el modelo con el fin de evaluar el potencial anti-tumoral de pEM-2 sobre esta línea, ya que a nivel *in vitro* fue la línea más susceptible a este péptido.

Para futuros estudios sería recomendable probar distintas vías de administración del péptido en los modelos tumorales murinos, con el fin de optimizar aún más el modelo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, J.D. 1996. Biología molecular de la célula. Trad. M Dufort, M Llobera. 3 ed. Barcelona, ES. Omega. p. 1364.
- Allen, M; Rushton, N. 1994. Use of the CytoTox 96(TM) Assay in Routine Biocompatibility Testing *In Vitro*. Promega Notes Magazine 45: 07-11.
- Alexandrova, R; Alexandrov, I; Velcheva, M; Varadinova, T. 2000. Phytoproducts and cancer. *Experimental pathology and parasitology* 4:15-26.
- Arechabala, B; Coiffard, C; Rivalland, P; Coiffard, L; Roeck-Holtzhauer, Y. 1999. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay y LDH release. *Journal of Applied Toxicology*. 19:163-165.
- Arroyo, O; Rojas, G; Gutiérrez, JM. 1999. Envenenamiento por Mordedura de Serpiente en Costa Rica en 1996: Epidemiología y Consideraciones Clínicas. *Acta médica costarricense* 41:22-26.
- Baker, MA; Maloy, WL; Zasloff, M; Jacob, LS. 1993. Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides. *Cancer Research* 53(13):3052-3057.
- Bussolino, F; Rossi, M; Sica, A; Colotta, F; Ming, J; Bocchietto, E; Padura, I; Bosia, A; Dejana, E; Mantovani, A. 1991. Murine endotelioma cell lines transformed by polyoma middle t oncogene as target for and procedures or cytokines. *The Journal of Immunology* 147(7):2122-2129.
- Chaves, F; Alvarado, J; Aymerich, Solórzano, A. 1996. Aspectos básicos sobre las serpientes de Costa Rica. 3 ed. San José, C.R. Oficina de publicaciones de la Universidad de Costa Rica. 61p.
- Chen, HM; Wang, W; Smith, D; Chan, SC. 1997. Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1336(2):171-179.
- Chen, Y; Xu, X; Hong, S; Chen, J; Liu, N; Underhill, C; Creswell, K; Zhang, L. 2001. RGD-Tachyplesin Inhibits Tumor Growth. *Cancer Research*. 61: 2434-2438.

- Ching, S; Wang, W; Chan, S; Chen, H. 1999. Membrane Lysis by the Antibacterial Peptides Cecropins B1 and B3: A Spin-Label Electron Spin Resonance Study on Phospholipid Bilayers. *Biophysical Journal* 77(6): 3120-3133.
- Chippaux, J. 1998. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Health Organization* 76(5): 515-524.
- Chiu, S; Lung, W; Wang, W; Keith, D; Sheu, F; Min, H. 1998. Microscopic observations of the different morphological changes by anti-bacterial peptides on *Klebsiella pneumoniae* and HL-60 leukemia cells. *Cancer Research* 50(11):322-331.
- Cruciani, R; Barker, J; Zasloff, M; Chen, H. 1991. Antibiotic magainins exerts cytolytic against transformed cells lines through channel formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 3792-3796.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33–42.
- Fields, G.B., and R.L. Noble. 1990. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International Journal of Peptide Protein Research* 35:161-214.
- Florida Museum of Natural History. 2003. Herpetology (en línea). Florida, US. Consultado 2 feb. 2004. Disponible en: <http://www.flmnh.ufl.edu/natsci/herpetology/flguide/Agkistrodonppiscivorus.htm>.
- Gutiérrez, J.M; Lomonte, B. 1995. Phospholipases A₂ myotoxins from Bothrops snake venoms. *Toxicon* 33(11):1405-1424.
- Hancock, R; Chapple, D. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(6):1317-1323.
- Harris, J. 1991. Snake Toxins: Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. Ed. Harvey, A. Pergamon press. 91-130p.
- Hider, R; Karlsson, E; Namiranian, S. 1991. Snake Toxins: Separation and purification of toxins from snake venoms. Ed. Harvey, A. Pergamon press. 1-34 p.

