RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Pastrián, María Belén

Investigación y desarrollo de péptidos antiproliferativos con actividad antitumoral y antimicrobiana aumentada : ¿futuros péptidos terapéuticos?

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Pastrián, M. B. (2018). Investigación y desarrollo de péptidos antiproliferativos con actividad antitumoral y antimicrobiana aumentada: ¿futuros péptidos terapéuticos? (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/915

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad
Nacional
de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Pastrián, María Belén, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
Noviembre de 2017, 136 pp.,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencia y Tecnología

Investigación y desarrollo de péptidos antiproliferativos con actividad antitumoral y antimicrobiana aumentada: ¿Futuros péptidos terapéuticos?

TESIS DOCTROAL

María Belén Pastrián

mbpastrian@gmail.com

Resumen

Los péptidos y proteínas son moléculas fundamentales en los organismos vivos. Las proteínas son “herramientas moleculares” a través de las cuales se codifica la información genética generando tejidos a la par que les confiere funcionalidad. Los péptidos son cadenas de aminoácidos de menos de 100 unidades y son en su mayoría hormonas, neuromoduladores y neurotransmisores. En conjunto, ambas familias de compuestos son responsables de la mayoría de los procesos biológicos que ocurren en organismos superiores dado que numerosas respuestas orgánicas comienzan por una interacción péptido-proteína, proteínaproteína o sacárido-proteína.

El presente trabajo trata sobre el estudio de diferentes péptidos sintéticos y sus posibles usos biomédicos, empleándose nuevas estrategias de síntesis, mejoramiento de su actividad y el análisis de su aplicación in vitro.

Departamento de Ciencia y Tecnología

Laboratorio de Oncología Molecular

Tesis de Doctorado

2017

"Investigación y desarrollo de péptidos antiproliferativos con actividad antitumoral y antimicrobiana aumentada":

¿Futuros péptidos terapéuticos?

Autor: Lic. María Belén Pastrian

Director: Dr. Hernán G. Farina

Co-Director: Prof. Dr. Fernando Albericio

Para optar al grado de

DOCTORA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

A mis hermanas Cecilia y Mayra

A mis padres Eugenio y Graciela

A mi mentora Nancy

AGRADECIMIENTOS

La realización de un trabajo de investigación como es un Doctorado engloba mucho más que una especialización en una temática en particular. Es un camino de descubrimientos no solo científicos sino personales. Se trata de un pasaje acelerado de intensas vivencias, momentos de turbulencia y de calma, de desánimo y esplendor, de felicidad y angustia, todo esto a mí me ayudo a buscar y encontrar el equilibrio. A entender que "todo pasa".

Agradecer a cada una de las personas que nombro, resulta especial para mí, porque sin ellos este momento no sería una realidad cierta y porque cada uno de ellos, de una u otra manera me han enseñado vivencias que tengo presentes cada día de mi vida.

En primer lugar: a mi familia, particularmente a mi madre Graciela, a mi padre Eugenio, a mis hermanas Mayra y Cecilia, a mi hermano-cuñado Alejandro, por ser parte, por el apoyo incondicional, por los consejos, por la paciencia ante mis "berretines" y por la fe en mí, aunque por momentos yo misma la perdía.

A mi mentora, compañera y amiga Nancy Beatriz Iannucci, a quien espero volver a encontrar algún día.

A Daniel Alonso por quien siento una enorme admiración y orgullo de haberlo tenido como profesor. El Dr. Alonso dejó una impronta en mi carrera y en la decisión de elegir este tramo de la investigación.

A mi amigo del alma, Fernando Benavent, por los recreos y las "largas caminatas". Por contenerme en mis momentos más vulnerables y ser el más crítico conmigo.

A Vivians, por compartir hermosos momentos de amistad.

A Hernán Farina, por ponerse a la espalda esta Tesis en un momento muy crítico. Se lo agradezco de todo corazón.

Al equipo del Laboratorio de Oncología de la Universidad Nacional de Quilmes.

A Fernando Albericio y a su eficiente equipo, por la enriquecedora experiencia de enseñarme a trabajar y "ser equipo" … A Brunello y Carolina por los bellos momentos vividos en Barcelona.

A Fanny Guzmán, entusiasta investigadora: por recibirme en su casa y en su laboratorio, y a Roberto por el trabajo realizado en conjunto.

Al Equipo del Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, particularmente a Rodrigo por ayudarme pacientemente con los ensayos.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Los resultados presentados en la Tesis forman parte de las siguientes publicaciones científicas:

I. **Structure-activity relationship of 1-desamino-8-D-arginine vasopressin as an antiproliferative agent on human V2 receptor-expressing cancer cells. (2014).** María B. Pastrian, Fanny Guzmán, Juan Garona, Marina Pifano, Giselle V. Ripoll, Osvaldo Cascone, Graciela N. Ciccia, Fernando Albericio, Daniel E. Gómez, Daniel F. Alonso and Nancy B. Iannucci. *Mol. Med. Rep.* 9:2568-72.

II. **Biological activity of antibacteria peptides matches synergism between electrostatic and non-electrostatic forces. (2014).** Ana Bouchet, Nancy B Iannucci, María Belén Pastrian, Osvaldo Cascone, Nuno C. Santos, Edgardo Anibal Disalvo and Axel Hollmann. *Colloid Surface B,* 114: 363-71.

III. **The novel desmopressin analog [V^{4}Q^5]dDAVP inhibits angiogenesis, tumor growth and metastasis in V2 receptor-expressing breast cancer models. (2015).** Juan Garona, Marina Pifano, Ulises D Orlando, Maria B Pastrian, Nancy B Iannucci, Hugo H Ortega, Ernesto J Podesta, Daniel E Gomez, Giselle V Ripoll and Daniel F Alonso. *International Journal of Oncology*, 46: 2335-2345.

IV. **Enhanced antimicrobial activity of a peptide derived from human lysozyme by arylation of its tryptophan residues**. **(2016)**. Rodrigo González, Lorena Mendive-Tapia, María B. Pastrian, Fernando Albericio, Rodolfo Lavilla, Osvaldo Cascone y Nancy B. Iannucci. Journal of Peptide Science.

V. **Addition of vasopressin synthetic analogue [V^{4}Q^5]dDAVP to standard chemotherapy enhances tumour growth inhibition and impairs metastatic spread in aggressive breast tumour models. (2016).** Juan Garona, Marina Pifano, Maria B. Pastrian, Daniel E. Gomez, Giselle V. Ripoll, Daniel F. Alonso. Clinical & Experimental Metastasis – Springer.

Los resultados presentados en la Tesis forman parte de los siguientes congresos nacionales e internacionales.

I. Iannucci, N., González, R., Pastrian, M., Mendive-Tapia, L., Cascone, O., Albericio, F. y Lavilla, R. Enhanced anti-staphylococcal activity by tryptophan arylation of a nonapeptide derived from lysozyme. 33rd European Peptide Symposium, 31 de agosto al 5 de septiembre, 2014, Sofía, Bulgaria.

II. Pifano, M., Garona, J., Pastrian, M., Iannucci, N., Gómez, D., Alonso, D. y Ripoll, G. Acción antitumoral de análogos de peptídicos de vasopresina (AVP) sobre una línea de cáncer pulmonar humano con características neuroendócrinas. LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, 20 al 23 de noviembre de 2013. Mar del Plata, Bs As, Argentina.

III. Garona, J., Pifano, M., Pastrian, B., Iannucci, N., Gómez, D., Alonso, D. y Ripoll, G. Efectos sobre la colonización metastásica pulmonar de distintos esquemas de administración del compuesto hemostático desmopresina (DDAVP) en un modelo preclínico de cáncer mamario. LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, 20 al 23 de noviembre de 2013. Mar del Plata, Bs As, Argentina.

IV. Iannucci, N., Pastrian, M., Guzmán, F., Ripoll, G., Garona, J., Pifano, M., Cascone, O., Ciccia, G., Albericio, F., Gómez, D. y Alonso, D. Structure-antiproliferative activity relationship study of an improved analog derived from Desmopressin ([V^4Q^5]dDAVP). 23rd American Peptide Symposium, 22 al 27 de junio de 2013, Hawaii, EEUU.

V. Pifano, M., Garona, J., Pastrian, M., Iannucci, N., Cascone, O., Gomez, D., Alonso, D. y Ripoll, G. Key aminoacidic positions for desmopressin (dDAVP) antiproliferative effect assessed by ala-scanning. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB 2012). 29 de octubre al 1 de noviembre de 2012, Mendoza, Argentina.

VI. Pastrian, M., Guzmán, F., Ripoll, G., Garona, J., Pifano, M., Cascone, O., Ciccia, G., Albericio, F., Gómez, D., Alonso, D. y Iannucci, N. Improved antiproliferative activity of desmopressin analogs assessed by Ala-scanning. 32nd European Peptide Symposium, 2 al 7 de septiembre de 2012. Atenas, Grecia.

VII. Iannucci, N., Ripoll, G., Pastrian, M., Garona, J., Cascone, O., Ciccia, G., Gómez, D. y Alonso, D. Enhanced hydrophobicity at the loop of desmopressin improves its antiproliferative activity. 22nd American Peptide Symposium, 25 al 30 de junio de 2011. San Diego, California, USA.

Contenido

1 Introducción: 1

1.1 Neuropéptidos: 2

1.2 Péptidos Terapéuticos en la Industria: 5

1.2.1 Diseño racional de péptidos terapéuticos 8
1.2.2 Síntesis de péptidos: 10
1.2.3 Métodos de obtención de péptidos a escala industrial: 14

1.3 Aplicaciones de los péptidos: péptidos antimicrobianos y antiproliferativos 17

1.3.1 Péptidos en oncología: 17
1.3.2 Relación entre péptidos antimicrobianos y péptidos anticáncer 23

2 Capítulo I: 26

Investigación y desarrollo de péptidos antiproliferativos, análogos de Desmopresina (dDAVP). 26

2.1 Introducción: 26

2.1.1 Estructura y función de la Vasopresina: 26
2.1.2 Estructura del receptor V2: 28
2.1.3 Interacción de V2R y AVP: 29
2.1.4 Desmopresina; estructura y función: 30
2.1.5 Análisis estructural de AVP: 36
2.1.6 Estabilidad de péptidos: 37

2.2 Objetivos: 40

2.3 Materiales y métodos: 41

2.3.1 Síntesis de péptidos: 41
2.3.2 Purificación y cuantificación de los péptidos: 42
2.3.3 Caracterización de péptidos: 42
2.3.4 Técnica Tea-Bag: 43
2.3.5 Técnica Ala-scanning: 43
2.3.6 Análisis Conformacional por dicroísmo circular (CD): 45
2.3.7 Ensayo de estabilidad: 45
2.3.8 Condiciones de cultivo y líneas celulares: 46
2.3.9 Ensayos de crecimiento in vitro: 46

2.4 Resultados y discusión: 47

2.4.1 Identificación de residuos clave en dDAVP: 47
2.4.2 Actividad antiproliferativa de un análogo de dDAVP: 49
2.4.3 Dicroísmo circular de dDAVP y sus análogos [Val^4]dDAVP y [Val^{4}Gln^5]dDAVP 51
2.4.4 Estabilidad de dDAVP y su análogo [Val^{4}Gln^5]dDAVP 52

2.5 Conclusiones: 56

3 Capítulo II: 57

Síntesis y aplicación de derivados arilados del triptófano en el desarrollo de compuestos antimicrobianos nóveles. 57

3.1 Introducción: 57

3.1.1 Péptidos antimicrobianos: 57
3.1.2 Modo de acción de los péptidos antimicrobianos: 59
3.1.3 Péptidos antimicrobianos catiónicos como agentes citotóxicos para el tratamiento del cáncer: 63
3.1.4 La lisozima: 66

3.2 Objetivos: 71

3.3 Materiales y métodos: 72
3.3.1 Síntesis de triptófanos modificados. Síntesis de Fmoc-2-ariltriptofanos: 72
3.3.2 Síntesis de [$K^{108}W^{111}$] 107-115 hLZ con Fmoc-2-ariltriptofano: 73
3.3.3 Purificación, cuantificación y caracterización de los péptidos: 73
3.3.4 Caracterización de los péptidos: 73
3.3.5 Ensayos antibacterianos: 73
3.3.6 Microscopia electrónica: 74
3.3.7 Ensayos hemolíticos: 75

3.4 Resultados y discusión: 76

3.5 Conclusiones y perspectivas: 82

4 Capítulo III: 84

Puesta a punto de la técnica de electroforesis en geles 2D y análisis proteómico de células tratadas con un péptido modelo proapoptótico CIGB-300. 84

4.1 Introducción: 84
4.1.1 Utilidad de la proteómica: 84
4.1.2 Descripción y actividad del péptido CIGB-300: 87
4.1.3 Proteína quinasa CK2: 89
4.1.4 La Nucleolina: 91

4.2 Objetivos: 94

4.3 Materiales y métodos: 95
4.3.1 Péptido: 95
4.3.2 Cultivo celular y tratamiento: 95
4.3.3 Extracción de proteínas nucleares: 95
4.3.4 Cuantificación proteica: 96
4.3.5 Electroforesis bidimensional (2-DE): 96
4.3.6 Visualización proteica y análisis de imágenes 2-DE: 99
4.3.7 Digestión en gel con tripsina: 99

4.4 Resultados: 100
4.4.1 Identificación de blancos moleculares modificados a partir del tratamiento con CIGB-300: 100

4.5 Conclusión: 103
4.5.1 Modelo propuesto: 104

5 Capítulo IV: 105

Conclusiones y perspectivas generales: 105

6 Bibliografía: 106

1 Introducción:

Los péptidos y proteínas son moléculas fundamentales en los organismos vivos. Las proteínas son "herramientas moleculares" a través de las cuales se codifica la información genética generando tejidos a la par que les confiere funcionalidad. Los péptidos son cadenas de aminoácidos de menos de 100 unidades y son en su mayoría hormonas, neuromoduladores y neurotransmisores. En conjunto, ambas familias de compuestos son responsables de la mayoría de los procesos biológicos que ocurren en organismos superiores dado que numerosas respuestas orgánicas comienzan por una interacción péptido-proteína, proteína-proteína o sacárido-proteína.

En décadas anteriores, aproximadamente llegando a los años 60, se consideraba a los péptidos como potenciales candidatos a drogas, pero debido a dificultades en el proceso de obtención de efectivos ingredientes farmacéuticos activos (active pharmaceutical ingredients: APIs), el desarrollo de éstos quedo aletargado. Sin embargo, en la actualidad, se retoma el interés por dichos péptidos como agentes terapéuticos debido a los grandes avances en las tecnologías.

Estos avances incluyen el perfeccionamiento de métodos de síntesis de proteínas y el desarrollo y mejoramiento de equipos tales como cromatógrafos, sintetizadores, espectrómetros y los programas informáticos. También se debió a la enorme capacidad de investigadores para desarrollar nuevas estrategias moleculares como el diseño de sistemas de delivery de drogas.

Por tanto y debido a los magnos progresos tecnológicos en la manipulación de péptidos y evaluación analítica, se está estableciendo una nueva "omica", la peptidómica, definida como la disciplina que estudia la variedad de péptidos y sus actividades. Esta joven disciplina tiene como objetivo analizar de manera integral el espectro de péptidos que se encuentran en cualquier organismo elegido.

El presente trabajo trata sobre el estudio de diferentes péptidos sintéticos y sus posibles usos biomédicos, empleándose nuevas estrategias de síntesis, mejoramiento de su actividad y el análisis de su aplicación *in vitro*.

1.1 Neuropéptidos:

El vocablo "neuropéptido" no es nuevo, la acepción del término es de larga data. El descubrimiento de los neuropéptidos se basa en la revolucionaria investigación en fisiología, endocrinología y bioquímica durante el siglo pasado y ha sido construida sobre tres ideas principales: (1) las hormonas peptídicas son señales químicas en el sistema endocrino, (2) la neurosecreción de péptidos es un principio general en el sistema nervioso, y (3) el sistema nervioso es sensible a las señales de péptidos. Como define el Profesor J. Peter H. Burbach *"Neuropéptidos son pequeñas sustancias proteínicas producidas y liberadas por las neuronas a través de la ruta secretora regulada y que actúa sobre sustratos neurales*" [Burbach, J.P., 2011]. En la antigüedad, se creía que los órganos de los animales, incluidos los del hombre, podrían afectar el cuerpo y la mente cuando son ingeridos.

Más tarde, indagaron sistemáticamente extractos de órganos por sus efectos en los sistemas fisiológicos y se toparon con sustancias tales como la secretina, la insulina, vasopresina y oxitocina detectando actividades biológicas en extractos crudos, mediante bioensayos en animales enteros o sistemas de órganos [Murphy, D. y Gainer, H., 2016].

Los péptidos oxitocina y vasopresina fueron los primeros neuropéptidos descubiertos e identificados químicamente [Du Vigneaud, V. y col., 1953]. Estos poseen una alta homología estructural, aunque se producen en neuronas diferentes, tienen actividades fisiológicas disimiles con dos linajes moleculares: la línea isotocina-mesotocina-oxitocina asociada con las funciones reproductivas y la línea vasotosina-vasopresina principalmente involucrada en el equilibrio hidroelectrolítico [Hoyle, C., 1998].

Los neuropétidos se forman en los ribosomas del soma neuronal como porciones integras de grandes moléculas proteicas. Las moléculas proteicas penetran a continuación en los espacios existentes en el retículo endoplásmico del soma y posteriormente en el aparato de golgi, donde suceden dos cambios. En primer lugar, la proteína formadora de neuropétidos sufre una escisión enzimática en fragmentos más pequeños, algunos de los cuales son el propio neuropéptido o un precursor. En segundo lugar, el aparato de Golgi introduce el neuropéptido en minúsculas vesículas transmisoras que se liberan hacia el citoplasma, viajando a una velocidad de tan solo unos pocos centímetros al día. Finalmente, estas vesículas vierten su contenido en los terminales neuronales como respuesta a los potenciales de acción, al igual que las pequeñas moléculas transmisoras [Mains, R. y Eipper B., 1999].

Los neuropéptidos son moléculas omnipotentes que están presentes en los tejidos en concentraciones mucho más bajas que los neurotransmisores clásicos, y ocasionan acciones mucho más duraderas [Burbach, J.P., 2011].

A mediados de los 80' se establece que una variedad de péptidos biológicamente activos está presente tanto en el Sistema Nervioso Central (SNC) como en órganos internos y tejidos. Se pueden distinguir varias familias entre estos péptidos a partir de su homología estructural y una serie de actividades farmacológicas y fisiológicas similares (tabla 1).