- Howe, H; Wingo, P; Thun, M; Ries, L; Rosenberg, H; Feigal, E; Edwards, B. 2001. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *Journal of the National Cancer Institute* 93(11):824-842.
- Hu, Z; Garen, A. 2000. Intratumoral injection of adenoviral vectors encoding tumor-targeted immunoconjugates for cancer immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (16)97:9221–9225.
- Hung, S; Wang, W; Chan, S; Chen, M. 1999. Membrane Lysis by the Antibacterial Peptides Cecropins B1 and B3: A Spin-Label Electron Spin Resonance Study on Phospholipid Bilayers. *Biophysical Journal* 77(6):3120-3133
- Jennings, D; Hatton, N; Guo, J; Galons, J; Trouard, T; Raghunand, N; Marshall, J; Gillies, R. 2002. Early Response of Prostate Carcinoma Xenografts to Docetaxel Chemotherapy Monitored With Diffusion MRI. *Neoplasia*. 4(3):255 – 262.
- Kamysz, W; Okrój, M; Lukasiak, J. 2003. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochimica Polonica* 50:461-469.
- Kobayashi, H; Yagyu, T; Inagaki, K; Kondo, T; Suzuki, M; Kanayama, N; Terao, T. 2004. Bikunin plus paclitaxel markedly reduces tumor burden and ascites in mouse model of ovarian cancer. *International Journal of Cancer* 110(1):134-139.
- Kustanovich, I; Shalev, D; Mikhlin, M; Gaidukov, L; Mor, A. 2002. Structural requirements for potent versus selective cytotoxicity for antimicrobial dermaseptin S4 derivatives. *The Journal of Biological Chemistry* 277(19):16941-16951.
- Li, H., Kolluri, S. K., Gu, J., Dawson, M. I., Cao, X., Hobbs, P. D., Lin, B., Chen, G., Lu, J., Lin, F., Xie, Z., Fontana, J. A., Reed, J. C., and Zhang, X. 2000. Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* 289:1159–1164.
- Lomonte, B. & Gutiérrez, J.M. 1989. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 27:725-733.
- Lomonte, B; Tarkowski, A; Hanson, L. 1993. Host response to *Bothrops asper* snake venom: Analysis of Edema Formation, Inflammatory Cells, and Cytokine Release in a Mouse Model. *Inflammation* 17(2):93-105.

- Lomonte, B. 1994. Tissue damage and inflammation induced by snake venoms. PhD. Thesis. Göterbog, Sweden. University of Göteborg. 88p.
- Lomonte, B; Maccarana, M. 1994a. The interaction between heparins and myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ from Bothrops asper snake venom: relationship of binding to neutralization of cytotoxic action. *Journal of Biological Chemistry* 269:29867-29873.
- Lomonte, B., Moreno, E., Tarkowski, A., Hanson, L.A. & Maccarana, M. 1994b. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a Lys-49 phospholipase A₂ from Bothrops asper snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modelling. *Journal of Biological Chemistry* 269:29867-29873.
- Lomonte, B; Angulo, Y; Rufino, S; Cho, W, Giglio, J.P; Ohno, M; Daniele, J.J; Geoghegan, P; Gutiérrez, J.M. 1999a. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon* 37:145-158.
- Lomonte, B; Pizarro-Cerdá, J; Angulo, Y; Gorvel, J.P; Moreno, E. 1999b. Tyr→Trp-substituted peptide 115-129 of a Lys49 phospholipase A₂ expresses enhanced membrana-damaging activities and reproduces its in vivo myotoxic effect. *Elsevier* 1461:19-26.
- Lomonte, B; Angulo, Y; Calderón, L. 2003. An overview of Lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 43:885-991.
- Marshall, S; Arenas, G. 2003. Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Molecular Biology and Genetics* 6(3): 270-284.
- Mathews, C; Van Holde, K. 2002. *Bioquímica*. 3^a ed. Pearson Educación, McGraw-Hill Interamericana. México, DF. p.125.
- Mebis, D. 1998a. *Enzymes from Snake Venom: Enzymes in Snake Venoms*. Ed. Bailey, G. Aleken, Inc. Fort Collins, Colorado. p.1-11.
- Mebis, D. 1998b. *Enzymes from Snake Venom: Phospholipases A₂ that show Myotoxic Activity*. Ed. Bailey, G. Aleken, Inc. Fort Collins, Colorado. p. 451-480.

- Núñez, C., Angulo, Y. and Lomonte, B. (2001). Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A2 from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. *Toxicon* 39:1587-1594.
- Ohsaki, Y; Gazdar, A; Chen, H; Jonson, B. 1992. Antitumor activity of magainin analogues against human lung cancer cell lines. *Cancer Research* 52(13):3534-3538.
- Papo, N; Shahar, M; Eisenbach, L; Shai, Y. 2003. A Novel Lytic Peptide Composed of DL-Amino Acids Selectively Kills Cancer Cells in Culture and in Mice. *Journal of Biological Chemistry* 278(23):21018 - 21023.
- Páramo, L; Lomonte, B; Pizarro-Cerdá, J; Bengoechea, J; Gorvel, J.P. 1998. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom. *Europe Journal of Biochemistry* 253:452-461.
- Patel, R. 1998. Tour de paclitaxel: Biocatalysis for Semisynthesis. *Annual Review of Microbiology* 52:361-395.
- Perez-Paya, E; Houghten, R; Blondelle, S. 1994. Determination of the secondary structure of selected melittin analogues with different haemolytic activities. *Biochemical Journal* 299:587-591.
- Rojas, G; Gutiérrez, JM; Aymerich, R. 2001. El envenenamiento Ofídico en Centroamérica: Fisiopatología y tratamiento. San José, CR. Instituto Clodomiro Picado. p. 35.
- Rozek, T; Wegener, K; Bowie, J; Olver, I; Carver, J; Wallace, J; Tyler, M. 2000. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*: The solution structure of aurein 1.2. *Europe Journal of Biochemistry* 267:5330-5341.
- Sadeghi-Aliabadi, H; Ahmadi, A. 2000. Cytotoxicity and antitumor properties of a marine compound on cancer cells (Hesa-a). *Oncology* 13(2):55-61.
- Santamaría, C; Larios, S; Pizarro, J; Gorvel, JP; Bokarewa, M; Lomonte, B; Moreno, E. Bactericidal and anti-endotoxic properties of short cationic peptides derived from *Bothrops asper* myotoxin II, a snake venom Lys49 phospholipase A₂. **(En preparación)**.

- Schmitt-Sody, M; Strieth, S; Krasnici, S; Sauer, B; Schulze, B; Teifel, M; Michaelis, U; Naujoks, K; Dellian, M. 2003. Neovascular targeting therapy: paclitaxel encapsulated in cationic liposomes improves antitumoral efficacy. *Clinical Cancer Research* 9(6):2335-2341.
- Scott, M; Rosenberger, M; Gold, M; Finlay, B; Hancock, R. 2000. An α -Helical Cationic Antimicrobial Peptide Selectively Modulates Macrophage Responses to Lipopolysaccharide and Directly Alters Macrophage Gene Expression. *The Journal of Immunology* 165:3358-3365.
- Shiloh, Y. 2003. Atm and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature reviews of Cancer* 3:155-168.
- Start, M; Liu, K; Deber, C. 2002. Cationic hydrophobic peptides with antimicrobial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(11): 3585-3590.
- Takehima, K; Chikushi, A; Lee, K; Yonehara, S; Matsuzaki, K. 2003. Translocation of Analogues of the Antimicrobial Peptides Magainin and Buforin across Human Cell Membranes *Journal of Biological Chemistry* 278(2):1310-1315.
- Warrel, D; Fenner, P. 1993. Venomous bites and stings. *British Medical Bulletin* 49:423-439.
- Wilson, A. 1992. *Animal cell culture: Cytotoxicity and viability assays*. Ed. Freshney, R. Oxford University Press Inc, New York. p. 263-303.
- Winder, D; Gunzburg, W; Erfle, V; Salmons, B. 1998. Expression of antimicrobial peptide has an antitumour effect in human cells. *Biochemical and Biophysical research communications* 242(3): 608-612.
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organism. *Nature* 415:389-395.

ANEXOS

Anexo 1. Información general de las líneas celulares utilizadas en este estudio.

Línea celular	Nº ATCC	Órgano	Tipo de célula	Origen animal
B16	CRL- 6323	Piel	Melanoma	Murino
EMT6	CRL-2775	Pecho	Carcinoma	Murino
P3X	CRL-1580	Linfocitos B	Mieloma	Murino
S-180	TIB-66	Fibroblasto	Sarcoma	Murino
C2C12	CRL-1772	Músculo	Mioblasto	Murino
t-End*	-----	Capilares	Endotelio	Murino

*Esta línea de endotelio fue transformada con el virus de polioma por Bussolino et al. (1991).

Anexo 2. Presentación comercial de los péptidos Appk y pEM-2



Estos péptidos fueron sintetizados por la Compañía estadounidense Synpep.