Tabla 1: Clasificación y función de algunos neuropéptidos:

Familias	Neuropétido	Actividad Biológica	N° aa	Cita
Factores Liberadores Hipotalámicos	Hormona liberadora de corticotropina (CRH)	Involucrada en la respuesta al estrés, activa la secreción hipofisaria de ACTH (hormona adrenocorticotropa)	41	Grammatopoulos, D. y Chrousos G. 2002
	Hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH)	Estimula la producción de la hormona de crecimiento por la glándula pituitaria	44	Czikora, I. y col, 2014
	Hormona liberadora de	Estimula la liberación de gonadotrofina por parte de la	10	Osugi, T. y col, 2014. Perrett, R. y

	Gonadotropina (GnRH)	adenohipófisis		McArdle, C. 2013.
	Hormona inhibidora de la hormona de crecimiento (GHIH) o somatostatina	Regula la glucemia, e inhibe la secreción de insulina y glucagón.	14 o 28	Shimon, I. y Melmed, S. 1997.
	Hormona liberadora de tirotropina (TRH)	Estimula la liberación de tirotrofina (TSH) y prolactina desde células de la glándula pituitaria	3	Gershengorn, M. 1982.
Hormonas pituitarias	Hormona adrenocorticotropica (ACTH)	Estimula la secreción de glucocorticoides tales como el cortisol.	39	May, M. y Carey, R. 1985.
	Hormona estimulante de α-melanocitos (αMSH)	Regula el equilibrio metabólico, la disminución de la ingesta de alimentos, el aumento de flujo de salida simpático y la función hipotalámica/pituitaria.	13	Hill, C. y Dunbar J. 2002.
	Endorfina	Agonista de los receptores opioides, tiene efectos analgésicos.	31	Loh, H., Tseng, L., Wei E. y Lit C. 1976.
Péptidos neuro-hipofisarios	Oxitocina	Se desempeña en la neuroanatomía de la intimidad, en la reproducción sexual, en el parto, en la estimulación de los pezones y en la lactancia.	9	Kosfeld, M. y col, 2005 Du Vigneaud, V., 1953
	Vasopresina	Regula la retención de agua del riñón. Aumenta la resistencia vascular periférica, aumenta la presión sanguínea arterial. Clave en la homeostasis.	9	Robertson, G. y col, 1976
Péptidos del cerebro	Colecistokinina (CCK)	Media procesos fisiológicos; la digestión y la saciedad.	8	Micale, V. y col, 2014
	Gastrina	Estimula la secreción de ácido gástrico del estómago y ayuda en la motilidad gástrica.	14, 17 34	Gregory, H. y col, 1964
	Péptido liberador de gastrina (GRP)	Estimula la liberación de gastrina de las células T del estómago.	27	Spindel, E. y col, 1984
	Motilina	Control de las contracciones migratorias inter-digestivas. Estimula la liberación endocrina del páncreas.	22	Phillis, J. y Kirkpatrick, J. 1980
	Neurotensina	Regula la hormona luteinizante y la liberación de prolactina y tiene interacción con el sistema	13	Carraway, R. y Leeman, S. 1973.

		dopaminérgico.		
	Taquicininas	Induce la contracción del tejido intestinal.	10, 11, 36	Maggio, J., 1994.
	Bradikinina	Dilata los vasos sanguíneos.	9	Elliott, D., 1960
Péptidos opiáceos	Dinorfina	Tiene efectos analgésicos.	17	Chavkin, C., 1982
	Leu-encefalina y Met-encefalina	Analgesia y euforia	5	Belluzzi, J. 1977.
Neuronal y endocrino	Péptido Natriuretico Atrial (ANP)	Efecto vasodilatador. Control del homeostasis. Contrarresta los aumentos en la presión arterial y el volumen.	45	Tan, A. y col, 2012
	Péptido liberador del gen de la calcitonina (CGRP)	Vasodilatador. Actúa en la transmisión del dolor, en la homeostasis cardiovascular y la nocicepción.	37	O'halloran, D. 1991
	Péptido intestinal vasoactivo (VIP)	Induce relajación del músculo, estimula la secreción de agua en el jugo pancreático y bilis, e inhibe la secreción de ácido gástrico.	28	Larsson, L. y col, 1976
Neuronales	Galanina	Modula e inhibe potenciales de acción en las neuronas, la nocicepción, la regulación del sueño, la cognición, la alimentación, la regulación del ánimo y la presión arterial.	29 o 30	Tatemoto, K. y col, 1983
	Neuropéptido Y	Incrementa la ingesta de alimentos.	36	Tatemoto, K. y col, 1982
	Péptido YY	Inhibe la motilidad gástrica e incrementa la absorción de agua y electrólitos en el colon. Reduce el apetito. Incrementa la eficiencia de la digestión y la absorción de nutrientes.	36	Tatemoto, K. y col, 1982

1.2 Péptidos Terapéuticos en la Industria:

Los péptidos tienen características que los convierten en posibles futuras drogas para el tratamiento de algunas enfermedades; estos son altamente selectivos y eficaces, y al mismo tiempo relativamente seguros y bien tolerados [Thundimadathil, J., 2013]. En consecuencia, existe un mayor interés en péptidos en el área de investigación y desarrollo (I+D) farmacéutico, donde actualmente

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

muchos agentes terapéuticos peptídicos están siendo evaluados en ensayos clínicos.

Las principales enfermedades en las que se utilizan actualmente fármacos peptídicos son las enfermedades metabólicas y el cáncer. La primera se caracteriza por el crecimiento epidémico en la obesidad y la diabetes tipo 2; la segunda por una mortalidad creciente y la necesidad de reemplazo o modificación de la quimioterapia [Fosgerau, K y Hoffmann, T., 2014].

La baja disponibilidad de nuevas drogas aprobadas por la industria farmacéutica y el incremento en la demanda del mercado conduce a la necesidad de aumentar la productividad farmacéutica. Este escenario ha sido punto de partida para el renacimiento del interés en los péptidos como potenciales candidatos a fármacos o APIs [Vlieghe, P. y col., 2010]. Esto ha resultado en un gran número de drogas basadas en péptidos que actualmente se están comercializando (tabla 2).

Tabla 2: Algunos péptidos aprobados por la US FDA (*Federal Drug Administration*) durante el periodo 2009-2011 [Albericio, F. y Kruger, H., 2012].

Nombre Genérico (n. comercial)	Blanco	Propiedades
Ecallantide (Kalbitor®)	Angioedema hereditario	Inhibidor de la calicreína plasmática
Telavancin (Vibativ®)	Infección en la piel	Agente antibacteriano
Romidepsin (Istodax®)	Linfoma de células T	Inhibidor de HDAC
Liraglutide (Victoza®)	Diabetes tipo 2	Agonista del receptor GLP-1
Boceprevir (Victrelis™)	Virus genotipo 1 Hepatitis C	Inhibidor de la proteasa NS23/4A
Telaprevir (Incivek®)	Virus genotipo 1 Hepatitis C	Inhibidor de la proteasa NS23/4A
Brentuximab vedotin (Adcetris™)	Linfoma de Hodgkins	Dirigido a CD30
Icatibant (Firazyr®)	Angioedema hereditario	Antagonista del receptor B2 de bradicinina

El desarrollo de fármacos en la industria farmacéutica se basa en dos clases principales: las drogas tradicionales 'moléculas pequeñas' con pesos moleculares menores a 500 Da, con biodisponibilidad oral; y las moléculas más grandes 'biológicos' mayores a 5000 Da que no son biodisponibles por vía oral y presentan la necesidad de ser administradas por otras vías alternativas [Craik y col., 2013].

Una de las principales limitaciones que presentan los fármacos de moléculas pequeñas es que pueden sufrir de una reducida selectividad, mientras que las proteínas tienden a ser exquisitamente específicas para sus blancos debido a su poder de interacción con ellos, en contraparte poseen baja biodisponibilidad, mala permeabilidad de la membrana plasmática, y alta degradación metabólica [Craik y col., 2013].

Con el vertiginoso avance de la tecnología y la investigación durante las últimas décadas, se han realizado enormes innovaciones que hoy permiten combinar las ventajas de las moléculas pequeñas (costo, la restricción conformacional, la permeabilidad de la membrana, la estabilidad metabólica, la biodisponibilidad oral) con las de las proteínas (componentes naturales, especificidad de diana, alta potencia).

El objetivo de la comunidad científica es lograr moléculas líderes combinando los beneficios de ambos tipos de fármacos. Por las características que presentan los péptidos son un tipo de molécula que tienen un alta especificidad y potencia similar a la observada en los productos biológicos grandes, aunque poseen tamaños más cercanos a los de las moléculas pequeñas. Además, los péptidos son más accesibles y baratos de fabricar utilizando métodos químicos.

El número de fármacos peptídicos que entran en ensayos clínicos es cada vez mayor: de 1,2/año en la década de 1970, 4,6 en 1980, 9,7 en 1990 y 16,8 en 2000. Actualmente, alrededor de 140 péptidos se encuentran en ensayos clínicos y más de 400 en ensayos pre-clínicos [Thundimadathil, J., 2013]. A partir del 2000, el 18% de los péptidos que entraron en estudios clínicos fueron para el tratamiento del cáncer y el 17% para el tratamiento de trastornos metabólicos [Peptide

Therapeutics Fundation, 2010]. Más de cien compañías farmacéuticas y biotecnológicas están llevando a cabo programas de descubrimiento de fármacos peptídicos.

El ejemplo más reciente de una nueva clase de droga peptídica es el grupo de agonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), que alcanzó ventas totales por más de U$S 2.6 mil millones en 2013, con Victoza®, el miembro más prominente de la clase [Fosgerau, K y Hoffmann, T., 2014].

1.2.1 Diseño racional de péptidos terapéuticos

Con el fin de obtener péptidos terapéuticos bien caracterizados es necesario programar estrategias que permitan un diseño racional de estos. Fosgerau y Hoffmann plantean que se debe comenzar con una estructura cristalina conocida del péptido proporcionando la estructura secundaria y terciaria. Luego, a través de la aplicación de diversos análisis, tales como sustituciones de alanina (Alascan) y pequeñas bibliotecas focalizadas, se estudia la relación estructura-actividad (SAR) que se construye en etapas secuenciales que conducen a la identificación de aminoácidos esenciales y los posibles sitios para la sustitución (ver figura 1). Este último proceso es clave especialmente cuando las formulaciones finales de los fármacos son líquidas, ya que se pueden identificar los aminoácidos que son químicamente más lábiles y propensos a eventos que deben evitarse como la isomerización, glicosilación, o la oxidación [Manning, M. y col., 2010].

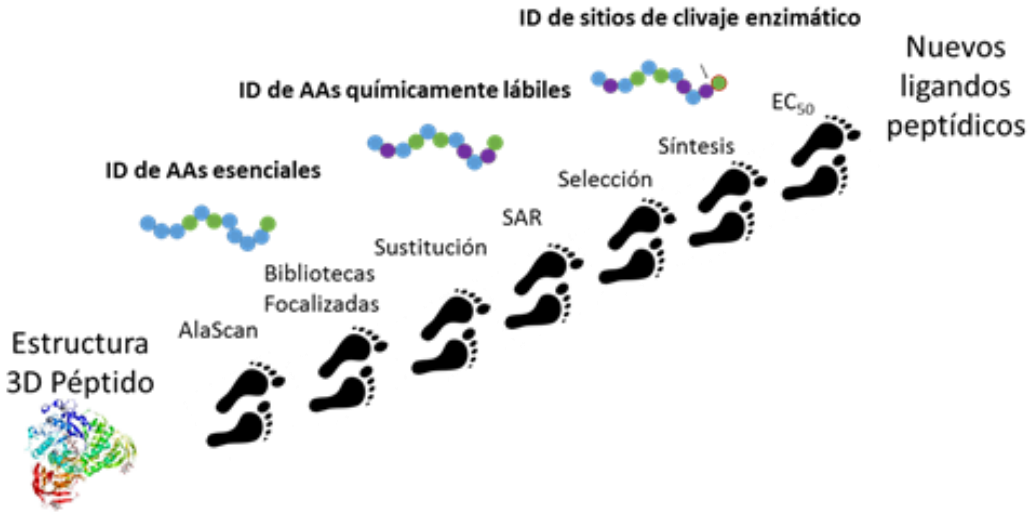


Figura 1: Estrategias de diseño tradicionales basados en la estructura para el descubrimiento de fármacos peptídicos. Esto incluye la sustitución de aminoácidos (AA), y la construcción de las relaciones estructura-actividad (SAR) a través de la exploración de elementos tales como alanina (Ala) y la estimación del CE50 (concentración eficaz media máxima) [Modificado de Fosgerau, K y Hoffmann, T., 2014].

Otro aspecto importante en el diseño racional de fármacos peptídicos es mejorar las propiedades fisicoquímicas de los péptidos naturales, ya que con frecuencia tienden a formar agregados y a veces son poco solubles en agua [Manning, M. y col., 2010]. Para evitar la agregación se pueden utilizar estrategias que incluyen la implantación de parches hidrófobos, que se consiguen por medio de sustituciones o N-metilación de algunos aminoácidos particulares. Si existen problemas de solubilidad para un determinado péptido candidato a fármaco, se debe hacer foco en la distribución de carga y el punto isoeléctrico (pI) del péptido, en relación al pH de la formulación deseada del producto final. Las propiedades físico-químicas de los péptidos también se pueden mejorar mediante la introducción de una α-hélice estabilizadora, formaciones de puente salino, u otras modificaciones químicas, tales como puentes lactámicos como se puede apreciar en la figura 2.

Figura 2: Los enlaces covalentes más comúnmente utilizados para macrociclación peptídica son los puentes lactama, lactona, y disulfuro. Sin embargo, se han explorado otras conexiones covalentes y se aplica para la preparación de análogos peptídicos cíclicos, incluyendo enlace tioéter, puentes biarilo, la incorporación de heterociclos, y enlaces carbono-carbono. [Modificado de Gongora-Benítez, M., Tulla-Puche, J. y Albericio, F., 2014].

Las modificaciones introducidas a través de un diseño racional para mejorar las propiedades fisicoquímicas de un péptido dado deben coincidir con las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas deseadas generales del péptido.

Se espera un aumento en el uso de herramientas de software informático de predicción que facilite el diseño racional de un péptido dado que estas técnicas son cada vez más fáciles de utilizar.

1.2.2 Síntesis de péptidos:

La evolución de la química de péptidos daba sus primeros pasos con la publicación de Emil Fischer en 1901, en la cual describía la síntesis del dipéptido glicilglicina mediante hidrólisis de diketopiperazina de glicina. Sin embargo, Theodore Curtius había sintetizado y caracterizado un péptido veinte años antes. Él, preparó el primer dipéptido N-protegido llamado benzoil glicilglicina por

tratamiento de sal de plata de glicina con cloruro de benzoilo [Kimmerlin, T y Seebach, D., 2005].

Aunque la síntesis peptídica se puso en marcha hace un largo tiempo, una de las grandes limitantes fue que los métodos de acoplamiento presentaban serias dificultades como por ejemplo la imposibilidad de obtener L-aminoacidos enantioméricamente puros y la ausencia de un grupo amino-protector fácilmente removible. Fue así, hasta que un estudiante pródigo de Fisher, M. Bergmann, resolvió parte del problema introduciendo un grupo protector carboxi benzoxi (Cbz) para la protección temporal de la función amino, dando lugar a una nueva era en la síntesis de péptidos [Chandrudu, S. y col., 2013].

A partir de estos avances numerosos péptidos pequeños fueron sintetizados, tal como el glutatión y la carnosina, culminando 20 años después en la síntesis de una hormona activa, el nonapeptido oxitocina por Vincent Du Vigneaud, descubrimiento por el cual en el año 1955 fue galardonado con el premio Nobel de química.

En 1957, Louis A. Carpino y colaboradores introducen un nuevo grupo protector, el grupo t-butiloxi carbonilo (Boc), muy utilizado aun en la síntesis peptídica. Hallazgo que condujo a Schwyzer y Sieber a una publicación en Nature, reportando la síntesis de la hormona adrenocorticotrófica de 39 aminoácidos, la β-corticotrofina (ACTH) [Schwyzer, R. y Sieber, P., 1963].

El próximo gran hallazgo que se suscitó en el mismo año, viene de la mano de Bruce Merrifield, cuando publica un artículo histórico describiendo los principios y las aplicaciones de su invención: la "*Solid-phase peptide synthesis* (SPPS)" o síntesis de péptidos en fase solida [Merrifield, R., 1963]. En este método el péptido se elonga unido a un soporte insoluble (fase sólida), por lo que después de cada etapa de reacción los subproductos se eliminan simplemente por filtración y lavado; en contraste con la síntesis en solución, donde luego de cada reacción el producto debe ser aislado y purificado antes del próximo acople. Además, debido a la naturaleza repetitiva de la síntesis de péptidos (desprotección, lavado,

acoplamiento, lavado, desprotección), el uso de un soporte insoluble en un solo recipiente de reacción permite la automatización de los procesos. Ver figura 3.

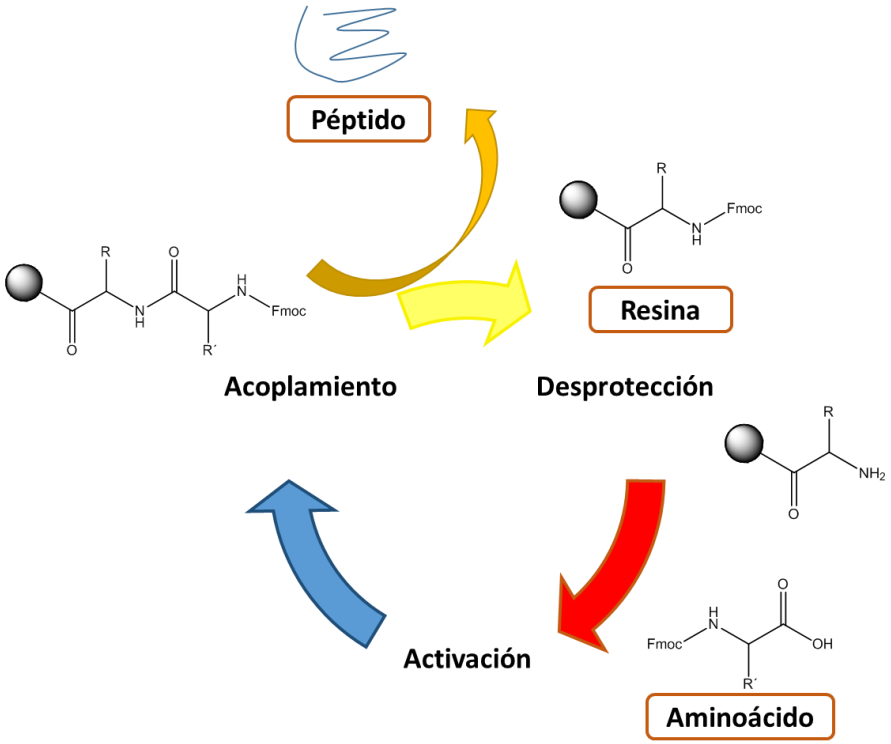


Figura 3: Esquema de la Síntesis en Fase Solida. El péptido se 'inmoviliza' sobre la fase sólida y puede retenerse durante el proceso de filtración, mientras que los reactivos en fase líquida y los subproductos de síntesis se eliminan. Finalmente, la resina puede ser eliminada y el péptido aislado. Los principales grupos protectores de amino habitualmente utilizados son el 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y el t-butiloxicarbonilo (Boc), y cada uno de ellos requiere diferentes resinas y protección de la cadena lateral de aminoácidos y, consecuentemente, diferentes etapas de escisión / desprotección. [Modificado de Duro-Castano, A., Conejos-Sánchez, I. y Vicent, M., 2014].

Al extraordinario descubrimiento de Merrifield debía precederlo la introducción de métodos de purificación más eficientes, debido a las impurezas que presentaban los productos principalmente generadas en la etapa de desprotección final, que es común en la síntesis de péptidos en fase líquida (LPPS) y la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS).

La SPPS permitió la automatización de la síntesis de péptidos en 1965, posibilitando la síntesis de insulina y de una proteína activa (RNasa de 124 aminoácidos). Se ha desarrollado como el método de elección para la preparación

de polipéptidos sintéticos. Utiliza dos estrategias o grupos diferentes para la protección de los grupos α-amino de los aminoácidos, uno sensible a los ácidos, terc-butoxicarbonilo (Boc) y otro sensible a las bases, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) [Carpino, L. y Han, G., 1972] y [Wellings, D. y Atherton, E., 1997]. Estos grupos α-amino-protectores se pueden eliminar rápida y completamente, y un aminoácido protegido con un grupo carboxilo activado se puede acoplar a la amina unida a la resina.

En la etapa final de escisión, Boc SPPS utiliza fluoruro de hidrógeno (HF), compuesto altamente tóxico y que requiere equipamiento especial para su manipulación y por esta razón, la Fmoc SPPS ha reemplazado en gran medida a la metodología Boc en los últimos años. La metodología basada en Fmoc, utiliza el ácido trifluoroacético (TFA) en la etapa de escisión final, estableciéndola como la técnica más importante para la síntesis de péptidos en particular para aquellos que llevan funcionalidades sensibles, tales como aminoácidos fosforilados y glicosilados [Harris, P. y Brimble, M., 2013]. De todas formas, la metodología Boc es aún necesaria y adecuada para la preparación de tiolésteres C-terminal, debido a que estos no son estables a nucleófilos tales como piperidina, el reactivo ubicuo utilizado para eliminar el grupo Fmoc N-terminal durante el montaje de la cadena en la resina. Se enumeran a continuación en la tabla 3 las ventajas y limitaciones de estas metodologías.

Tabla 3: Ventajas y desventajas de las metodologías Boc y Fmoc.