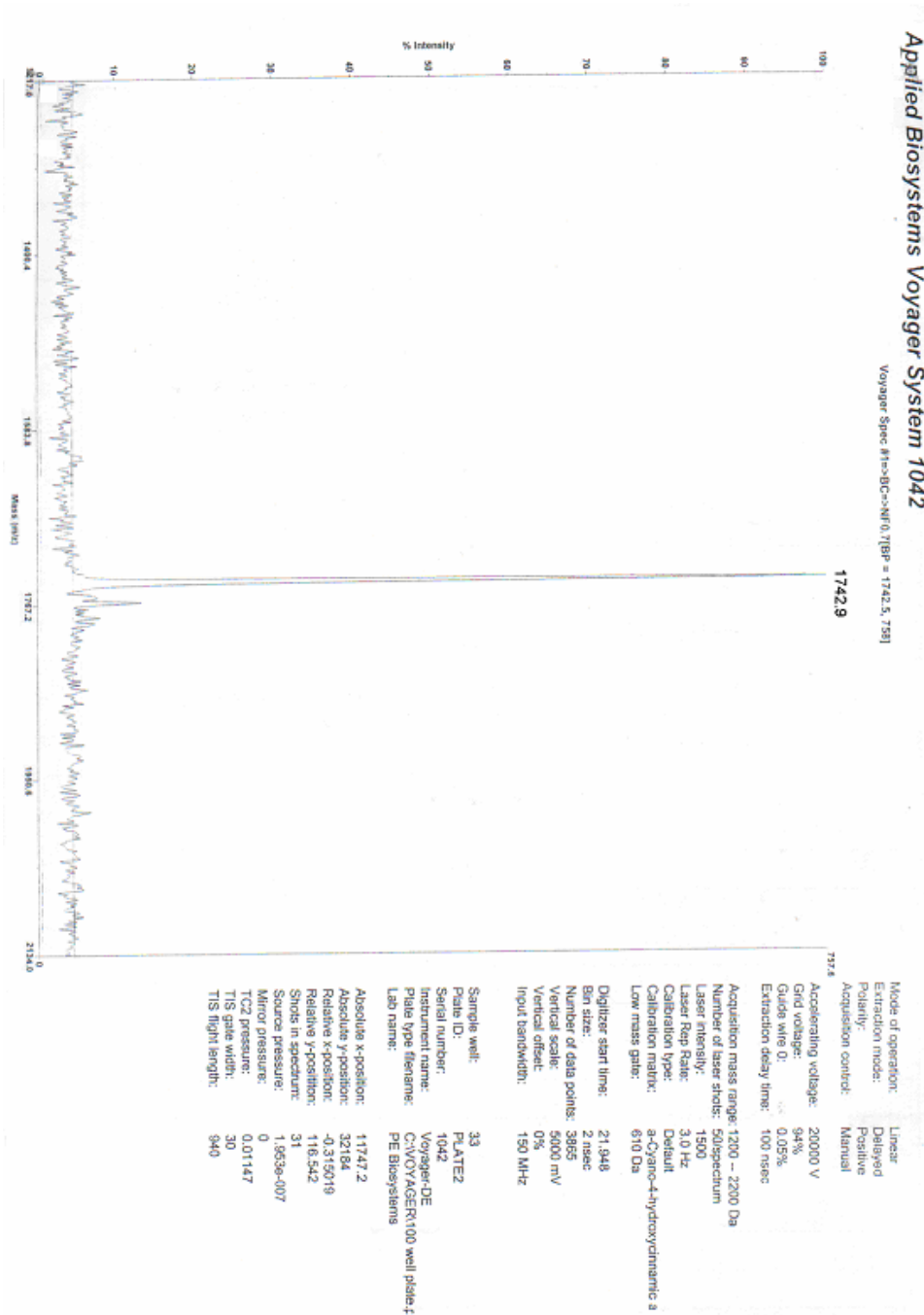
Anexo 3. Hoja de información general correspondiente al péptido pEM-2.



Peptide Data Sheet

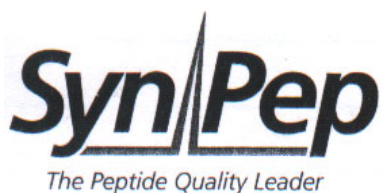
Order Name:	02-10-31-1-ICP
Sequence:	(d-K)-(d-K)-(d-W)-(d-R)-(d-W)-(d-W)-(d-L)- (d-K)-(d-A)-(d-L)-(d-A)-(d-K)-(d-K)
Theoretical Mass:	1742.2
Mass Found:	1742.9
Amount Delivered:	100.0 mg
HPLC Purity:	>95%
Date of Delivery:	12/10/2002
Solubility:	dissolve 1mg of peptide in 1ml of water
Appearance:	white powder
Lot number:	02IC10311
UV Trace:	confirmed
Sequence Confirmation:	NA
Peptide Content:	NA
Comments:	HPLC purified.

Anexo 4. Espectrometría de masas realizada para el péptido pEM-2.



El pico más grande corresponde a la masa del péptido, 1742.9 Daltons.

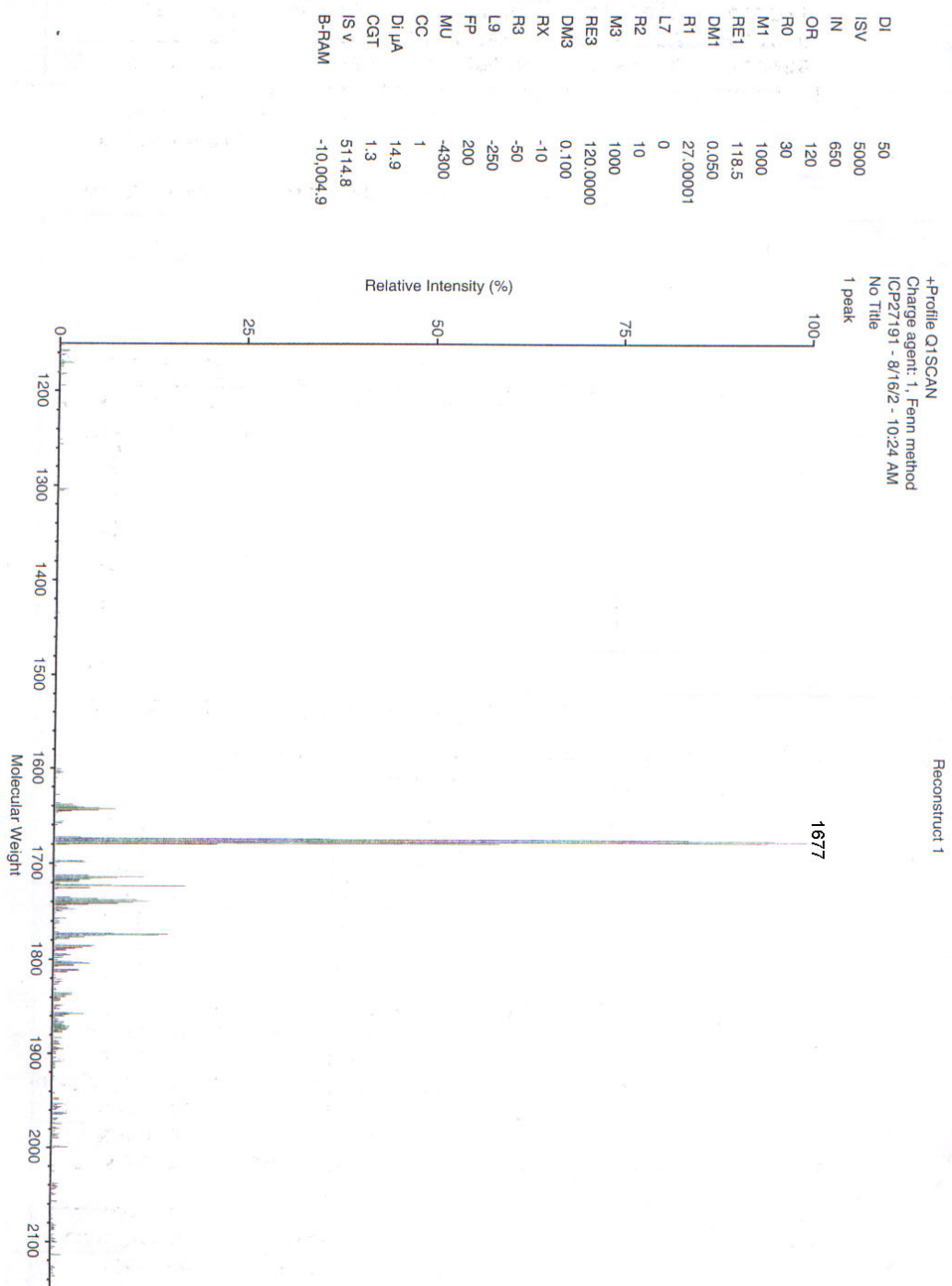
Anexo 5. Hoja de información general correspondiente al péptido Appk.