	Ventajas	**Desventajas**
Boc	Alta solubilidad de los péptidos	Requiere de equipamiento especial Potencialmente peligrosa Desprotección final con HF
Fmoc	Relativamente segura Desprotección final con TFA Desprotección ortogonal (base-ácido)	Alto coste de reactivos Baja solubilidad de los péptidos

La SPPS ha mejorado mediante el desarrollo de la tecnología asistida por microondas, usada especialmente para la síntesis de secuencias de péptidos largos. La irradiación de microondas ha permitido que la síntesis de péptidos sea en altos rendimientos y bajos grados de racemización [Chandrudu, S. y col., 2013]. Otras ventajas de la SPPS asistida por microondas son los cortos tiempos de síntesis y la capacidad de controlar la temperatura y la presión durante el alargamiento de la cadena [Harris, P. y Brimble, M., 2013].

Con el advenimiento de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), merito de Horváth y Lipsky en 1969, se inicia otra revolución. La técnica proporciona una herramienta más selectiva para la caracterización de péptidos, así como para la evaluación de las fracciones durante la purificación [Verlander, M., 2007]. Por lo tanto y como resalta Verlander en su publicación la técnica de HPLC, tanto analítica como preparativa es considerada el "eslabón perdido", ya que hizo que el método de Merrifield sea más potente y ampliamente aceptado. Poco tiempo después de su introducción, el método SPPS se utilizó para la fabricación de productos farmacéuticos peptídicos utilizando la estrategia Boc [Verlander, M., 2007].

Sin embargo, tras la introducción de la estrategia del grupo Nα-protector Fmoc [Atherton, E. y col., 1978], que no implica la escisión con HF líquido, la aplicación en la síntesis demostró un aumento en la escala de producción que va desde decenas a cientos de kilogramos, además de ser relativamente sencilla.

1.2.3 Métodos de obtención de péptidos a escala industrial:

Tradicionalmente los péptidos terapéuticos se obtenían a partir de tres fuentes: a-naturales o producidos por plantas y animales, b-aislados de bibliotecas biológicas, c-a partir de bibliotecas químicas [Vlieghe, P. y col., 2010]. El tamaño del péptido determina la mejor tecnología a utilizar para su producción: síntesis química, tecnología del ADN recombinante, sistemas de expresión libres de células, animales y plantas transgénicas o síntesis enzimática.

Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas y desventajas, pero sólo la síntesis química de péptidos permite la incorporación de aminoácidos no naturales y la producción de grandes cantidades de péptidos puros [Jiménez, C. y col., 2004].

Los péptidos, como APIs, tienen capacidades inherentes para bloquear y/o mejorar las transferencias de señales en el cuerpo humano y así tratar una serie de enfermedades metabólicas, enfermedades cardiovasculares, cáncer y trastornos neurodegenerativos.

La síntesis química, es flexible, fácil de escalar y brinda la posibilidad de agregar a la secuencia de interés, aminoácidos no naturales y/o modificarlos a fin de incrementar la actividad intrínseca. También puede ser rentable desde la escala del gramo a nivel de kilogramos, dependiendo de la ruta de síntesis [Thundimadathil, J., 2013]. El método recombinante, en contraste, es un proceso natural y puede ofrecer la ventaja de los bajos costos a gran escala de producción. También es eficaz para las secuencias de más de 100 aminoácidos.

En la industria existen dos métodos para la síntesis química de péptidos: LPPS y SPPS. La primera, es la técnica más antigua, aunque la mayoría de los laboratorios, hoy en día, usan la SPPS o mezclas híbridas de ambas técnicas. En la industria de péptidos, la LPPS es más rentable para la producción a gran escala (mayor a 100 kg) de péptidos de cadena más corta, tales como la síntesis de análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LH-RH) [Hu, G., 2009].

Como se mencionó anteriormente, la SPPS permite la incorporación de aminoácidos que no se producen naturalmente, y la modificación del esqueleto del péptido. La SPPS goza de ciertos beneficios como la aceleración de la producción, ya que es un proceso relativamente simple, es más fácil de escalar y es más adecuada para secuencias más largas que la LPPS.

Por supuesto, como en todo proceso industrial el análisis de secuencia y el diseño de la estrategia de síntesis son cruciales. Para ello el paso inicial es determinar el tipo de síntesis; automática o manual, el tipo de resina adecuada, el

método de acoplamiento/desprotección/escisión a fin de eliminar potenciales reacciones secundarias y minimizar el contenido de subproductos.

La síntesis química a gran escala se ha convertido en una tecnología viable para la producción de péptidos pequeños y medianos que van desde aproximadamente 5 a 40 residuos [Jiménez, C. y col., 2004].

Hoy, la síntesis de péptidos en fase sólida es uno de los métodos más aceptados por la industria farmacéutica para la producción de drogas basadas en péptidos. En la tabla 4 se indican algunos ejemplos de péptidos terapéuticos sintéticos producidos a gran escala utilizando la técnica SPPS.

Tabla 4: Ejemplos de péptidos terapéuticos sintéticos que han alcanzado el mercado farmacéutico americano, europeo y japonés.

Nombres	**Nombre Comercial**	**Compañías**	**Indicaciones**
Leuprolide	Lupron®	Abbot, Pharma, Bayer	Cáncer de próstata y de mama.
Lanreotide	Somatuline Autogel®	Beaufour Ipsen Pharma, Globopharm, Tercica	Acromegalia y síndrome carcinoide
Exenatide	Byetta®	Amylin Pharms, Eli Lilly	Control de la glucemia en pacientes con diabetes Mellitus Tipo 2 Obesidad
Ziconotide acetate	Prialt®	Elan Pharms	Dolor crónico severo (CNS)
Carbetocin acetate	Duratocin®, Lonactene®, Pabal®	Ferring Pharms	Prevención de la atonía uterina, inducción, y control de sangrado o hemorragia posparto.
Pramlintide acetate	Symlin®	Amylin Pharms	Diabetes Tipo 1 y 2

Por lo tanto, junto con la posibilidad de utilizar aminoácidos no naturales y la modificación de péptidos, la síntesis química ofrece acceder a una diversidad química mucho más amplia que los derivados peptídicos producidos por tecnologías recombinantes, con un potencial diversificado de la propiedad

intelectual (en términos de nuevas entidades químicas patentables) [Vlieghe, P. y col., 2010].

1.3 Aplicaciones de los péptidos: péptidos antimicrobianos y antiproliferativos

1.3.1 Péptidos en oncología:

El potencial de los péptidos en el tratamiento del cáncer se hace evidente ante la presencia de las estrategias que se han desarrollado para hacer frente a la progresión del crecimiento del tumor y la propagación de la enfermedad. El uso de péptidos que pueden dirigirse directamente a las células cancerosas sin afectar a las células normales (terapia dirigida) está evolucionando como una estrategia alternativa a la quimioterapia convencional. El péptido puede ser utilizado directamente como un agente citotóxico a través de diversos mecanismos o puede actuar como un portador de agentes citotóxicos y radioisótopos dirigidos específicamente a las células cancerosas. Debido a la capacidad de unirse a diferentes receptores y también formar parte de varias vías bioquímicas, los péptidos actúan como potencial herramienta de diagnóstico y biomarcadores en la progresión del cáncer [Thundimadathil, J., 2012].

La figura 4 hace referencia a los diferentes tratamientos en los que se utilizan péptidos como drogas antitumorales. Entre estas vías se encuentran:

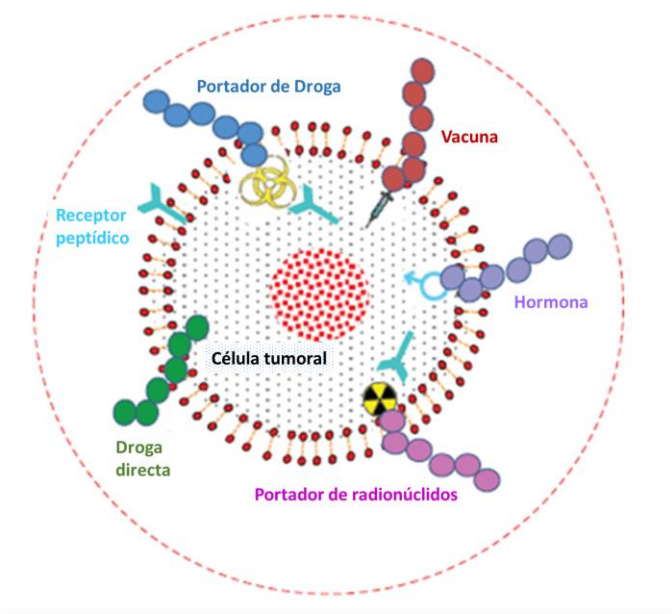


Figura 4: Diferentes opciones de tratamiento del cáncer utilizando péptidos [Modificado de Thundimadathil, J., 2012].

I) El uso de agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH): La administración de estos péptidos causa la down-regulación de los receptores de LHRH en la hipófisis, lo que lleva a una discriminación de la liberación de la hormona folículo-estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH), y una disminución concomitante en la producción de testosterona. Esto ofrece un nuevo método para la terapia de privación de andrógenos en pacientes con cáncer de próstata [Schally, A. y col., 2000] [Perachino, M. y col., 2010].

II) Péptidos transportadores de radionucleidos: Análogos de la somatostatina en la terapia del cáncer y terapia de receptores con péptidos radio-marcados (PRRT): Se han desarrollado análogos potentes de la somatostatina para el tratamiento de la acromegalia, el gigantismo, el tirotropinoma, los episodios asociados con el síndrome carcinoide y la diarrea en pacientes con tumores secretores de péptidos intestinales vasoactivos (VIPomas). Los receptores de la somatostatina son objetivos atractivos para el delivery de radiactividad mediante análogos de somatostatina radio marcados. La PRRT combina análogos de la

somatostatina con un radionucleido para formar moléculas altamente especializadas llamadas radiopéptidos [Esser, J. y col., 2006]. Los análogos de somatostatina radiomarcados comprenden generalmente tres partes: un octapéptido cíclico (ej. Octreotide), un quelante ej. dietilentriaminopentaacetico (DTPA) o acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacetico (DOTA) y un elemento radiomarcado (ej. ^{111}In, ^{90}Y o ^{177}Lu).

Un ejemplo de este tipo de tratamientos es el octreotide cuyo nombre comercial es Sandostatina, producido por Novartis, es inyectado en los pacientes y viaja a través del cuerpo uniéndose a las células tumorales carcinoides que tienen receptores para ellos. Una vez unido, estos radiopéptidos emiten radiación y matan a las células tumorales a las que están unidos [Saltz, L. y col., 1993].

III) Vacunas peptídicas: Este método de tratamiento de las células cancerosas se basa en vacunas que contienen péptidos derivados de una secuencia proteica de un candidato asociado al tumor o de antígenos específicos [Henderson, R. y col., 2005]. Las células tumorales expresan antígenos conocidos como antígenos asociados a tumores (TAA) que pueden ser reconocidos por el sistema inmune del huésped (células T). Estos TAA pueden ser inyectados en pacientes con cáncer en un intento de inducir una respuesta inmune sistémica que puede resultar en la destrucción del crecimiento tumoral en diferentes tejidos del cuerpo. Cualquier proteína/péptido con una estructura anormal debido a la mutación, producido por una célula tumoral, puede actuar como un antígeno tumoral [Thundimadathil, J., 2012].

Nuestro grupo de trabajo en colaboración con el Centro de Inmunología Molecular de la Habana, Cuba, desarrolló una vacuna terapéutica contra el cáncer de pulmón denominada Racotumomab (nombre comercial Vaxira®).

Esta vacuna estimula una respuesta inmune contra un gangliósido presente en la superficie de células cancerosas de pulmón [Vázquez, A. y col., 2012].

IV) Péptidos como transportadores de drogas citotóxicas: un péptido puede estar conjugado a un fármaco citotóxico para entregarlo a una célula cancerosa que expresa el receptor del péptido correspondiente [Schally, A. y Nagy, A., 2004]. Tales péptidos se conocen como péptidos dirigidos a células, ya que pueden dirigirse específicamente a una célula que expresa su receptor. Nuevos análogos citotóxicos de LHRH, AN-152 en el que la doxorrubicina (DOX) es vinculada a [D-Lys^6]LHRH, y AN-207 que consiste de 2-pirrolino-DOX (AN-201) acoplado al mismo transportador, muestran una alta afinidad de unión y son menos tóxicos y más eficaces en inhibir el crecimiento tumoral en el cáncer de próstata [Schally, A. y Nagy, A., 1999].

V) Péptidos antitumorales: El uso directo de péptidos como agentes terapéuticos para tratar el cáncer está ganando impulso en los últimos años. La actividad contra el cáncer de diferentes péptidos se atribuye a una variedad de mecanismos que restringen el crecimiento del tumor:

- ✓ Inhibición de angiogénesis: La angiogénesis requiere la unión de moléculas de señalización, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a los receptores en la superficie de las células endoteliales normales [Thundimadathil, J., 2012]. Cuando los VEGFs y otros se unen a sus receptores en las células endoteliales, las señales dentro de estas células se inician, originando el crecimiento y la supervivencia de los nuevos vasos sanguíneos [Jain, R. y col., 2006]. Los inhibidores de la angiogénesis interfieren con varios pasos de este proceso. Un péptido inhibidor que hoy se encuentra en fase III clínica es el Aplidin® [Galmarini C. y col., 2014] desarrollado por la compañía PharmaMar y presenta actividad frente al carcinoma de células renales, melanoma maligno, tumores de origen endocrino y carcinoma medular de tiroides [Albericio F. y

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

col., 2004]. Otro ejemplo es el de la angiotensina que puede frenar el crecimiento del tumor mediante la inhibición de la formación de vasos sanguíneos [Rosca, E. y col., 2011].

- ✓ La inhibición de las interacciones proteína-proteína como los β-péptidos que al adoptar un plegado no natural se convierten en péptidos invulnerables a las proteasas y esa característica se puede traducir en ligandos potentes con permeabilidad celular y farmacodinamia favorable. Por ejemplo, actualmente se está apuntando a las proteínas de la familia Bcl-2 que ayudan a regular la apoptosis. Los β-péptidos que se unen a los miembros de la familia Bcl-2 podrían ser de gran utilidad como herramientas para el control de la muerte celular programada, e incluso como posibles fármacos para el tratamiento del cáncer [Kritzer, J. y col., 2005].

- ✓ Otro posible mecanismo es la inhibición de enzimas, la modulación de la actividad de la quinasa representa una estrategia terapéutica atractiva para el tratamiento de enfermedades humanas. El desarrollo y diseño de inhibidores específicos de las proteínas quinasas se convirtieron así en una estrategia importante en muchos programas de descubrimiento de fármacos [Eldar-Finkelman, H. y Eisenstein, M., 2009]. La inhibición de la actividad de la proteína quinasa CK2 se puede lograr mediante el bloqueo de la actividad de fosforilación como es el ejemplo del péptido CIGB-300 [Perea, S. y col., 2004]. Este péptido fue desarrollado por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana Cuba, en colaboración con nuestro grupo de investigación, y más adelante se profundizará en su actividad.

- ✓ La inhibición de proteínas, como es el caso de la proteína Myc, un factor de transcripción que regula una gran variedad de procesos celulares incluyendo el crecimiento y la proliferación celular, la

progresión del ciclo celular, la transcripción, la diferenciación, la apoptosis y la motilidad celular. Esta proteína se encuentra desregulada en una amplia gama de cánceres humanos y a menudo se asocia con tumores agresivos pobremente diferenciados [Vita, M. y Henriksson, M., 2006] y [Soucek, L. y col., 2013].

VI) Otros medicamentos contra el cáncer estrechamente relacionados con péptidos: el Bortezomib es el primer inhibidor terapéutico del proteosoma y ya está aprobado en los EE.UU. para el tratamiento de mieloma múltiple recurrente y el linfoma de células del manto [Adams, J. y Kauffman, M., 2004] y [Adams, J., 2004]. El fármaco producido por Janssen-Cilag y Millennium Pharms es un dipéptido N-protegido y puede ser descrito como Pyz-Phe-boroLeu, que significa ácido pirazinoico, fenilalanina y leucina con un ácido bórico en lugar de un ácido carboxílico [Thundimadathil, J., 2012].

Mifamurtida (Mepact) es un fármaco contra el osteosarcoma. Mifamurtida [fosfatidiletanolamina muramil tripéptido liposomal (L-MTP-PE)] es un nuevo agente con actividad inmunomodulante no específica, es un análogo sintético de un componente de las paredes celulares bacterianas y activa los macrófagos y monocitos induciendo la respuesta inmune [Ando, K. y col., 2011]. Su mecanismo de acción se basa en la unión a un ligando específico NOD2, receptor que se encuentra fundamentalmente en monocitos, células dendríticas y macrófagos que simula una infección bacteriana. Esto resulta en un aumento de la producción de interleucinas. Los glóbulos blancos activados atacan a las células cancerosas, pero no a otras células.

Brentuximab vedotin (Adcetris®) es un conjugado de droga-anticuerpo (que se dirige a la proteína de la membrana celular CD30 expresada en el linfoma de Hodgkin) ligado a unidades del agente antimitótico monometil auristatina E [Katz, J. y col., 2011]. El linker aquí es un dipéptido de valina-citrulina, que es escindido por la catepsina una vez que el conjugado ha entrado en una célula tumoral [Senter, P. y Sievers, E., 2012]. Es producido

por SeattleGenetics y en el 2011 fue aprobado por la FDA debido a su alta eficacia.

1.3.2 Relación entre péptidos antimicrobianos y péptidos anticáncer

Debido a que los péptidos catiónicos son altamente potentes contra bacterias y células tumorales, pero no frente a células de mamífero [Schweizer, F., 2009], además de utilizar los péptidos antimicrobianos (AMPs) como alternativas potenciales para la lucha contra las enfermedades infecciosas, se ha estudiado y desarrollado también su uso como péptidos contra el cáncer (ACP).

Aunque las bacterias Gram-positivas (Gram +) y Gram-negativas (Gram -) son los blancos más estudiados para los AMPs, otros objetivos diferentes han sido descritos, como los hongos, protozoos, virus como el HIV y el herpes [Gaspar, D. y col., 2013].

Los péptidos antimicrobianos constituyen un mecanismo de defensa inmune con baja antigenicidad [Iwasaki, T. y col., 2009] que se puede encontrar en innumerables organismos eucariotas de diferentes especies [Zasloff, M. 2003]. Estos son moléculas pequeñas y generalmente anfipáticas, la mayoría de ellas contiene residuos catiónicos e hidrofóbicos en proporción elevada, por lo tanto, son capaces de interactuar con las membranas microbianas [Chan, D. y col., 2006] mediante interacciones no específicas con las membranas lipídicas [Nguyen, L. y col., 2011].

Está bien establecido que la capacidad de estas pequeñas moléculas catiónicas en la irrupción de las membranas celulares depende de varias propiedades biofísicas, como la estructura secundaria, la carga neta global, la anfipaticidad, la hidrofobicidad, el tamaño y el equilibrio entre las regiones hidrofóbicas y polares [Gaspar, D. y col., 2013].

La selectividad y el mecanismo mediante el cual los ACPs matan células cancerígenas es aún un tema controvertido. Los efectos oncolíticos de los ACPs

pueden ocurrir por mecanismos membranolíticos o no membranolíticos [Schweizer, F., 2009]. El mecanismo de los péptidos membranolíticos es dependiente de las características que posean los ACPs, así como de las características de la membrana blanco, que a su vez modulan la selectividad y la toxicidad de los péptidos [Iwasaki, T. y col., 2009].

En efecto las células cancerígenas y las células normales manifiestan una serie de diferencias que son responsables de la selectividad de algunos ACPs. Estas diferencias se basan principalmente en la carga neta negativa que caracteriza a las células malignas [Schweizer, F., 2009].

Las membranas de las células cancerosas poseen moléculas aniónicas tales como los fosfolípidos, fosfatidilserina (PS), mucinas O-glicosiladas, ganglióidos sililados y sulfato de heparina que les confiere una carga neta negativa contrastando el contenido de la membrana celular normal que consta típicamente de carga neta neutra [Hoskin, D. y Ramamoorthy, A., 2008]. De hecho, los PS totales se localizan exclusivamente en la cara interior de la membrana de las células normales con una distribución asimétrica. La exposición de los PS a la superficie de la membrana se produce en células patológicas tales como glóbulos rojos falciformes, células apoptóticas y células cancerígenas como señal para el reconocimiento y eliminación de estas células por macrófagos [Iwasaki, T. y col., 2009].