Peptide Data Sheet

Order Name:	02-7-19-1-ICP
Sequence:	(d-Lys)-(d-Lys)-(d-Tyr)-(d-Lys)-(d-Ala)-(d-Tyr) -(d-Phe)-(d-Lys)-(d-Leu)-(d-Lys)-(d-Cys)- (d-Lys)-(d-Lys)
Theoretical Mass:	1676.2
Mass Found:	1677.0
Amount Delivered:	16.0 mg
HPLC Purity:	>95%
Date of Delivery:	8/19/2002
Solubility:	Dissolve 1mg of peptide in 1ml of water
Appearance:	white fluffy powder
Lot number:	02IC7191
UV trace:	Confirmed
Peptide Content:	NA
Comments:	HPLC Purified.

Anexo 6. Espectrometría de masas realizada para el péptido Appk.



El pico más grande corresponde a la masa encontrada del péptido, 1677 Daltons.

Anexo 7. Manual de uso correspondiente al kit utilizado para medir la actividad de la enzima LDH (I parte).



LDH-P UNIII

AA

Método UV optimizado (SFBC) para la determinación de lactato deshidrogenasa (LDH) en suero o plasma

SIGNIFICACION CLINICA

La determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en suero, tiene una gran variedad de aplicaciones clínicas. En el caso del infarto agudo de miocardio (IAM), la actividad de LDH total (junto con las de CK y GOT) constituye un elemento importante de diagnóstico. La misma comienza a aumentar de 12 a 24 horas después de producido el infarto; alcanza un pico entre las 48 - 72 horas y permanece elevada hasta el séptimo o décimo día. Por otra parte, también se registra un aumento de la actividad de LDH total en pacientes con necrosis hepática (producida por agentes tóxicos o por infecciones agudas como la hepatitis viral) e incluso acompañando a necrosis tubular renal, pielonefritis.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Basado en el siguiente esquema de reacción:



Las concentraciones del ensayo están optimizadas de acuerdo a la Sociedad Francesa de Biología Clínica (SFBC).

REACTIVOS PROVISTOS

Buffer: solución de buffer Tris, pH 7,2 conteniendo piruvato y cloruro de sodio.

Sustrato: viales conteniendo NADH.

Concentraciones finales (según SFBC)

Tris	80 mM, pH 7,2
Piruvato	1,6 mmol/l
NADH	0,2 mmol/l
ClNa	200 mmol/l

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Buffer: listo para usar.

Sustrato: agregar el volumen de Buffer indicado en el rótulo a un vial de Sustrato. Tapar y agitar suavemente por inversión hasta disolución completa. Fechar.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Sustrato reconstituido: estable 21 días en refrigerador (2-10°C) o 3 días a temperatura ambiente a partir del momento de su reconstitución.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Cuando el espectrofotómetro ha sido llevado a cero con agua destilada, lecturas de absorbancia del Sustrato reconstituido inferiores a 0,800 D.O. o superiores a 1,800 D.O. (a 340 nm) son indicio de deterioro del mismo.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: se debe obtener suero de la manera usual y separar del coágulo dentro de las dos horas de su obtención. También puede usarse plasma.

b) Aditivos: en caso de que la muestra a emplear sea plasma, debe usarse heparina como anticoagulante.

c) Sustancias interferentes conocidas: las muestras con hemólisis visible o intensa pueden producir valores falsamente aumentados por lo que no deben ser usadas. Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: la muestra debe ser preferentemente fresca. La LDH es estable hasta 24 horas en refrigerador. No congelar.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Material volumétrico adecuado.
- Baño de agua a la temperatura indicada en el procedimiento a seguir.
- Cronómetro.

CONDICIONES DE REACCION

(Disminución de absorbancia)

- Longitud de onda: 340 nm (Hg 334 ó 366)
- Temperatura de reacción: 25, 30 ó 37°C. Ver los VALORES DE REFERENCIA correspondientes a cada temperatura.
- Tiempo de reacción: 3 minutos y 30 segundos.
- Los volúmenes de muestra y reactivo se pueden reducir proporcionalmente sin que varíen los factores de cálculo.

PROCEDIMIENTO

A) 25°C

En una cubeta mantenida a la temperatura de trabajo, colocar:

Sustrato reconstituido 3 ml

861227104 / 01 Pág. 1 de 4

El método se basa en la liberación de la enzima por las células dañadas debido a la acción del péptido sobre ellas. La actividad de la enzima se lee a 340 nm en un espectrofotómetro.

Anexo 8. Manual de uso correspondiente al kit utilizado para medir la actividad de la enzima LDH (II parte).