Actualmente, se ha reportado acerca de varios AMPs y sus análogos, que interactúan e irrumpen las membranas bacterianas cargadas negativamente [Zasloff, M., 2002]. Son capaces también de matar células cancerosas de mamífero mediante la inducción de permeabilidad de la membrana o la apoptosis [Mader, J. y Hoskin, D., 2006]. Este es el ejemplo de magaininas [Baker, M., y col., 1993], cecropinas [Hui, L. y col., 2002] y sus análogos que muestran efectos citotóxicos contra una amplia gama de líneas celulares de cáncer incluyendo melanoma, linfomas, leucemias, cánceres de mama y cánceres de pulmón.

Más importante aún, la principal ventaja de los AMPs y derivados es su selectividad celular para las células cancerosas. Son tóxicos contra las células cancerosas a concentraciones más bajas que las requeridas para matar eritrocitos normales, leucocitos y fibroblastos [Iwasaki, T. y col., 2009].

Los péptidos terapéuticos han pasado décadas como productos sepultados, mientras que la industria farmacéutica se centró en las moléculas pequeñas como agentes medicinales. Teniendo en cuenta los retos cada vez mayores con los últimos compuestos, los desarrolladores de medicamentos están recurriendo de nuevo a las pequeñas cadenas de aminoácidos. Mientras que los péptidos han sido considerados inadecuados por un largo tiempo, las formulaciones modernas y diseños de fármacos peptídicos han logrado eludir sus debilidades para revelar claramente más que algunas de las ventajas de estas moléculas.

El objetivo general del presente trabajo es profundizar en el conocimiento de diferentes péptidos líderes en los que se viene trabajando, en primer lugar, desmopresina, péptido con actividad antiproliferativa y antimetastásica sobre cáncer de mama. El segundo péptido líder es un derivado de la lisozima con actividad antimicrobiana y, por último, el péptido CIGB-300 también con actividad antiproliferativa sobre células tumorales de carcinoma pulmonar. Este trabajo de investigación fue dividido en tres capítulos, con el fin de elucidar las distintas estrategias de estudio implementadas en las diferentes estructuras peptídicas, para lograr el mejoramiento de la actividad y su análisis molecular luego de su aplicación.

El hallazgo de nuevos y mejorados análogos con potencial terapéutico, permitirá la producción de APIs de péptidos sintéticos para su futura aplicación en la terapia del cáncer o tratamientos antimicrobianos. Dentro del marco de estudio de las variantes peptídicas con potencial antitumoral, el análisis a nivel proteómico contribuirá a un mayor entendimiento del mecanismo de acción intracelular del péptido CIGB-300.

2 Capítulo I:

Investigación y desarrollo de péptidos antiproliferativos, análogos de Desmopresina (dDAVP).

2.1 Introducción:

2.1.1 Estructura y función de la Vasopresina:

La primera parte del presente trabajo se basa en el diseño racional de análogos de la hormona neurohipofisaria vasopresina (AVP) o también llamada arginina vasopresina. Este nonapéptido es secretado por la neurohipófisis al torrente sanguíneo donde cumple varias funciones, entre las cuales se puede destacar su función antidiurética y vasopresora.

El nonapéptido AVP, también conocido como hormona antidiurética (ADH), es cíclico y posee el extremo C-terminal amidado, un puente disulfuro entre la cisteína en posición 1 y la cisteína en posición 6; y una cola que incluye los residuos de 7 a 9, indicado en la figura 5.

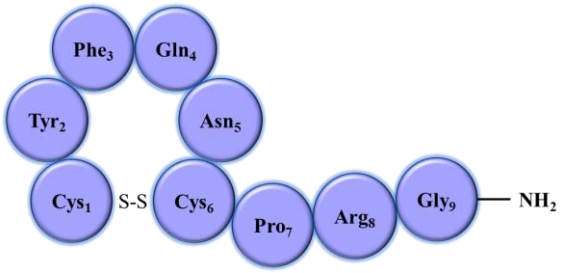


Figura 5: Secuencia peptídica de AVP. Modificado de Alonso, D. y col., 2011.

Los resultados de estudios de espectroscopia por RMN y estudios de cristalografía de rayos X sugieren que las principales características estructurales de la vasopresina son 2 giros β. Uno de ellos involucra las posiciones 2-5 (la secuencia: Tyr-Phe-Gln-Asn) y el otro involucra las posiciones 6-9 (la secuencia: Cys-Pro-Arg-Gly-NH_2) [Buku, A. y col., 1987].

Entre los péptidos neurohipofisarios más estudiados se encuentran la AVP y la oxitocina (OT) que llevan a cabo sus acciones biológicas mediante su unión a cuatro receptores distintos actualmente denominados OTR, V1aR, V1bR y V2R (tabla 5). Estos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (ΠG), caracterizados por tener siete hélices transmembrana [Manning, M. y col, 2008].

Tabla 5: Receptores de las hormonas OT y AVP, su ubicación y función.

RECEPTORES	LIGANDO	ubicación	ACCION
OT	Oxitocina	Útero, glándulas mamarias, ovarios, cerebro, riñón, huesos y células endoteliales	Facilita el parto y la lactancia
V1a	Vasopresina	Hígado, células vasculares del musculo liso y cerebro	Media la ansiedad y la agresividad. Efecto vasopresor
V1b	Vasopresina	Cerebro, riñón y medula adrenal	Media la ansiedad y el estrés.
V2	Vasopresina	Sistema de conductos recolectores renales	Antidiurética, vasoconstrictora

Se sabe que la AVP aumenta el AMP cíclico (cAMP) intracelular en las células principales de la nefrona distal mediante la activación del receptor de vasopresina (V2R), el cAMP produce una cascada de fosforilación que conduce a la inserción de los canales de agua de acuaporina-2 en la superficie luminal de los túbulos colectores y, como consecuencia, se produce un aumento de la reabsorción de agua [Birnbaumer, M., 2000]. De esta manera, AVP regula la homeostasis del agua. De hecho, ciertas variaciones genéticas en el receptor V2 producen la enfermedad diabetes insípida nefrogénica que se caracteriza por una respuesta renal defectuosa a la AVP.

Los agonistas y antagonistas peptídicos y no peptídicos de los receptores de OT y AVP son ampliamente utilizados como herramientas farmacológicas en una amplia variedad de estudios debido a su gran potencial terapéutico [Manning, M. y col., 2012].

2.1.2 Estructura del receptor V2:

El receptor de AVP, V2R, posee siete residuos transmembrana (TM), tres loops extracelulares (e1, e2 y e3) y tres loops intracelulares (i1, i2 e i3) con un dominio N-terminal extracelular y una cola C-terminal intracelular [Erlenbach, I., 2001]. Particularmente, el i3 juega un rol decisivo en el acoplamiento de la ΠGs a la adenilato ciclasa, vinculado al V2R y el i2 en el acoplamiento de la ΠGq a la fosfolipasa C, vinculado al receptor V1a [Czaplewski, C. y col., 1998]. El extremo N-terminal del tercer bucle intracelular es crítico para la activación eficiente de la ΠGs [Erlenbach, I. y Wess, J., 1998].

El e1 y el e2 se mantienen unidos mediante un puente disulfuro. Se indican también un sitio de N-glicosilación y un sitio de palmitoilación en la cola C-terminal que favorece la fijación del receptor a la membrana plasmática [Macion-Dazard, R., y col., 2006]. Entre el e2 y el e3 se localiza un bolsillo hidrofóbico profundo que cumple una importante función en la interacción con el ligando [Erlenbach, I., 2001].

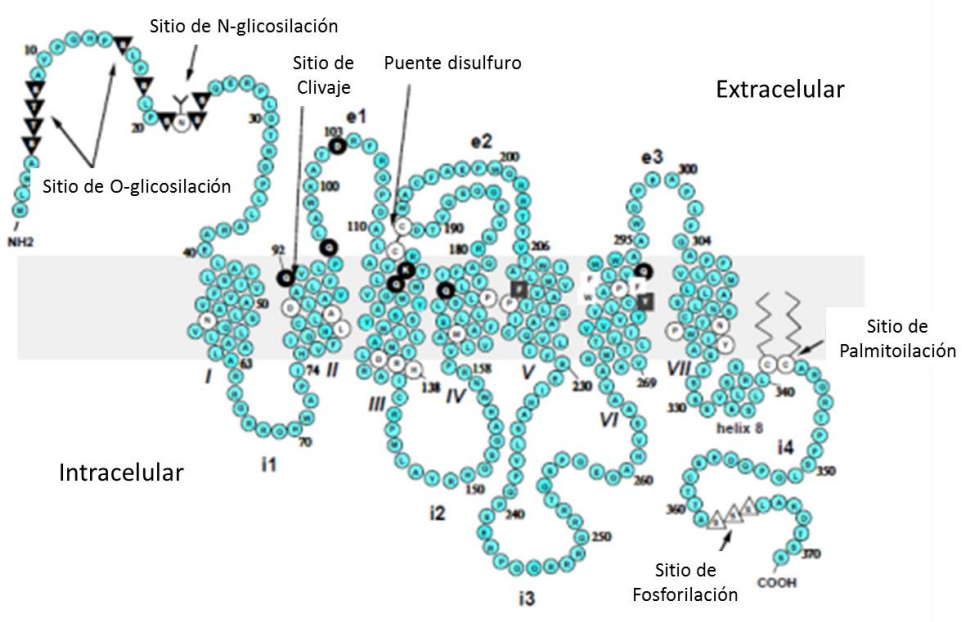


Figura 6: Esquema del receptor hV2. Tomado de Erlenbach, I., 2001.

2.1.3 Interacción de V2R y AVP:

Estudios previos predicen el modelado molecular del complejo hV2R/AVP mediante programas informáticos. La interacción de los ligandos con el receptor está regida por fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas, el bucle del ligando se acomodaría en el bolsillo hidrofóbico del receptor, y la arginina en posición 8 de la AVP interactuaría con el ácido aspártico 103 del receptor [Czaplewski, C. y col., 1998], siendo esta última interacción la responsable de la selectividad por el ligando [Erlenbach, I., 2001]. Ambos autores postulan que la tríada hidrofóbica Nt-AVP (Cys^1-Tyr^2-Phe^3) se acomodaría en la cavidad hidrofóbica del hV2R. Por otro lado, fueron probados análogos de AVP desprovistos de la cola C-terminal (i.e pressinamida y desaminopressinamida) y lograron evocar una respuesta biológica completa, a pesar de observarse una menor afinidad a V2R [Hechter, O., y col., 1978]. Esto confirmaría que la cola C-terminal de AVP no sería necesaria para la actividad intrínseca de V2R.

El dominio N-terminal y el e1 del receptor, cumplen un papel importante en el reconocimiento de la cola C-terminal de un agonista y asimismo el e2 en el reconocimiento de la parte cíclica de la hormona [Czaplewski, C. y col., 1998].

En cuanto a la relación estructura función, se ha reportado que la arginina en posición 8 juega un papel clave en la regulación de la excreción renal de agua y en la regulación de la función cardiovascular en los mamíferos. Se cree que la tirosina en posición 2 inicia la respuesta presora de AVP, mientras que la fenilalanina en la posición 3 está implicada principalmente en el reconocimiento de esta hormona y en la unión a receptores [Jost, K. y col., 1987]. La interacción de la vasopresina con sus receptores se determina por la orientación correcta de las cadenas laterales de tirosina y fenilalanina, que se estabilizan por una interacción en paralelo mediante los anillos aromáticos de estos residuos [Langs, D. y col., 1986].

Muchos cánceres humanos demostraron la expresión del V2R, incluyendo cáncer de mama [North, W. y col., 1995], gastrointestinal [Monstein, H., y col., 2008] y cáncer de células pequeñas de pulmón [North, W. y col., 1998]. Por otra parte, se sabe que dDAVP ejerce un efecto específico sobre los V2R presentes en

células endoteliales microvasculares, induciendo *in vivo* una rápida liberación de formas multiméricas del factor von Willebrand. Tal factor hemostático juega un papel protector contra la difusión de células tumorales, al causar la muerte de las células metastásicas poco después de su detención en el órgano diana [Terraube, V. y col., 2006; Mochizuki, S. y col., 2012].

2.1.4 Desmopresina; estructura y función:

En 1966, Zaoral *y col*, realizaron ensayos sobre las propiedades biológicas de análogos de vasopresina. Uno de los cambios propuestos fue la sustitución de L-Arginina por D-Arginina en la posición 8 basándose en el antecedente de que el cambio de la configuración (quiralidad) del aminoácido básico en esa posición, sería un sitio clave para la actividad biológica. Esta sustitución suprime el efecto vasopresor dependiente del receptor V1a. De este modo se revela que D-Arg^{8}-vasopresina posee una importante disminución del efecto vasopresor [Zaoral, M. y col., 1966]. El segundo cambio que le realizan a la molécula es la desaminación de la cisteína en posición 1 con lo que se logró mejorar la vida media y la actividad antidiurética de la AVP [Zaoral, M. y col., 1966]. Como conclusión la l-desamino-8-D-arginina vasopresina, llamada comercialmente desmopresina (dDAVP), demostró un alto grado de actividad antidiurética, con un disminuido efecto presor y uterotónico.

Hasta el momento se ha revelado en varias investigaciones cómo diferentes alteraciones estructurales realizadas sobre la molécula de AVP, individuales o combinadas, podrían provocar la selectividad antidiurética/vasopresora de los análogos de AVP.

Entre las alteraciones estructurales individuales de AVP que dan lugar a la mejora de la selectividad antidiurética/vasopresora están en:

A. La eliminación del grupo amino de la posición 1, como en [1-deamino]-8-L-arginina-vasopresina, con un radio de actividad antidiurética/actividad vasopresora (A/V) de ~3,8;

B. La sustitución de tirosina por fenilalanina en la posición 2, como en [2-fenilalanina]-8-arginina-vasopresina, con un radio de A/V~2,9;

C. La mejora de la lipofilicidad en la posición 4, por ejemplo, la sustitución de glutamina por treonina o ácido α-aminobutírico dando [4-treonina]-8-arginina-vasopresina, A/V~2,2 y [4-α-ácido aminobutírico]-8-arginina vasopresina, A/V~20, respectivamente; y

D. La sustitución de D por L-arginina en la posición 8, como en 8-D-arginina-vasopresina A/V~28 [Manning, M. y col., 1973].

También se han desarrollado algunos péptidos que contienen combinaciones de dos de estos cuatro cambios que exhiben radios de A/V mucho más grandes que los producidos por cualquiera de los cambios unitarios. Se ha demostrado que la l-deamino-8-Darginina-vasopresina, péptido que combina los cambios A y D, posee un valor de A/V de 79 [Manning, M. y col., 1973]. Por otro lado, la combinación de factores A y C, es decir, la eliminación del grupo amino en la posición 1 junto con el aumento del carácter lipofílico del aminoácido en la posición 4 también mejora aún más la selectividad A/V [Manning, M. y col., 1973].

Como se mencionó, la vasopresina y su análogo dDAVP aumentan los niveles del factor von Willebrand (vWF) en plasma [Mannucci, M., 2012]. La dDAVP se utiliza como un agente hemostático para el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand, de la diabetes insípida [Vávra, I. y col, 1968] y para la activación del factor VIII en algunos tipos de hemofilia [Mannucci, M. y Cattaneo, M., 2013]. En contraste a la administración intranasal, la peroral (tabletas, cápsulas o soluciones bebibles) es complicada debido a que la molécula peptídica es muy susceptible a la degradación enzimática en el sistema gastrointestinal [Barth, T. y col., 2002]. Por dicha razón, el reemplazo de la cisteína en posición 1 por ácido β-mercaptopropiónico (Mpa), resultó fundamental para aumentar la vida media de la molécula, haciendo que ésta quede protegida frente a la degradación por aminopeptidasas tal como ocurre con la dDAVP [Zaoral, M. y col., 1966]

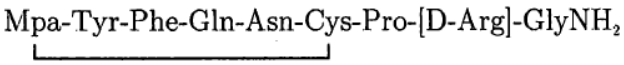


Figura 7: Secuencia peptídica de dDAVP. Tomado de Barth, T. y *col.*, 2002.

El péptido dDAVP (figura 7), agonista específico del V2R, ejerce su efecto antidiurético a través de un aumento de cAMP en las células que forman los conductos colectores renales. Un modelo propuesto para elucidar el mecanismo de acción de la dDAVP plantea que esta induciría la secreción de vWF y el activador de plasminógeno tisular (t-PA), y la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) [Kaufmann, J. y Vischer, U., 2003]. La dDAVP se une al receptor endotelial V2R, lo que resulta en la activación de la proteína G trimérica (G_s) junto con la enzima adenilato ciclasa, dando como resultado la producción de cAMP, y a la activación de la proteína quinasa A (PKA). La activación de PKA estimula la exocitosis de los cuerpos de Weibel-Palade (WPBS), que inducen a la liberación coordinada de vWF y t-PA. También se produce la activación de la enzima NOS, por fosforilación del residuo Ser^{1177}, que lleva a la producción de Oxido Nitrico (NO) como se puede observar en la siguiente figura.

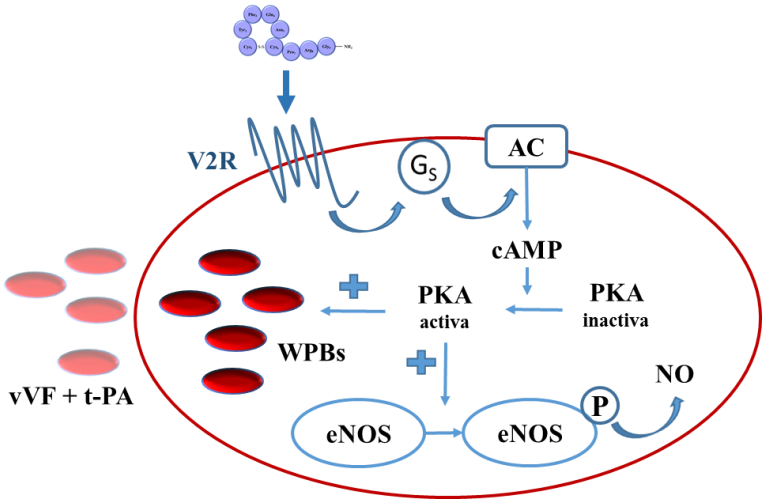


Figura 8: Modelo del mecanismo de acción de la dDAVP en células endoteliales. Modificado de Kaufmann, J. y Vischer, U., 2003.

Se ha logrado establecer que la AVP y sus derivados sintéticos pueden alterar el comportamiento *in vitro* de las células neoplásicas. Esto ocurre a través del reconocimiento de receptores específicos por parte de estos péptidos, dando

lugar a la modulación de la proliferación y la secreción de proteasas por parte de las células tumorales. Existe evidencia que el V2R está presente en líneas celulares cancerosas, entre las cuales se hallan las células del carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCCL) [North, W y col., 1998]. Tiempo después se comprobó que las células MCF-7 de cáncer de mama también expresan el mARN de todos los subtipos de receptores de vasopresina (V1a, V1b y V2) [North, W. y col., 1999].

Asimismo, dDAVP puede inhibir la progresión de las células metastásicas residuales en modelos preclínicos de ratón mediante la inducción de un efecto agonista sobre el V2R presente en las células tumorales [Alonso, D. y col., 2011]. La dDAVP ha mostrado efectos antiproliferativos significativos sobre líneas celulares de carcinoma de mama SKBR3 y MCF-7 que expresan el V2R humano [Keegan, B. y col., 2005].

En 2006, el grupo de investigación del Laboratorio de Oncología Molecular de la Universidad Nacional de Quilmes (LOM-UNQ) propuso un modelo que describe los posibles mecanismos de acción antitumoral de la dDAVP (figura 9). Los efectos de la dDAVP se ejercen durante las primeras etapas del proceso metastásico [Gómez y col., 2006].

La actividad profibrinolítica de dDAVP es debida a un aumento en el t-PA, la enzima que convierte el plasminógeno en plasmina y por lo tanto se inicia la degradación de fibrina. De este modo, al incrementar los niveles del t-PA, aumentaría la fibrinólisis intravascular, lo que ayudaría a disolver el émbolo de fibrina que actúa como escudo protector de las células tumorales circulantes [Gómez y col., 2006].

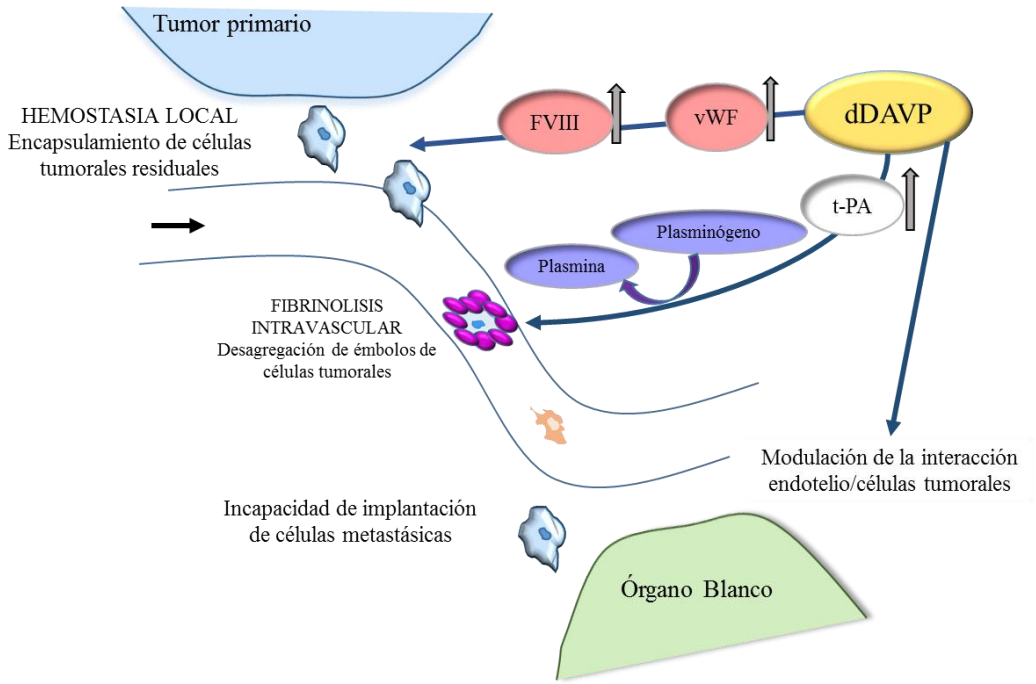


Figura 9: Modelo de los posibles mecanismos de la acción antitumoral de la dDAVP. Modificado de Gómez y *col.*, 2006.

Recientemente, estudios preliminares indicaron que el tratamiento de las células MCF-7 con dDAVP, en presencia de concentraciones adecuadas de plasminógeno, induce la formación de angiostatina, inhibidor natural de la angiogénesis tumoral [Ripoll, G. y col., 2008]. Dado que la angiostatina es un fragmento interno del plasminógeno, es probable que dDAVP induzca un procesamiento proteolítico dependiente de V2R que conduce a la formación de este inhibidor [Alonso, D. y col., 2011].

También se ha confirmado que el análogo de dDAVP, [Val^{4}Gln^5]dDAVP, sustituido en posición 4 por una valina y en posición 5 por una glutamina mejora la actividad antiproliferativa. Esta sustitución tiene como finalidad aumentar la estabilidad del análogo debido a la menor susceptibilidad de la Glutamina a la deamidación en comparación con la Asparragina. Asimismo, el incremento de la hidrofobicidad en la posición 4 mejora la interacción de los análogos de AVP con el V2R [Manning, M. y col., 2008], razón por la cual, se introdujo la sustitución de la valina por la glutamina. Los mismos autores también reportaron que el análogo [Val^4]dDAVP tiene diez veces mayor afinidad por el V2R humano que dDAVP [Manning, M. y col., 2012].

El análogo [Val^{4}Gln^5]dDAVP exhibió un efecto antiproliferativo significativamente mayor que dDAVP en cultivos de células MCF-7, obteniéndose hasta casi un 30% de inhibición de la proliferación celular [Iannucci, N. y col, 2011].

En experimentos previos realizados en el LOM-UNQ, se verificó la expresión del receptor de AVP en la línea celular de carcinoma mamario humano MDA-MB-231. Como se muestra en la figura 10, las células fueron positivas para el fragmento esperado de 508 pb mediante la técnica de RT-PCR. Esta expresión del receptor se corroboró previamente, por otro grupo de investigación, en las células MCF-7 diferenciadas [North, W. y col., 1999].

Por otra parte, se evaluó el efecto antiproliferativo de dDAVP en células MDA-MB-231, resultando en una mayor respuesta antirpoliferativa en esta línea celular en comparación con las células MCF7 con una alta concentración del análogo.

A) B)

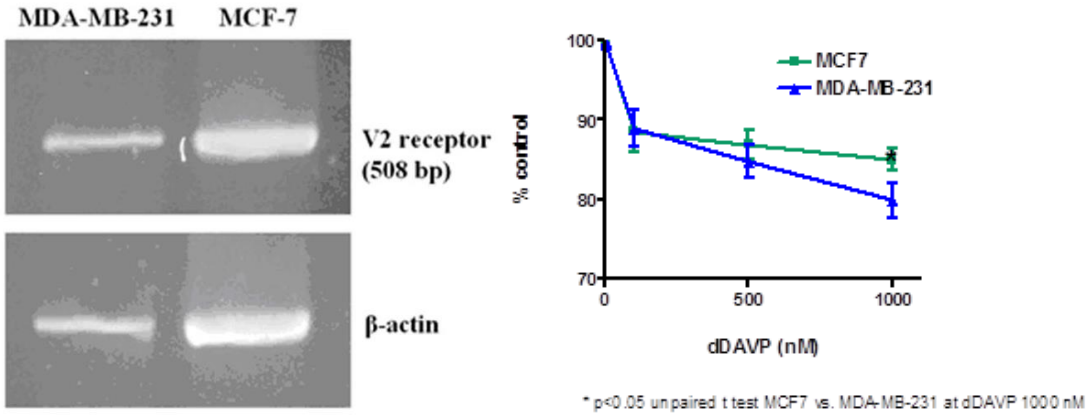


Figura 10: A) Expresión del receptor V2 de AVP en dos líneas de carcinoma mamario humano (MDA-MB-231 y MCF-7). B) Efecto antiproliferativo de dDAVP en células MDA-MB-231 y MCF7.

En LOM-UNQ se investigó la eficacia perioperatoria de la dDAVP en la cirugía de tumores mamarios en perras y se propuso al compuesto como un excelente candidato para la terapia adyuvante a la cirugía de tumores caninos debido a sus efectos antitumorales. Los resultados de esta investigación sugirieron que la administración perioperatoria de dDAVP ayuda a prolongar la supervivencia

global en las perras con tumores en las glándulas mamarias (MGTS) [Hermo, G. y col., 2008]. Como consecuencia de esta investigación, actualmente Biogénesis–Bagó® comercializa la dDAVP en forma de solución inyectable como agente antitumoral perioperatorio en cirugías veterinarias de alto riesgo (figura 11).

Figura 11: Presentación de desmopresina como solución inyectable hemostática perioperatoria para hembras caninas producida por Biogénesis–Bagó®.

2.1.5 Análisis estructural de AVP:

Los espectros de dicroísmo circular (CD) pueden proporcionar valiosa información acerca de la estructura primaria y secundaria, en particular cuando se comparan una serie suficiente de análogos apropiadamente modificados. El análisis de CD sobre un péptido y sus análogos puede conducir a una mayor comprensión de la relación entre la estructura y la actividad fisiológica.

Estudios previos de CD sobre AVP y OT, cuyas diferencias se basan solo en dos aminoácidos, [Phe^3, Arg^8] en AVP, [Ile^3, Leu^8] en OT, indican que las características conformacionales de ambas hormonas son similares, pero se alcanza una mayor rigidez en el esqueleto de AVP, posiblemente debido a la carga positiva aportada por la Arg [Tu, A. y col., 1979].

A partir de ensayos de CD sobre AVP y otras hormonas neurohipofisarias se establecieron ciertas características estructurales: estas sustancias muestran una banda negativa aproximadamente a 210 nm debida a la transición Π-Π* de los grupos amida, una banda positiva a ~ 225 nm compuesta que incluye la transición Π-Π* de la tirosina y la transición n-Π* de los grupos amida y un pico positivo a ~

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

245nm que puede ser asignado a la transición n-σ* del puente disulfuro [Fric, I. y col., 1975].

2.1.6 Estabilidad de péptidos:

La deamidación no enzimática de los residuos de asparagina (Asn) y glutamina (Gln) para producir acido aspártico y acido glutámico en péptidos y proteínas, es un fenómeno bien documentado que puede ocurrir en condiciones fisiológicas [Robinson, N. y Robinson, A., 2001]. Como regla general, la Asn se desamida más fácilmente que la Gln en las posiciones correspondientes [Bischoff, R. y Kolbe, H., 1994].

La deamidación, isomerización y racemización de residuos de Asn parecen ser las principales vías de daño estructural espontáneo en las proteínas celulares [Geiger, T. y Clarke, S., 1986].

Vasta evidencia sugiere que la deamidación de la Asn a pH neutro por lo general, procede a través de un mecanismo de reacción de imida cíclica [Clarke, S., 1987]. Los mecanismos de reacción implican la formación de una imida cíclica de cinco miembros que se somete posteriormente a la apertura del anillo para dar ácido L-aspártico (Asp) y ácido L-isoaspártico (isoAsp) en una relación de aproximadamente 1: 3 [Geiger, T. y Clarke, S., 1986].

La deamidación de residuos de Asn y Gln introduce cargas negativas adicionales a una proteína [Bischoff, R. y Kolbe, H., 1994]. Por lo tanto, para la identificación de las formas deamidadas de la molécula parental se utilizan principalmente técnicas que son sensibles a cambios en la carga superficial como la HPLC. El mapeo de péptidos por HPLC en fase reversa (RP-HPLC) es una herramienta poderosa para detectar y analizar los productos intermedios en la deamidación de péptidos.

Las tasas de deamidación dependen de los aminoácidos cercanos a la Asn y a la Gln en la cadena peptídica. La deamidación a pH neutro y a 37°C se encuentra en el rango de 1-500 días para la Asn y 100-5000 días para la Gln [Robinson, N. y Robinson, A., 2001].

A) B)

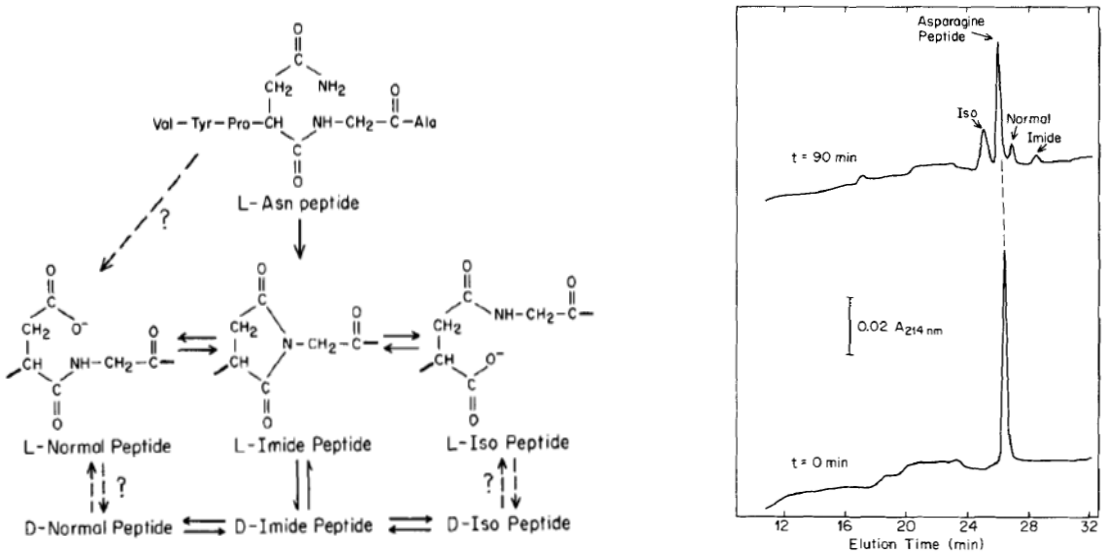


Figura 12: A) Deamidación espontánea, isomerización, y racemización de la asparagina del hexapéptido Val-Tyr-Pro-D-Asn-Gly-Ala. B) Perfil de HPLC del hexapéptido Val-Tyr-Pro-D-Asn-Gly-Ala incubado a 70°C en 0.1 M de buffer fosfato, pH 7.4 a tiempo 0 y 90 minutos. Tomado de Geiger, T. y Clarke, S. 1986.

Terrence Geiger y Steven Clark demostraron la deamidación del péptido Val-Tyr-Pro-D-Asn-Gly-Ala, basado en una parte de la secuencia de la hormona adrenocorticotrófica. En la figura 12B se muestra el perfil de HPLC tomado a tiempo 0 y a los 90 minutos de incubación. A los 90 minutos se indican picos correspondientes a aparagina, ácido isoaspártico, ácido aspártico, y los derivados de succinimida del hexapéptido.

Vastas evidencias obtenidas acerca de la actividad de la dDAVP hacen de esta molécula un compuesto interesante como adyuvante en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, sumado a la escases de tratamientos efectivos para tratar la enfermedad, motiva a la investigación, desarrollo y aplicación de nuevos fármacos que optimicen los tratamientos actuales. Por tal motivo se decidió profundizar los estudios sobre el péptido dDAVP.

Es importante la identificación de la función que cumple cada aminoácido en la secuencia. Esto facilitara el diseño de nuevas estrategias a fin de aumentar la actividad intrínseca de la molécula, su vida media y mejorar la interacción entre el péptido y su correspondiente receptor. De esta manera se podrán obtener

fármacos basados en péptidos con gran potencial de acción, mayor especificidad y aumentada vida media.

2.2 Objetivos:

1- Identificar las posiciones clave que participan en la actividad antiproliferativa de la dDAVP, realizando el análisis de *Alanine-scanning* (Ala-Scan) del péptido sintético. Se pretende conocer la relación estructura-actividad (SAR) que encierra la molécula, lo que conducirá a la identificación de los aminoácidos esenciales como así también de posibles sitios para la sustitución.

2- Diseñar, sintetizar y analizar la actividad antitumoral de un análogo de dDAVP. Esta sustitución, detallada en el cuadro inferior, podría mejorar la capacidad de unión entre la molécula y su receptor; de esta forma se busca aumentar la actividad antiproliferativa del péptido. Se propone que un aumento en la lipofilicidad de la molécula, mejoraría el acomodamiento del péptido en la cavidad hidrofóbica del receptor [Manning, M. y col., 1974].

Análogo sustituido	Secuencia	Objetivo
[Val^4]dDAVP	CYFVNCPrG-NH_2	Aumentar la hidrofobicidad

3- Analizar la conformación de la dDAVP y sus análogos [Val^4]dDAVP y [Val^{4}Gln^5]dDAVP por dicroísmo circular (CD). Se espera que el análisis conformacional de dDAVP y sus análogos brinde información acerca de la existencia de correlación entre la estructura adoptada por la molécula y su actividad antiproliferativa.

4- Estudiar la estabilidad de dDAVP y su análogo mejorado [Val^{4}Gln^5] dDAVP. Se pretende analizar el comportamiento de la molécula en un medio que simule condiciones fisiológicas. En base al conocimiento previo que la Asn y la Gln pueden sufrir deamidación en condiciones fisiológicas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

2.3 Materiales y métodos:

2.3.1 Síntesis de péptidos:

Los péptidos (dDAVP y sus análogos) fueron sintetizados utilizando la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) descripta por Merrifield en 1963. Se utilizó la estrategia de protección N^{α}-Fmoc [Carreño, C. y col, 2000]. La síntesis se llevó a cabo en forma manual utilizando como soporte sólido una resina Fmoc-Rink-Amid provista por Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany), para proporcionar péptidos con el aminoácido C-terminal amidado. En la tabla 6 se muestra una secuencia de los pasos de síntesis que comprenden: desprotección del N^{α}, lavados, acople del aminoácido correspondiente, lavados y nuevamente desprotección.

Tabla 6: Protocolo de síntesis de los péptidos mediante la química *Fmoc.*

PASO	FUNCION	REACTIVO/DISOLVENTE	TIEMPO DE INCUBACION
1	Lavado	DCM	5 x 1 min
2	Lavado	DMF	5 x 1 min
3	Desprotección	Piperidina 20% en DMF	1 x 1 min 2 x 10 min
4	Lavado	DMF	5 x 1 min
5	Lavado	DCM*	5 x 1 min
6	Lavado	DMF	5 x 1 min
7	Acoplamiento	*Fmoc*-Aa-HBTU-DIEA	2 h
8	Lavado	DMF	5 x 1 min
9	Lavado	DCM*	5 x 1 min

DCM: diclorometano, DMF: *N, N*-dimetilformamida, Fmoc-Aa: aminoácidos Fmoc N^{α} protegidos., DIEA: *N,N*-diisopropiletilamina, HBTU: O-Benzotriazole-*N,N,N',N'*-tetrametil-uronium-hexafluoro-fosfato.
*Los pasos de desprotección y acoplamiento fueron analizados cualitativamente a través de la reacción de ninhidrina, excepto para el acople de Pro que se analizó mediante la reacción de cloranilo.

Los péptidos fueron ciclados en fase sólida mediante la desprotección de (Trt)-Mpa y (Trt)-Cys en una solución de ácido trifluoroacético (TFA):DCM:triisopropilsilano (TIS) (2:95:3) durante 1 h a temperatura ambiente, seguido por la oxidación con 10 equivalentes de I_2 en DMF durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La oxidación en fase sólida proporciona un efecto de pseudo-dilución que disminuye la formación de puentes disulfuro intermoleculares [Albericio, F. y col., 2000]. Los péptidos fueron desprotegidos y escindidos de la resina utilizando una solución de TFA:H_2O:TIS (95:2,5:2,5) durante 3 h a temperatura ambiente. Luego los péptidos se precipitaron en éter frío, se lavaron y se resuspendieron en agua.

2.3.2 Purificación y cuantificación de los péptidos:

Los péptidos fueron purificados por RP-HPLC en una columna Ultrasphere ODS C-18 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) usando un gradiente lineal de (10-40) % de acetonitrilo en agua conteniendo 0.05% de TFA durante 30 minutos. Los péptidos fueron cuantificados utilizando un estándar comercial de dDAVP de 1 mg/mL (BCN Peptides, San Quinti de Mediona, Barcelona, España).

2.3.3 Caracterización de péptidos:

Los péptidos fueron identificados en un espectrómetro de masas (Thermo Fisher, San Jose, CA) por ESI-MS en un LCQ-Duo (ion Trap). La figura 13 describe las etapas de la síntesis de dDAVP y el porcentaje de eficiencia en cada paso.

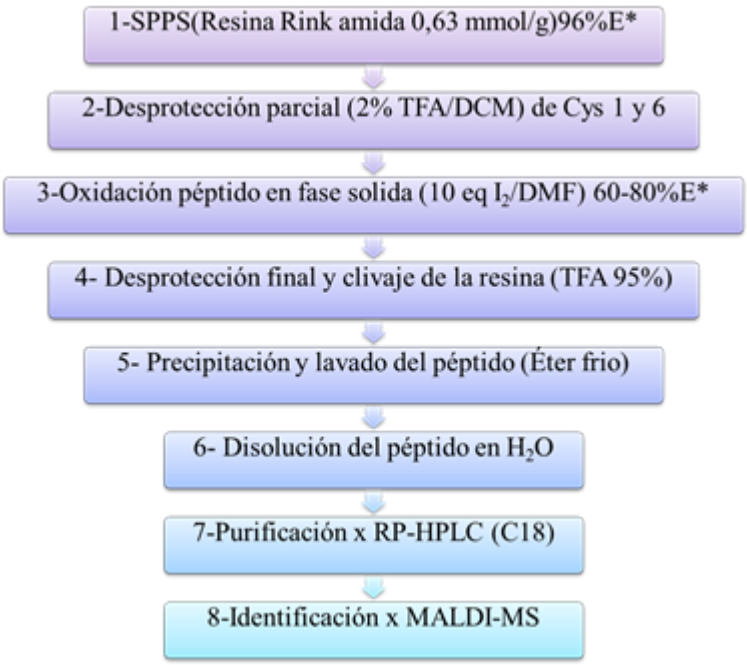


Figura 13: Diagrama de flujo de síntesis de dDAVP y análogos. *%E=porcentaje de eficiencia del paso

2.3.4 Técnica Tea-Bag:

Es un método rápido de síntesis en fase solida utilizada para la obtención de un gran número de péptidos. Esta técnica fue diseñada y desarrollada por Richard Houghten en 1985 y consiste de una bolsa de malla de polipropileno, con unas dimensiones de aproximadamente 15 x 20 mm, llena de perlas de resina, selladas y etiquetadas. El tamaño de poro de la "bolsa de té" permite la entrada de los solventes y disolventes a la vez que evita el escape de las bolillas. Este método posibilita la síntesis de muchos péptidos en simultáneo ya que las bolsas pueden combinarse en reactores comunes para llevar a cabo las etapas de desprotección, lavado y neutralización como puede apreciarse en la figura 14. Luego las bolsas se clasifican en grupos para la adición del siguiente aminoácido.