Preincubar unos minutos, luego agregar:	
Muestra	100 ul
Mezclar inmediatamente y disparar simultáneamente el cronómetro. Esperar 30 segundos. Leer la absorbancia inicial (ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO) y luego a los 1, 2 y 3 minutos de la primera lectura. Determinar la diferencia promedio de absorbancia/min ($\Delta A/\text{min}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos.	
B) 30-37°C	
I- MACROTECNICA	
Emplear 50 ul de Muestra, siguiendo el procedimiento indicado en A).	
II- MICROTECNICA	
Emplear 20 ul de muestra y 1,0 ml de Sustrato reconstituido siguiendo el procedimiento indicado en A).	

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{LDH (U/l)} = \Delta A/\text{min} \times \text{factor}$$

En cada caso deberá emplearse el factor de cálculo correspondiente de acuerdo a la temperatura de reacción seleccionada (30-37°C o 25°C) y a la técnica empleada (micro o macro-técnica) como se indica en la siguiente tabla de factores:

Temp. L. onda	25°C	30-37°C	
		I	II
340 nm	4.921	9.683	8.095
334 nm	5.016	9.871	8.253
366 nm	9.118	17.941	15.000

VALORES DE REFERENCIA

Temperatura	25°C	30°C (*)	37°C (*)
Valores (U/l)	120-240	160-320	230-460

(*) Calculados

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.
- Absorbancia inicial baja: cuando una vez agregado el suero, la primera lectura (tiempo 0) es inferior a 0,800 D.O. estando el sustrato en condiciones, indica una muestra con muy alta actividad de LDH (que consume NADH aún antes de esta lectura). En este caso, repetir la determinación con muestra diluida 1/10 con solución fisiológica y multiplicar el resultado por la dilución efectuada.
 - La humectación es causa de deterioro del Sustrato.

PERFORMANCE

- a) **Reproducibilidad:** procesando simultáneamente repli-

861227104 / 01 Pág. 2 de 4

cados de una misma muestra, se obtienen los siguientes valores:

Nivel	D.S.	C.V.
438 U/l	$\pm 5,14$ U/l	1,17 %
683 U/l	$\pm 7,99$ U/l	1,17 %

b) **Límite de detección:** depende del espectrofotómetro empleado y de la longitud de onda. De acuerdo con la sensibilidad requerida, en espectrofotómetro a 340 nm (Hg 334 ó 366), con cubetas de caras paralelas de 1 cm de espesor, reproducibilidad ± 2 nm, luz espuria $\leq 0,5\%$ y semiancho de banda ≤ 8 nm, para un $\Delta A/\text{min}$ de 0,001, el mínimo cambio de actividad detectable será de 5 U/l (a 340 nm y a 25°C).

c) **Rango dinámico:** el rango útil de lectura se extiende hasta 0,200 D.O. $\Delta A/\text{min}$ (a 340 nm y 25°C). Si la $\Delta A/\text{min}$ es superior a 0,200 D.O. (340-334 nm y 25°C) o 0,100 D.O. (366 nm y 25°C), repetir la determinación con muestra diluida 1/5 ó 1/10 con solución fisiológica, corrigiendo consecuentemente los resultados.

PARAMETROS PARA ANALIZADORES AUTOMATICOS

Longitud de onda primaria	340 nm
Longitud de onda secundaria (bicromática)	380 nm
Tipo de reacción	cinética
Dirección de la reacción	disminuye
Temperatura de reacción	37°C
Relación muestra/reactivo	1:50
Tiempo de equilibrio	3 segundos
Tiempo de retardo	40 segundos
Tiempo de lectura	60 segundos
Absorbancia de blanco	> 0,700 D.O.
Límite de absorbancia	2,000 D.O.
Valor normal inferior	230 U/l
Valor normal superior	460 U/l
Linealidad	1000 U/l
Factor (paso de luz 1 cm)	8.095
Coef. extinción molar (ϵ_{340})	$6,3 [l \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$

Para las instrucciones de programación consulte el manual del usuario del analizador en uso.

PRESENTACION

- 3 x 20 ml (Cód. 1521303).

BIBLIOGRAFIA

- Société Française de Biologie Clinique (SFBC) - Ann. Biol. Clin. 40:160, 1982.
- Sociedad Española de Química Clínica - Comité Científico, Comisión de Enzimas - Quím. Clin. 57-61, 1989.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACCC Press, 3rd ed., 1990.