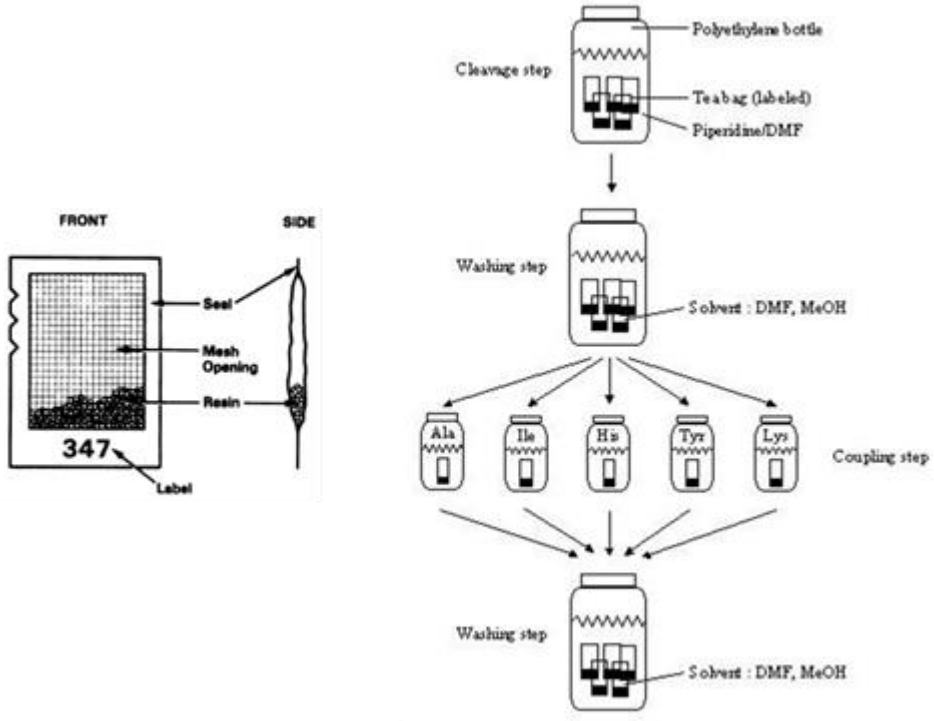


Figura 14: Ilustración de una bolsa de polipropileno etiquetada conteniendo la resina y representación esquemática de la síntesis utilizando la estrategia *tea-bag*. Tomado de Houghten, R., 1985.

2.3.5 Técnica Ala-scanning:

Se basa en la sustitución secuencial de cada aminoácido de una secuencia peptídica por un residuo de alanina con el fin de identificar los aminoácidos que

son cruciales para la actividad biológica [Morrison, K. y Weiss, G., 2001] y [Tam, J. y col., 1994]. Se elige el residuo alanina debido a que es considerado el aminoácido más neutral. Con una α-sustitución, la cadena lateral del residuo alanina es la menos voluminosa de todos los aminoácidos. No es altamente hidrofóbico, no tiene carga y no se une a ningún bolsillo. Estas características resultan fundamentales para el estudio de la relación de la estructura/actividad.

Se sustituyeron secuencialmente por alanina los residuos de las posiciones 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 9 de dDAVP (tabla 7). Las posiciones 1 y 6 involucradas en la formación del puente disulfuro no fueron sustituidas con el fin de mantener el carácter cíclico de los análogos. El ensayo de Ala-Scanning se realizó sobre células MDA-MB-231 a una concentración de péptido de 1 µM (figura 15), consistente con un importante efecto antiproliferativo del compuesto parental sobre células en fase logarítmica de crecimiento.

Tabla 7: Análogos de dDAVP sustituidos en las posiciones 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 9 por una alanina. La letra de color indica la posición que ha sido sustituida por alanina.

Péptido	Secuencia
dDAVP	CYFQNCPrG-NH_2
[Ala^2] dDAVP	CAFQNCPrG-NH_2
[Ala^3] dDAVP	CYAQNCPrG-NH_2
[Ala^4] dDAVP	CYFANCPrG-NH_2
[Ala^5] dDAVP	CYFQACPrG-NH_2
[Ala^7] dDAVP	CYFQNCArG-NH_2
[Ala^8] dDAVP	CYFQNCPAG-NH_2
[Ala^9] dDAVP	CYFQNCPrA-NH_2

Los péptidos del *Ala-Scanning* fueron sintetizados en fase sólida usando la protección N^{α}-Fmoc, siguiendo la estrategia *tea-bag* descripta por Houghten en 1985.

Figura 15: viales con los péptidos fraccionados para los ensayos *in vitro.*

2.3.6 Análisis Conformacional por dicroísmo circular (CD):

El análisis por dicroísmo circular se realizó usando un espectropolarímetro Jasco J-715. Tres conjuntos de muestras de péptido (dDAVP, [Val^4]dDAVP y [Val^4,Gln^5]dDAVP) se prepararon en agua, buffer fosfato (PBS) 2 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM y en presencia del 30 % de un co-solvente inductor de estructura helicoidal (TFE). Las muestras se escanearon desde 200 hasta 260 nm con un ancho de banda de 0,5 nm, tiempo de respuesta de 0,5 segundos a una velocidad de barrido de 50 nm/minuto en una celda de 0,2 cm con 10 acumulaciones por muestra. Las muestras fueron tomadas preparando soluciones a 1 mg/ml a las que se adicionaron 35 µl para un volumen final en la cubeta de 250µl.

2.3.7 Ensayo de estabilidad:

dDAVP, su análogo mejorado [Val^4,Gln^5]dDAVP y sus respectivas secuencias lineales se incubaron en buffer $NaHCO_3$/NaOH, pH 11 a diferentes tiempos y temperaturas. Se evaluó el comportamiento de las secuencias mencionadas ante la hidrólisis ácida en buffer KCl/HCl, pH2 a diferentes tiempos y temperaturas. La determinación de la composición de las mezclas se realizó por RP-HPLC en una columna Ultrasphere ODS C-18 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) usando un gradiente lineal de (10-40) % de acetonitrilo en agua conteniendo 0.05% de TFA durante 30 minutos. Luego los picos extraídos fueron identificados mediante la técnica de espectrometría de masas en un espectrómetro de masas (Thermo Fisher, San Jose, CA) por ESI-MS en un LCQ-Duo (ion Trap).

2.3.8 Condiciones de cultivo y líneas celulares:

La línea celular de carcinoma mamario humano invasivo MDA-MB-231 (ATCC Cat.# HTB-26) se cultivó en forma rutinaria en medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY) más suero fetal bovino al 10% (FBS), 2 mM de glutamina y 80 mg/ml de gentamicina. Se realizó el cultivo en monocapa a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO_2. La línea celular dependiente de hormonas MCF-7 (ATCC Cat.# HTB-22), un carcinoma de mama humano bien diferenciado, también fue utilizado como referencia de células positivas para la expresión del receptor V2.

2.3.9 Ensayos de crecimiento in vitro:

El efecto antiproliferativo de la dDAVP y sus análogos fue evaluado en cultivos de células de cáncer mamario invasivo MDA-MB-231. Se utilizó un rango de concentración de péptidos de 100 nM a 1,5 μM con una exposición de 3 días de células en fase logarítmica de crecimiento. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos (2,5-5 × 10^3 células/well) en DMEM con 10% de SFB. Después de 24 h, se añadieron las diferentes concentraciones de los péptidos y se continuó el cultivo durante 72 h luego de lo cual se evaluó la viabilidad de las células mediante el ensayo colorimétrico 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Ensayos realizados en LOM-UNQ.

2.4 Resultados y discusión:

2.4.1 Identificación de residuos clave en dDAVP:

La tabla 8 muestra los resultados de la caracterización por RP-HPLC y MALDI-MS para la dDAVP y los analogos sustituidos. Además, el peso molecular experimental coincidió con el teórico.

Tabla 8: Ala-Scanning de dDAVP. La letra subrayada indica la posición en la que un aminoácido ha sido sustituido por A. A, alanina (Ala); Y, tirosina (Tyr); F, phenylalanina (Phe); Q, glutamina (Gln); N, asparagina (Asn); C, cisteína (Cys); P, prolina (Pro); r, D-arginina (D-Arg); G, glicina (Gly); dDAVP, 1-desamino-8-D-arginina vasopresina; Mpa, ácido 3-mercaptopropiónico; RT, tiempo de retención; PM, peso molecular.

Péptido	Secuencia	RT(min)	PM en Da, experimental (Teórica)
dDAVP	MpaYFQNCPrG-NH_2	24.7	1068.45 (1068.24)
[Ala^2]dDAVP	Mpa<u>A</u>FQNCPrG-NH_2	20.3	976.40 (976.14)
[Ala^3]dDAVP	MpaY<u>A</u>QNCPrG-NH_2	15.5	992.41 (992.14)
[Ala^4]dDAVP	MpaYF<u>A</u>NCPrG-NH_2	26.3	1011.54 (1011.18)
[Ala^5]dDAVP	MpaYFQ<u>A</u>CPrG-NH_2	28.1	1025.45 (1025.21)
[Ala^7]dDAVP	MpaYFQNC<u>A</u>rG-NH_2	23.7	1042.58 (1042.20)
[Ala^8]dDAVP	MpaYFQNCP<u>A</u>G-NH_2	24.9	983.77 (983.13)
[Ala^9]dDAVP	MpaYFQNCPr<u>A</u>-NH_2	25.3	1082.49 (1082.26)

La relación de actividad antiproliferativa estructural de dDAVP se realizó en la línea celular MDA-MB-231 agresiva. La concentración de péptidos fue de 1 µM, que ejerce un efecto antiproliferativo significativo de dDAVP en células en fase logarítmica.

Los resultados del Ala-Scan demostraron la importancia de los aminoácidos situados en el bucle de dDAVP para la actividad antiproliferativa. La actividad se redujo hasta un 60% cuando se sustituyeron los aminoácidos 2-5 (figura 16). Se conservó el efecto citostático sobre las células en crecimiento de la fase logarítmica cuando los aminoácidos en las posiciones 7 y 8 se sustituyeron y se redujeron parcialmente cuando la sustitución se produjo en la posición 9 (figura 16).

Como se mencionó, los resultados de la Ala-Scan demostraron la importancia de los aminoácidos situados en el bucle de dDAVP para la actividad antiproliferativa (figura 16).

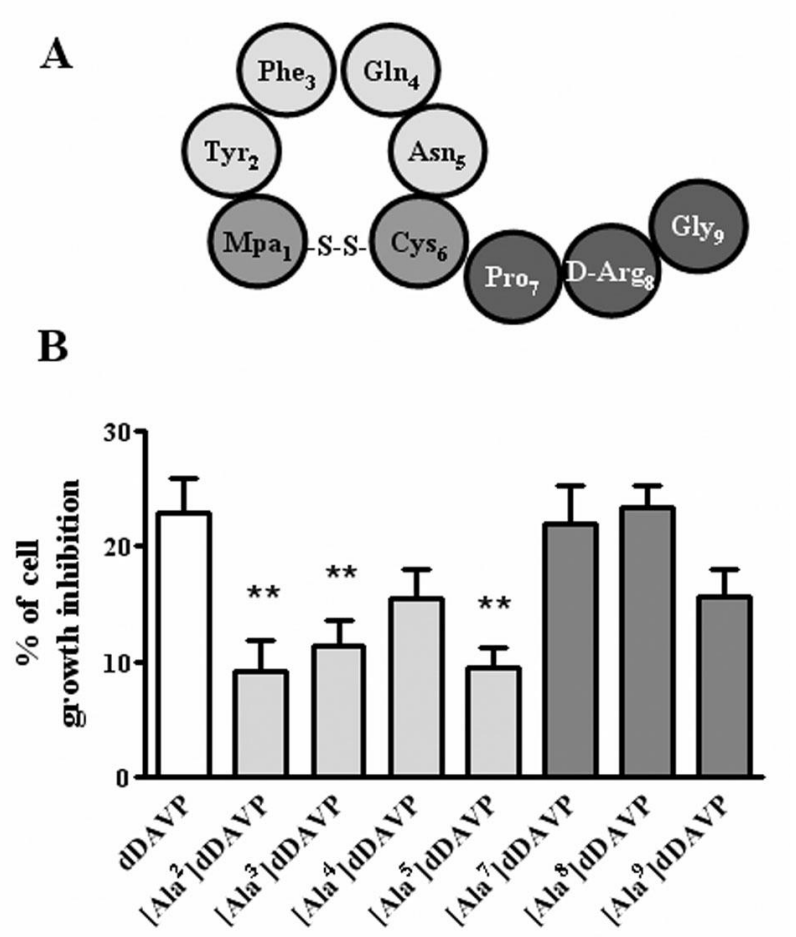


Figura 16: Análisis de Ala-Scan de dDAVP en células de cáncer de mama MDA-MB-231. (A) Representación esquemática de dDAVP. (B) Inhibición del crecimiento después de una exposición de 72 horas a dDAVP en células que crecen en fase logarítmica a una concentración de péptido de 1 µM. Los datos se presentan como la media ± error estándar. ** P <0,01, frente a dDAVP; Análisis de varianza más prueba de Dunnett. Mpa, ácido 3-mercaptopropiónico; Tyr, tirosina; Phe, fenilalanina; Gln, glutamina; Asn, asparagina; Cys, cisteína; Pro, prolina; D-Arg, D-arginina; Gly, glicina; dDAVP, 1-desamino-8-D-arginina vasopresina.

En consonancia con estos resultados, la tabla 9 muestra la clasificación de los residuos de dDAVP en tres grupos de acuerdo con la reducción de la actividad antiproliferativa del análogo resultante.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tabla 9: Clasificación de los residuos de dDAVP de acuerdo a su rol en la actividad antiproliferativa del compuesto.

Grupo	Residuos	% de reducción de la actividad antiproliferativa	Característica
I	2, 3, 5	50-60	Crucial para la actividad antiproliferativa
II	4, 9	30	Tolerante a la sustitución
III	7,8	0-5	No relacionada a la actividad antiproliferativa

El resultado de la relación estructura-actividad antiproliferativa de dDAVP en células de carcinoma de mama MDA-MB-231 evaluada mediante la técnica Ala-Scan destaca el papel de los aminoácidos situados en el bucle del péptido (Tabla 9). Los aminoácidos 2, 3 y 5 pueden ser cruciales para la interacción agonista con el V2R como se postuló en un estudio de modelado molecular [Czaplewski, C. y col., 1998], que conduce a los efectos antitumorales sobre las células de cáncer de mama que expresan el receptor V2. El residuo 4, así como el residuo 9, parecen ser tolerantes a la sustitución por Ala, ya que la actividad se redujo sólo parcialmente. Por el contrario, los residuos 7 y 8 situados en la cola del péptido resultan indiferentes a la sustitución de Ala.

Nuestros resultados actuales están en buen acuerdo con otros informes sobre el papel clave de la parte N-terminal de la molécula (ciclo) en las actividades fisiológicas de la hormona AVP [Manning, M. y col., 2008 y 2012], [Kowalczyk, W. y col., 2006] y [Iannucci, N. y col., 2011].

2.4.2 Actividad antiproliferativa de un análogo de dDAVP:

Como se mencionó, estudios previos han confirmado que el análogo de dDAVP, [Val^{4}Gln^5]dDAVP, sustituido en posición 4 por una valina y en posición 5 por una glutamina, mejora la actividad antiproliferativa. Por otro lado, se sabe que el incremento de la hidrofobicidad en la posición 4 mejora la interacción de los análogos de AVP con el V2R reportando que el análogo [Val^4]dDAVP tiene diez veces mayor afinidad por el V2R humano que dDAVP [Manning, M. y col., 2012]. Teniendo esto como premisa, se decidió introducir solo la sustitución de la valina por la glutamina en posición 4, obteniendo de esta manera el análogo [Val^4]dDAVP.

La tabla 10 muestra el resultado de la caracterización por RP-HPLC y MALDI-MS para dDAVP y su analogo sustituido. El tiempo de retención en RP-HPLC es más largo que el de dDAVP, evidenciando el aumento de la hidrofobicidad. Se puede observar que el peso molecular experimental coincide con el teórico.

Tabla 10: dDAVP y su análogo sustituido por valina en posición 4. Nombre, secuencia y características fisicoquímicas de dDAVP y su análogo modificado. Y, tirosina (Tyr); F, phenylalanina (Phe); Q, glutamina (Gln); N, asparagina (Asn); C, cisteína (Cys); P, prolina (Pro); r, D-arginina (D-Arg); G, glicina (Gly); dDAVP, 1-desamino-8-D-arginina vasopresina; Mpa, ácido 3-mercaptopropiónico; RT, tiempo de retención; PM, peso molecular.

Péptido	Secuencia	RT (min)	MW (Da)Experimental(Teórica)
dDAVP	MpaYFQNCPrG-NH_2	24.7	1068.45 (1068.24)
[Val^4]dDAVP	MpaYFVNCPrG-NH_2	29.3	1039.47 (1039.24)

La figura 17 representa el ensayo de proliferación de células MDA-MB-231 a diferentes concentraciones de dDAVP y su análogo [Val^4]dDAVP.

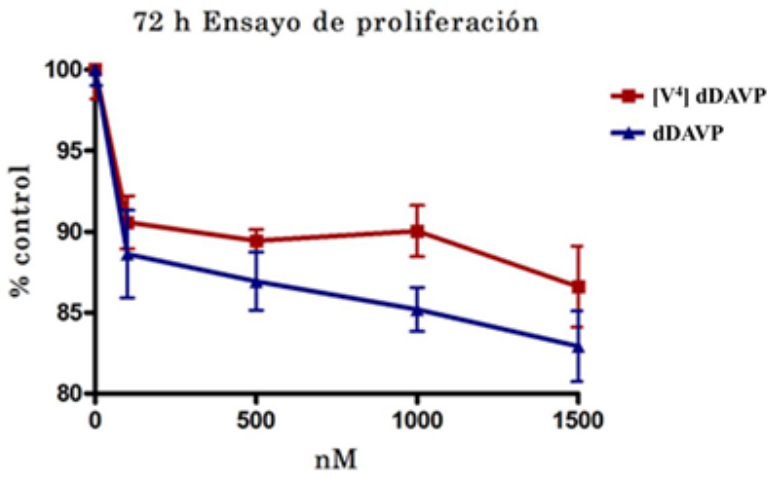


Figura 17: Actividad antiproliferativa a diferentes concentraciones (100 nM a 1.5µM) de dDAVP (azul) y su análogo [Val^4]dDAVP (rojo), en células de cáncer de mama MDA-MB-231.

El análogo [Val^4]dDAVP no mostró mejora en la actividad, sino lo contrario, posee menor actividad que dDAVP. Estos resultados suponen que la presencia de la glutamina en la secuencia, tanto en posición 4, caso de la dDAVP como en posición 5, caso de [Val^{4}Gln^5]dDAVP resulta fundamental, se ha reportado que la

glutamina juega un rol importante en el mantenimiento de la estructura [A. Buku y col., 1987]. Este resultado también podría suponer un efecto sinérgico de los aminoácidos valina y glutamina en el caso del análogo [Val^{4}Gln^5]dDAVP.

2.4.3 Dicroísmo circular de dDAVP y sus análogos [Val^4]dDAVP y [Val^{4}Gln^5]dDAVP

En la figura 18 se puede observar el espectro de Dicroísmo Circular de dDAVP (verde) y dos de sus análogos, el que ha mostrado mayor actividad antiproliferativa, [Val^{4}Gln^5]dDAVP (rojo) y [Val^4]dDAVP (azul). La desviación en el plano de la luz polarizada se debe al cambio en el índice de refracción entre la luz polarizada circular a la izquierda y a la derecha. La distorsión de este plano genera una elipse: La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros de estos fenómenos, esto es, gráficos de elipticidad versus la longitud de onda.

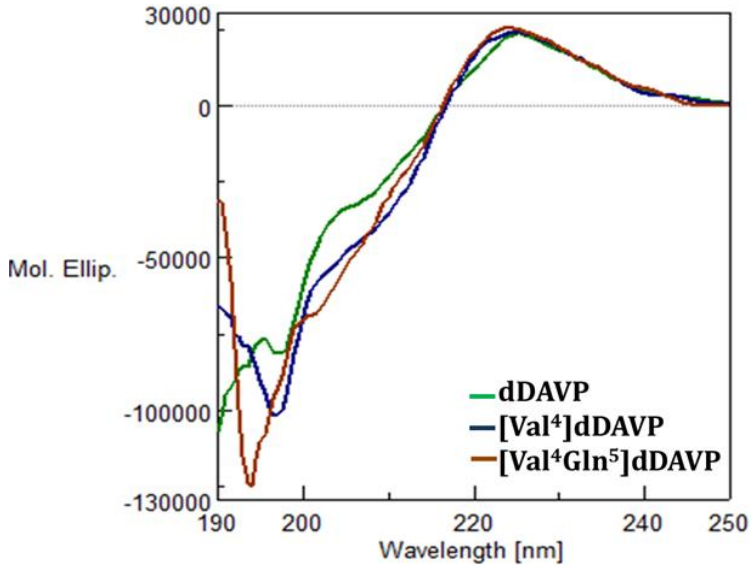


Figura 18: Espectro de CD de dDAVP, [Val^4]dDAVP y [Val^{4}Gln^5]dDAVP en 2 mM de PBS.

Los espectros de CD de dDAVP y sus análogos muestran considerables similitudes. Los tres compuestos presentan principalmente estructura de Random coil. Todas las sustancias mostraron una banda positiva característica a aproximadamente

225 nm debido a la presencia de la tirosina en la posición 2. En la región de 200 nm se observan un par de bandas negativas; la banda de longitud de onda más larga se debe a la transición Π - Π* de los grupos amida y la segunda longitud de onda más corta uno cerca de 195 nm es debido a la presencia del grupo aromático de la tirosina. El análogo VQ presenta mas estructuración que dDAVP y VN, esto podría ser la razón de su mayor actividad antiproliferativa.

2.4.4 Estabilidad de dDAVP y su análogo [Val⁴Gln⁵]dDAVP

Con miras al potencial desarrollo de un ingrediente farmacéutico activo se analizó la estabilidad de la dDAVP y su análogo mejorado [Val⁴Gln⁵]dDAVP frente al proceso de deamidación. La tabla 11 representa el porcentaje y la masa de deamidación de las versiones cíclicas y lineales de dDAVP y su análogo mejorado [Val⁴Gln⁵]dDAVP. Se puede observar a las 48 h de incubación, que la deamidación de dDAVP es de aproximadamente un 44% mientras que su analogo[Val⁴Gln⁵]dDAVP solo sufre un 2% de deamidación.

Tabla 11: Deamidación de dDAVP, su análogo[Val⁴Gln⁵]dDAVP y sus respectivas versiones lineales. Concentración inicial 0.33 mg/mL en buffer $NaHCO_3$ 50 mM/NaOH, pH 11.2, temperatura ambiente (TA).

	Tiempo (h)	% Deamidación	Masa Deamidado (µg)
dDAVP	0	0	0
	3	0	0
	24	9,1	30
	48	44	150
[Val⁴Gln⁵]dDAVP	0	0	0
	3	0	0
	24	1	3,3
	48	2	6,6
dDAVP Lineal	0	0	0
	3	32	105,6
	24	100	330
	48	100	330
[Val⁴Gln⁵]dDAVP Lineal	0	0	0
	3	80	264
	24	100	330
	48	100	330

% Deamidación = (masa deamidado/masa total) x 100

Los resultados evidencian que dDAVP se desamida con mayor facilidad y velocidad que su análogo [Val^{4}Gln^5]dDAVP. Este efecto se debe principalmente al hecho que dDAVP contiene los dos aminoácidos sensibles al proceso de deamidación, en particular Asn, el más propenso al proceso, mientras que su análogo solo tiene uno, Gln. Como se puede observa en la tabla 11, las versiones lineales se desaminan con mayor facilidad que las versiones cicladas. Lo que demuestra la importancia del ciclo en la estabilidad de la molecula.

La figura 19 muestra los perfiles de HPLC de dDAVP (QN), su análogo [Val^{4}Gln^5]dDAVP (VQ) y sus versiones lineales incubados en buffer $NaHCO_3$/NaOH a pH 11, a diferentes tiempos y temperaturas.

En el caso de dDAVP se pueden apreciar los picos característicos del proceso de deamidación reportados por Geiger, T. y Clarke, S. a las 48 h se ven los picos correspondientes a asparagina, ácido isoaspártico, ácido aspártico, y los derivados de succinimida (figura 12).

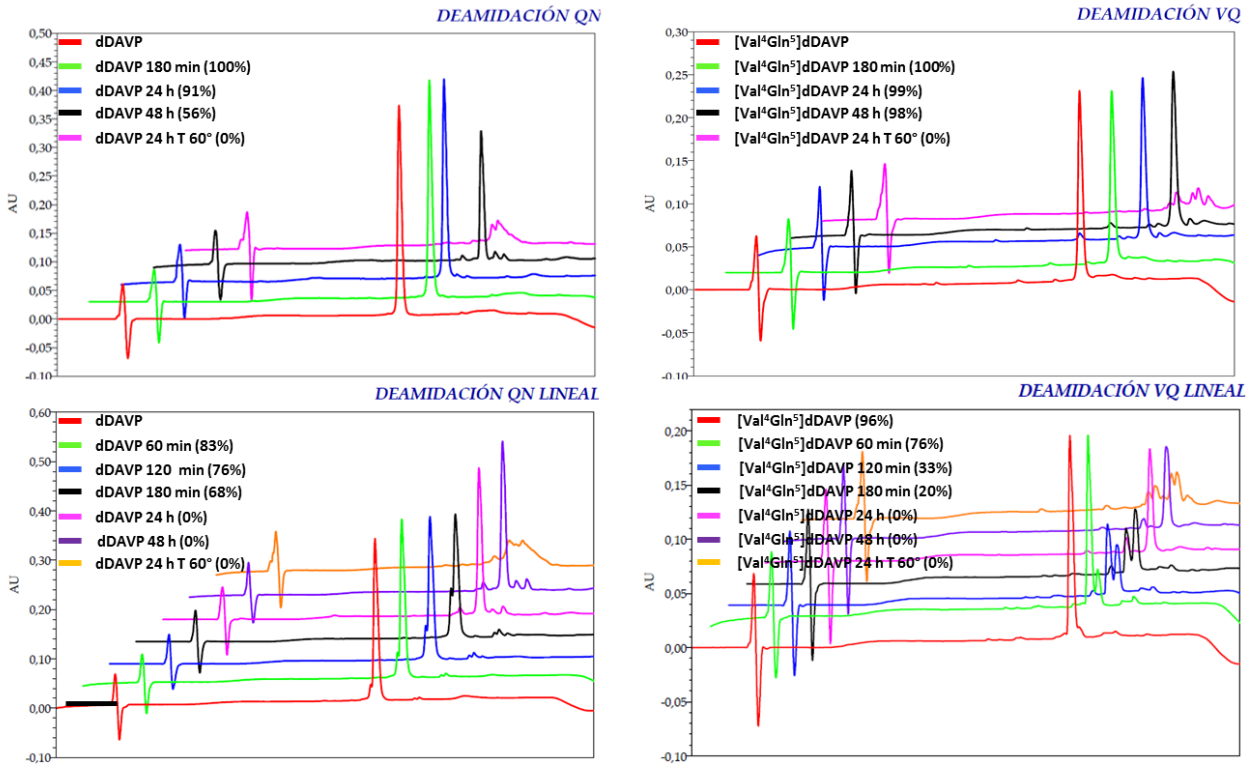


Figura 19: Deamidación de dDAVP (QN), su análogo[Val^{4}Gln^5]dDAVP (VQ) (paneles superiores) y sus respectivas versiones lineales (paneles inferiores) a diferentes tiempos y temperatura. Se indica el porcentaje de molécula no amidada.

La tabla 12 representa el porcentaje y la masa de hidrólisis acida de las versiones cíclicas y lineales de dDAVP y su análogo mejorado [Val^{4}Gln^5]dDAVP. Se puede observar que las versiones cicladas a temperatura ambiente no sufren el proceso de hidrólisis pero si a altas temperaturas.

Tabla 12: Hidrólisis ácida de dDAVP, su análogo [Val^{4}Gln^5]dDAVP y sus respectivas versiones lineales. Concentración inicial 0.33 mg/mL en buffer KCl 0.2 M/HCl 0.2 M, pH 2.0, TA y 60°C por 24 y 48 h.

	T (°C) / t (h)	**TA**	**TA**	**60°C**	**60°C**
		% Hidrolizado	Masa H (µg)	% Hidrolizado	Masa H (µg)
dDAVP	24	0	0	43	141,9
	48	0	0	100	330
[Val^{4}Gln^5]dDAVP	24	0	0	75	247,5
	48	0	0	88	290,4
dDAVP Lineal	24	7	23,1	46	151,8
	48	11	36,3	84	277,2
[Val^{4}Gln^5]dDAVP Lineal	24	0	0	43	141,9
	48	4	13,2	78	257,4

*% Hidrolizado = (masa hidrolizado/masa total) x 100

Con la hidrólisis acida se destruyen los aminoácidos Trp (triptófano), mientras que la Asn (asparagina) y la Gln (glutamina) se convierten en sus respectivos acidos Glu (acido glutámico) y Asp (acido aspártico) [Fountoulakis, M. y Lahm, H. 1998]. Como se puede observar los ciclos estarían protegiendo a los péptidos de la conversión de estos aminoácidos en acidos que en el caso de las versiones lineales quedan expuestos y sufren de hidrólisis. Particularmente, la dDAVP lineal se hidroliza con mayor facilidad que su análogo debido a que posee Asn y Gln mientras que [Val^{4}Gln^5]dDAVP lineal solo posee Gln.

La figura 20 representa los perfiles de HPLC de dDAVP (QN), su análogo [Val^{4}Gln^5]dDAVP (VQ) y sus versiones lineales incubados en buffer KCl 0.2 M/HCl 0.2 M, pH 2.0 a temperatura ambiente (TA) y a 60°C por 24 h y 48 h. Ambas versiones cicladas se mantienen estables ante el proceso de hidrólisis a temperatura ambiente.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

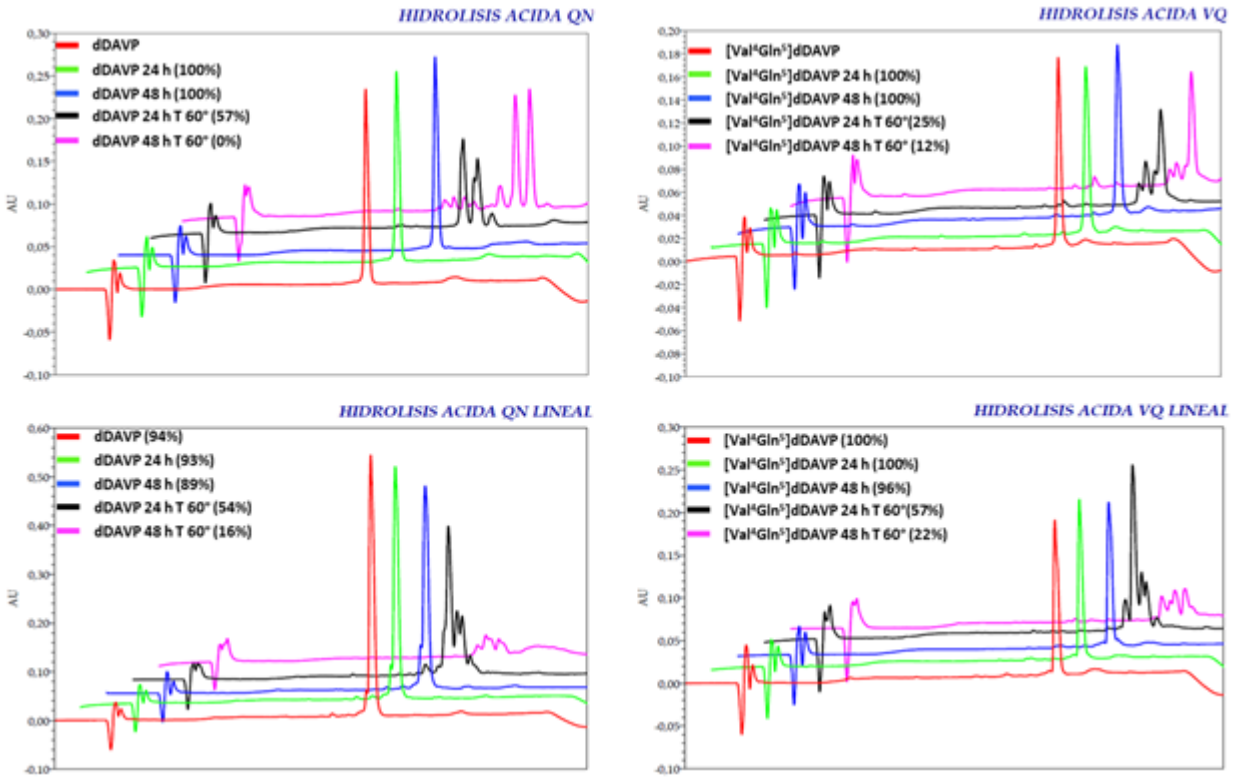


Figura 20: Hidrólisis acida de dDAVP (QN), su análogo[Val⁴Gln⁵]dDAVP (VQ) (paneles superiores) y sus respectivas versiones lineales (paneles inferiores) a diferentes tiempos y temperatura. Se indica el porcentaje de molécula no hidrolizada.

2.5 Conclusiones:

El ensayo de Ala-Scan permitió demostrar la existencia de una estrecha relación entre el bucle de dDAVP y su actividad antiproliferativa, como se ensayó sobre las células MDA-MB-231. Este conocimiento podría conducir a nuevas posibilidades para el diseño de análogos de dDAVP con mejores propiedades antitumorales.

A partir de los ensayos de CD se puede concluir que el análogo [Val^{4}Gln^5]dDAVP cuyo mínimo a 194nm es de mayor magnitud, presenta una estructura más definida que los otros análogos (figura 18). Posiblemente signifique que este guarda un grado mayor de polarización en uno de los enlaces presentes en el péptido. Lo que podría explicar la razón de una mayor actividad antiproliferativa de [Val^{4}Gln^5]dDAVP con respecto a dDAVP y a [Val^4]dDAVP.

La estructura corresponde a random coil debido a que los péptidos están ciclados y no tienen la libertad necesaria para adoptar una estructura plenamente, el segundo valor de mayor magnitud es poliprolina (PP2); que corresponde a una hélice elongada, esto guarda similitud con la estructura de los péptidos ciclados. Las ligeras diferencias entre los péptidos se deben a los cambios realizados en la secuencia que permiten mayores grados de libertad en los distintos solventes.

El análogo mejorado [Val^{4}Gln^5]dDAVP presenta mayor estabilidad que su molécula parental ante la deamidación. Ambos péptidos ciclados muestran estabilidad ante el proceso de hidrólisis acida. En cuanto a las versiones lineales, el análogo [Val^{4}Gln^5]dDAVP mostró mayor estabilidad que dDAVP, asimismo se desaminan con mayor facilidad evidenciando que el ciclo brinda mayor estabilidad a los peptidos. Los datos estructurales y las estabildades serán de gran ayuda para los análisis clínicos que se están llevando a cabo con dDAVP y su análogo mejorado [Val^{4}Gln^5]dDAVP.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3 Capítulo II:

Síntesis y aplicación de derivados arilados del triptófano en el desarrollo de compuestos antimicrobianos nóveles.

3.1 Introducción:

3.1.1 Péptidos antimicrobianos:

Desde el origen de la vida, existen millones de microorganismos, algunos de ellos potencialmente patógenos para otros seres vivos. Tanto plantas como animales, han evolucionado luchando contra el ataque de numerosos microbios gracias a diversos mecanismos de defensa innata que es activada ante el contacto con agentes extraños. Entre estos mecanismos se encuentran las proteínas de bajo peso molecular utilizadas por organismos superiores para defenderse de una amplia gama de microbios, incluyendo bacterias, hongos, virus y protozoos. Estas proteínas de origen natural, llamadas actualmente péptidos antimicrobianos (AMPs), son antibióticos endógenos producidos por organismos que poseen el potencial para eliminar microorganismos sin afectar a las células eucariotas por lo que han cumplido un papel fundamental en la exitosa evolución de organismos multicelulares complejos [Zasloff, M. 2003].

La primera evidencia de este tipo de péptidos aconteció en la década de 1920 con el descubrimiento de la lisozima, péptido con actividad antimicrobiana, por Alexander Fleming. Sin embargo, como su mecanismo de acción involucra la destrucción enzimática de la pared celular bacteriana, no se consideró en aquel momento que perteneciera a la categoría de AMPs, ya que estos utilizan por lo general mecanismos no enzimáticos.

Con el advenimiento de la penicilina y la estreptomicina en 1943 [Bentley, R. 2009], comenzó la "Edad de Oro" de los antibióticos, que llevó a una rápida pérdida de interés en el potencial terapéutico de los antibióticos naturales del huésped tales como la lisozima.

En 1939, se descubrieron las gramicidinas aisladas a partir de *Bacillus brevis,* que exhiben actividad tanto *in vitro* como *in vivo* contra una amplia gama de bacterias Gram-positivas (Gram +) [Dubos, R. 1939]. Las gramicidinas fueron los primeros AMPs en ser fabricados comercialmente como antibióticos [Van Epps, H. 2006].

En 1942, Balls y colaboradores lograron cristalizar una proteína del endospermo del trigo blando *Triticum aestivum L.*, material que más tarde fue nombrado purotionina y el cual inhibe el crecimiento de una variedad de fitopatógenos, tales como *Pseudomonas solanacearum* y *Xanthomonas campestris* [Fernández, R. y col., 1972].

A principios de la década de 1960, con el surgimiento de microbios patógenos resistentes a múltiples fármacos, comenzó el final de la "Edad de Oro" de los antibióticos, despertándose el interés por los AMPs.

Actualmente, el indiscriminado uso de antibióticos para fines médicos y no médicos ha conducido a la emergencia de bacterias patógenas con multiresistencia a drogas a una velocidad alarmante. Ejemplos recientes de lo expuesto, son las bacterias *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina (ERV) y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (EARM) [Purrello, S. y col., 2014]. Lo que conduce a una necesidad urgente de nuevos antibióticos con diferentes mecanismos de acción antimicrobiana.

En la búsqueda de una solución a este problema, los científicos han focalizado su atención en los AMPs a fin de obtener agentes antimicrobianos con aplicación en la producción de alimentos y como agentes terapéuticos. Esto sumado al hecho de que existe poca evidencia de la resistencia microbiana a los AMPs [Peschel, A. y Sahl, H., 2006], los convierte en moléculas con gran potencial para su uso como antibióticos. Al presente, se conocen más de 2.000 AMPs y su caracterización ha demostrado que la gran mayoría de estos péptidos son catiónicos.

El tamaño, la secuencia, la carga, la conformación, la estructura secundaria, la hidrofobicidad, y la anfipaticidad de los AMPs constituyen las principales características para la determinación de su actividad y especificidad.

3.1.2 Modo de acción de los péptidos antimicrobianos:

Los AMPs interactúan inicialmente con la membrana externa y/o interna de las bacterias. Este primer punto de interacción entre los péptidos y sus blancos a menudo suele ser el sitio de acción antimicrobiana, al interferir con la función de la membrana causando la muerte de la célula bacteriana [Shai, Y., 2002].

La diferencia más notable de las membranas citoplasmáticas entre las células procariotas y eucariotas es la función, composición y el arreglo topológico de los lípidos. La superficie externa de las membranas celulares de mamíferos está compuesta exclusivamente por fosfolípidos zwitteriónicos, principalmente fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina, mientras que las membranas bacterianas contienen grandes cantidades de fosfolípidos cargados negativamente, fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL) [Matsuzaki, K. 1999] y [Hoskin, D. y Ramamoorthy, A. 2008].