Elaborado por:
Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Inscripto M.S.
Disp. N°: 3330/97
Cart. N°: 2114/97

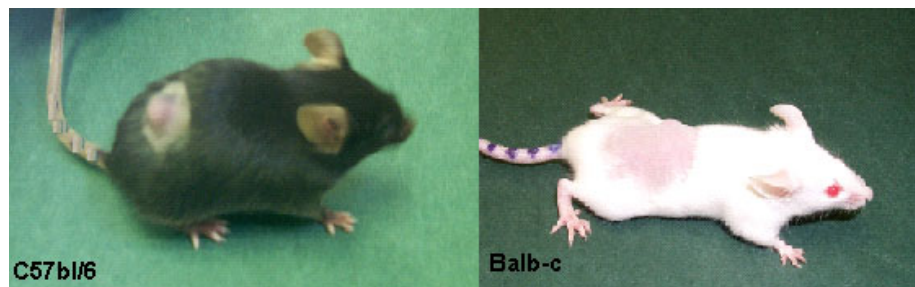


Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina

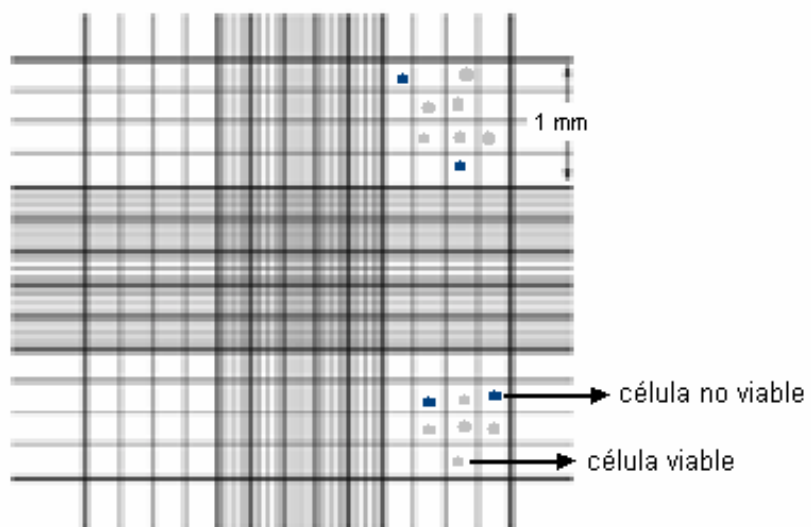
El método se basa en la liberación de la enzima por las células dañadas debido a la acción del péptido sobre ellas. La actividad de la enzima se lee a 340 nm en un espectrofotómetro.

Anexo 9. Cepas de ratones utilizados en los modelos tumorales in vivo.



Para poder realizar la inoculación de las células B16 y EMT6 de manera subcutánea, se tuvo que rasurar el lomo de los ratones.

Anexo 10. Diagrama de un hemocitómetro de Neubauer.

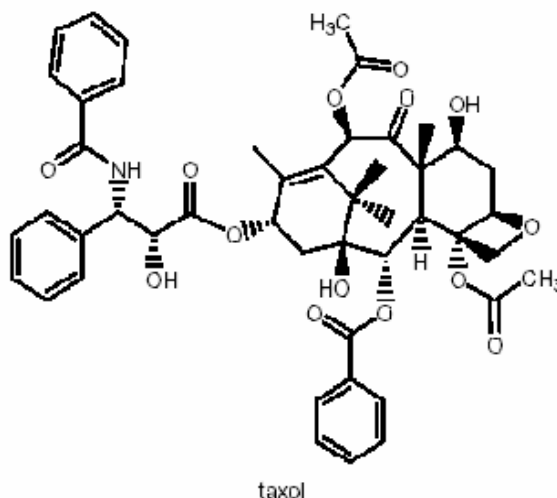


Las células se tiñen con colorante azul tripán el cual es absorbido por las células muertas de manera que se pueden distinguir de las células viables.

Anexo 11. Características generales del paclitaxel.

Nombre genérico	Paclitaxel
Descubrimiento	1962
Fórmula empírica	C ₇ H ₅₁ NO ₁₄
Peso Molecular	853,9
Propiedades físico-químicas	Altamente lipofílico, insoluble en agua y es estable entre 20-25°C
Origen	Natural, del árbol <i>Taxus brevifolia</i>
Mecanismo de acción	Agente antimicrotúbulo que promueve el ensamblamiento de los microtúbulos, lo cual resulta en una reorganización esencial para las funciones de la mitosis celular, detiene la proliferación incontrolada de las células tumorales.
Actividad	Cáncer de mama, pulmón, ovario, próstata.
Efectos adversos	Cardiovascular, dermatológico, gastrointestinal, hematológicos, hepático, embiotóxico y fetotóxico
Dosis	Depende del paciente

Fórmula estructural



Esta droga constituye un agente anti-tumoral ampliamente utilizado como tratamiento de distintas clases de tumores.