Las membranas externas de las bacterias (Gram -) están cubiertas por lipopolisacáridos (LPS) polianiónicos. Los AMPs interactúan selectivamente con las membranas bacterianas cargadas negativamente por interacción electrostática y ejercen actividad antimicrobiana por permeabilización de las membranas celulares [Uematsu, N y Matsuzaki, K. 2000]. Como muestra la figura 21, las fuerzas impulsoras son las interacciones hidrofóbicas entre los aminoácidos ácidos no polares y el núcleo hidrofóbico de la membrana, y las interacciones electrostáticas entre las cargas positivas de los péptidos y las cargas negativas de los lípidos [Matsuzaki, K. 1999].

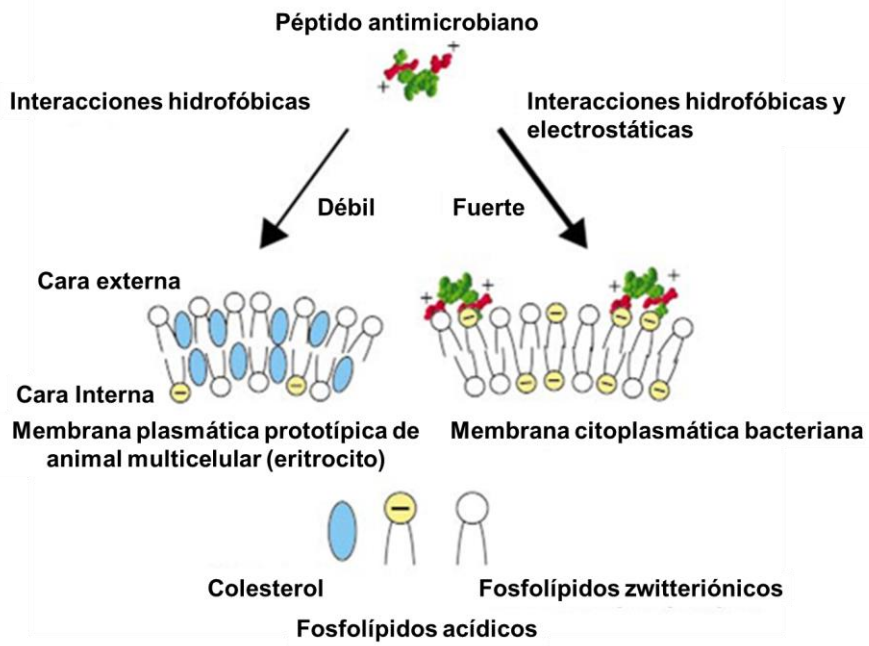


Figura 21: La membrana como blanco de los AMPs en bacterias y organismos multicelulares y la base de su especificidad. Modificado de Zasloff, M. 2003.

El mecanismo de acción de la mayoría de los AMPs catiónicos (cAMPs), es la ruptura de la membrana plasmática microbiana. Proceso que involucra dos pasos, el primero es la unión del péptido a la membrana microbiana, gobernada principalmente por interacciones electrostáticas, y el segundo, la inserción del péptido relacionada con interacciones hidrofóbicas [Papo, N. y Shai, Y. 2003].

Se han propuesto algunos modelos para explicar el mecanismo de acción de los AMPs. La figura 22 representa algunos de los modelos de interacción de los AMPs con las membranas celulares bacterianas: en el modelo de **barril bastón** los péptidos interactúan con la membrana, alcanzan una concentración umbral y se insertan en la membrana para formar poros de péptido alineado, forman estructuras micelares en el modelo de **alfombra**, o forman poros de péptidos y lípidos alineados en el modelo de **poro toroidal**. En el modelo de **electroporación** molecular, los péptidos catiónicos se asocian con la membrana bacteriana generando una diferencia de potencial eléctrico lo que hace que la membrana se vuelva transitoriamente permeable a diversas moléculas, incluyendo los propios péptidos [Nguyen, L. y col., 2011].

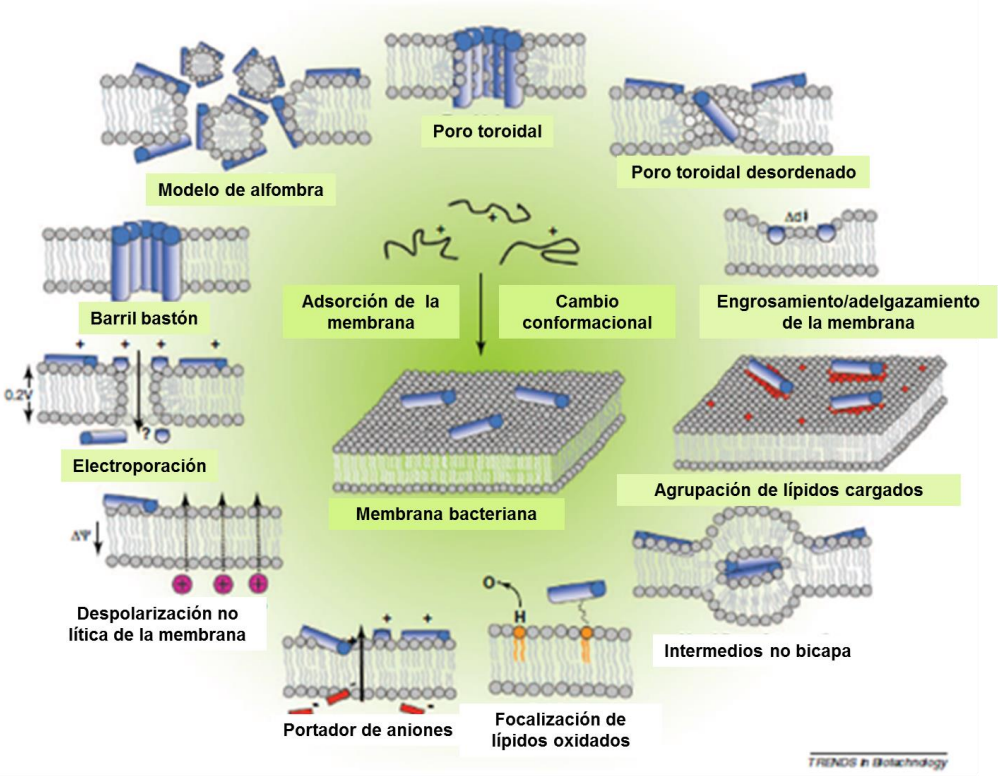


Figura 22: Modelos clásicos de interacción de AMPs con la membrana bacteriana. Modificado de Nguyen, L. y col., 2011.

No todos los AMPs despliegan su actividad a través de la membrana. Un gran número de AMPs actúan sobre blancos intracelulares de las bacterias inhibiendo la síntesis de proteínas de la membrana, interactúan con el ADN o ARN, o inhiben algún tipo de actividad enzimática [Brogden, K. 2005]. Cada vez hay más pruebas que indican que los péptidos antimicrobianos tienen otras dianas intracelulares, como se puede observar en la figura 23.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

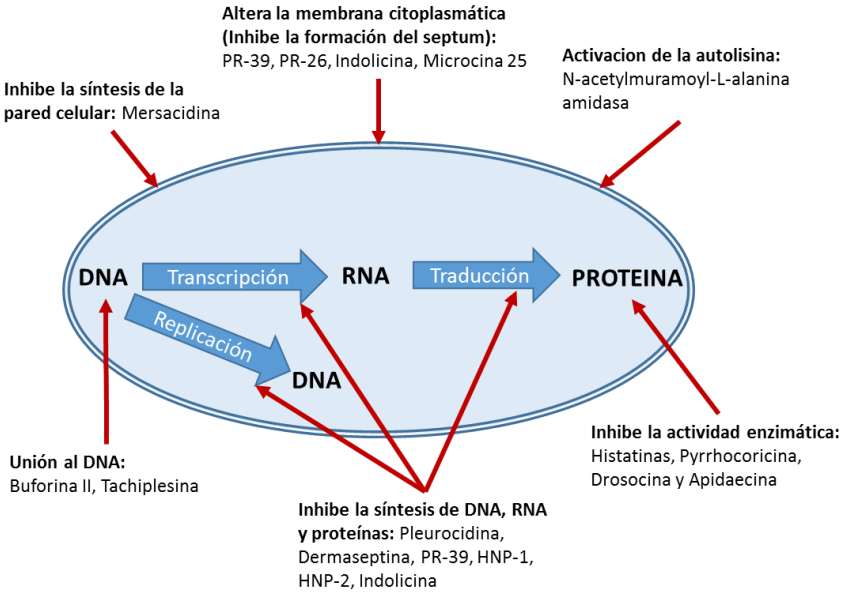


Figura 23: Modo de acción para la actividad intracelular de péptidos antimicrobianos. Tomado de Brogden, K. 2005.

Dos características físicas principales de los AMPs son, su carga catiónica y la proporción significativa de residuos hidrofóbicos en su secuencia. En este sentido, un subconjunto importante son los péptidos ricos en residuos de Arg y Trp, tales como indolicidina y tritrpticina. Estos poseen una actividad antimicrobiana potente y de amplio espectro [Schibli, D. y col., 2002] y [Chan, D. y col., 2006].

Los residuos Trp tienen una clara preferencia por la región interfacial de las bicapas lipídicas, mientras que los residuos Arg dotan a los péptidos con cargas catiónicas y propiedades de unión de hidrógeno necesario para la interacción con los abundantes componentes aniónicos de las membranas bacterianas. En combinación, estos dos residuos son capaces de participar en interacciones π-catión, facilitando las interacciones péptido-membrana [Chan, D. y col., 2006], [Papo, N. y Shai, Y. 2003] y [Hancock, R. y Diamond, G. 2000].

3.1.3 Péptidos antimicrobianos catiónicos como agentes citotóxicos para el tratamiento del cáncer:

Existen diferencias fundamentales entre las membranas celulares de las células malignas y las células normales que brindan la habilidad a ciertos AMPs de matar células tumorales sin afectar a las células sanas [Hoskin, D. y Ramamoorthy, A. 2008].

Al igual que las membranas bacterianas, las membranas de las células tumorales llevan una carga neta negativa debido a la elevada expresión de moléculas aniónicas tales como PS y mucinas O-glicosiladas que convierten a las células tumorales en un blanco perfecto para los cAMPs [Yoon, W. y col., 1996]. Las interacciones electrostáticas entre los cAMPs y los componentes aniónicos de la membrana celular, constituyen el factor clave en la destrucción selectiva de células cancerosas mediante los cAMPs.

Además, la fluidez aumentada de la membrana en las células cancerígenas respecto a la membrana de las células normales, puede facilitar la desestabilización de esta por la unión de los cAMPs [Sok, M. y col., 1999].

Por otra parte, las células tumorales poseen abundantes microvellosidades en su superficie, que, en combinación con la carga neta negativa, puede facilitar la citotoxicidad mediada por los cAMPs al permitir que un mayor número de moléculas interactúen con la membrana [Chaudhary, J. y Munshi, M. 1995].

Entre las propiedades beneficiosas de los cAMPs como agentes antitumorales se destacan su habilidad para matar rápidamente células tumorales, y de esta manera generar la remisión de tumores primarios y prevenir la metástasis en órganos sanos [Mader, J. y Hoskin D., 2006]. La tabla 13 indica algunos ejemplos de cAMPs con actividad antitumoral en diferentes tipos de cáncer.

Tabla 13: Propiedades bioquímicas y actividad antitumoral de algunos cAMPs.

PEPTIDO	CLASE	CARGA	ACTIVIDAD ANTITUMORAL	TIPO DE CANCER
BMAP-28	α-hélice	+7	MEMBRANOLITICA	LEUCEMIA
LL-37	α-hélice	+6	MEMBRANOLITICA	CARCINOMAS BUCALES
MAGAININA2	α-hélice	+3	MEMBRANOLITICA	PULMON
MELITININA	α-hélice	+6	MEMBRANOLITICA, ACTIVADOR DE PLA, ACTIVADOR DE PLD	LEUCEMIA
HPN-1(β-DEFENSINA)	β-sheet	+3	MEMBRANOLITICA	LINFOMA, CARCINOMAS
LACTOFERRICINA B	β-sheet	+8	MEMBRANOLITICA, INDUCTOR DE APOPTOSIS, ANTIANGIOGENICO	LEUCEMIA, FIBROSARCOMA, CARCINOMA, NEUROBLASTOMA
TACHIPLESINA I	β-sheet	+6	UNE HIALURONANO Y ACTIVA Clq	CARCINOMA DE PROSTATA

Aunque muchos cAMPs tienen actividad antitumoral, a veces se requieren grandes concentraciones que podrían resultar en una actividad hemolítica alta lo que conduciría a efectos secundarios no deseados [Shai, Y., 2002]. Pero combinados con agentes quimioterapéuticos convencionales, a menores dosis, demuestran efectos sinérgicos sobre las células tumorales tratadas [Hoskin, D. y Ramamoorthy, A. 2008]. Tal es el ejemplo de la cecropina A, péptido de 37 aminoácidos derivado de insectos, con estructura caracterizada por la presencia de dos α-hélices que tiene la capacidad de lisar diferentes tipos de células cancerígenas humanas [Mader, J. y Hoskin D., 2006].

La combinación de cecropina A con 5-fluorouracilo y citarabina (quimioterapéuticos) en ciertas dosis, muestran un efecto citotóxico sinérgico sobre células de leucemia [Hui, L. y col., 2002]. Por lo tanto, los fármacos antineoplásicos convencionales pueden ser utilizados en combinación con cAMPs a fin de reducir la dosis de la droga que se requiere para tener un efecto terapéutico y en consecuencia reducir los efectos secundarios inducidos por la quimioterapia.

El blanco del mecanismo de acción mediante el cual los cAMPs matan células tumorales no siempre es por afectación de la membrana. La lactoferricina es un péptido producido por la hidrólisis de lactoferrina. La lactoferricina bovina (LfcinB) aislada de la leche de vaca consiste de 25 aminoácidos incluyendo dos cisteínas que forman un puente disulfuro [Bellamy, W. y col., 1992]. LfcinB se une a la membrana de las células cancerígenas, causando la entrada del péptido al compartimento citoplasmático de las células, observándose una localización en las mitocondrias [Eliassen, L. y col., 2006]. La LfcinB mata células de leucemia y carcinoma de mama mediante un proceso que involucra la generación de especies reactivas de oxígeno, pérdida del potencial de membrana y activación de la cascada de caspasas, culminando en la muerte celular por apoptosis [Mader, J. y col., 2005].

Otro ejemplo de lo expuesto es el de BMAP-28 (tabla 13), péptido miembro de la familia de catelicidinas que exhibe actividad citotóxica contra una variedad de líneas celulares tumorales humanas. El tratamiento de células de leucemia resulta en la permeabilización de la membrana y el flujo de Ca^{+2} en el citosol [Mader, J. y Hoskin D., 2006]. Aunque la necrosis debida al daño en la membrana es la mayor causa de citotoxicidad mediada por BMAP-28, también se observa la fragmentación internucleosomal del ADN (indicativo de apoptosis) [Hoskin, D. y Ramamoorthy, A. 2008].

A concentraciones micromolares de BMAP-28, se logra la desestabilización de la membrana mitocondrial lo que conduce a una despolarización de esta y la posterior liberación de citocromo c [A. Ramamoorthy y col., 2006]. Una vez en el compartimento citosólico, el complejo formado por el citocromo c, la caspasa-9 y el factor inductor de apoptosis forman el apoptosoma, el cual promueve la activación de la caspasa-9 y la cascada apoptótica [Lu, J. y col., 2006].

Aunque todos los cAMPs interactúan inicialmente con la membrana citoplasmática de las células cancerosas donde inician eventos líticos, ciertos cAMPs también son capaces de dirigirse a estructuras intracelulares y moléculas

tales como las mitocondrias (BMAP-28, hCAP18109-135, LfcinB y magainina 2), el núcleo (LL-37) y PI3K (PR-39) (figura 24).

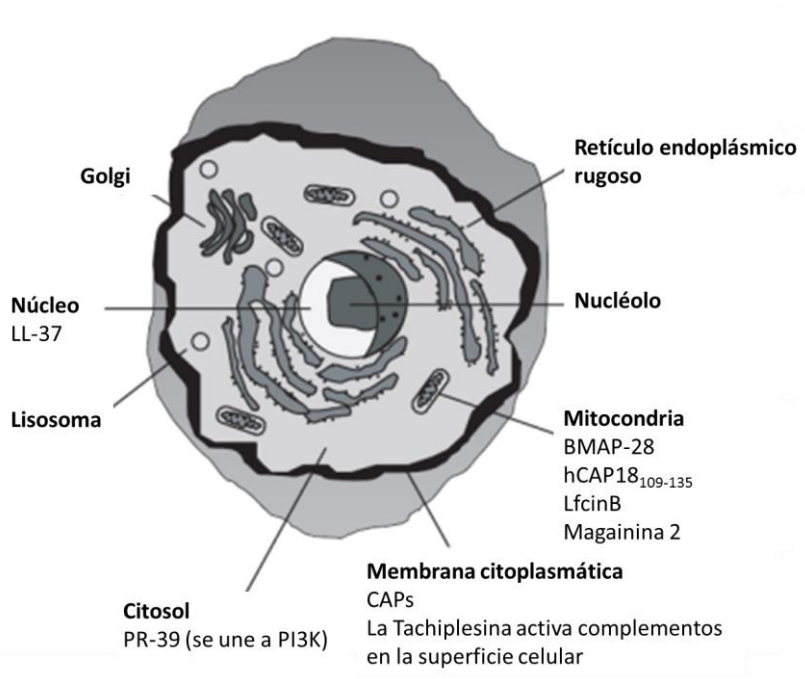


Figura 24: Interacción de algunos cAMPs con células cancerígenas. (Modificado de Mader, J. y Hoskin D., 2006.)

3.1.4 La lisozima:

Entre los AMPs más reconocidos y estudiados se encuentra la lisozima, hallada por primera vez en 1922 por Fleming, es una enzima que representa aproximadamente el 3.4 % de las proteínas de la clara del huevo. No posee toxicidad y es ampliamente utilizada por la industria alimenticia para la conservación de alimentos y por la industria farmacéutica por sus variadas aplicaciones terapéuticas [Mine, Y. y col., 2004].

En su secuencia, la lisozima, posee dominios bacteriostáticos no enzimáticos que son liberados por hidrólisis proteolítica [Mine, Y. y col., 2004]. Además de su actividad bacteriolítica directa se han reportado muchas otras funciones biológicas tales como su acción antiviral [Ferrari, R. y col., 1959], [Zhang, X. y col., 2008], potenciales efectos antibióticos [Cegielska-Radziejewska, R. y col., 2009] y actividad antitumoral [Sava, G. y col., 1988] entre otras.

La lisozima pertenece a la clase de enzimas que lisan la pared celular de ciertas bacterias Gram +, acción que lleva a cabo mediante la hidrólisis del puente β (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina del peptidoglicano [Brul, S. y Coote, P., 1999], componentes que constituyen las paredes celulares bacterianas.

La actividad inhibidora de la enzima es mayor contra las bacterias Gram +, ya que estos microorganismos carecen de una membrana externa. Es más eficaz contra algunas bacterias específicas Gram + tales como *Staphylococcus aureus, Micrococcus lysodeikkticus, Bacillus cereus, Bacillus stearothermophilus, Clostridium thermosaccarolyticum* y *Clostridium tyrobutyricum* [Cunningham, F. y col., 1991], pero es en gran medida ineficaz contra las bacterias Gram -. Estas, pueden ser sensibilizadas a la acción de la lisozima mediante la adición de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) [Helander, I. y col., 1997].

Así como muchos cAMPs poseen propiedades antitumorales, la lisozima, por su carga positiva es capaz de aumentar la citotoxicidad *in vitro* de células tumorales mediante la activación de células del sistema inmune como monocitos y linfocitos [LeMarbre, P. y col., 1981].

La digestión de la lisozima humana (hLz) con clostripain produce un pentadecapéptido (residuos 87-115) que forma parte de un dominio hélice-loop-hélice (HLH) situado en el sitio activo de la enzima [Pellegrini, A. y col., 1997], [Ibrahim, H. y col., 2001]. El dominio HLH es un potente microbicida, la parte N-terminal de la hélice es primordialmente bactericida contra Gram + mientras la α-hélice C-terminal, lo es para Gram + y Gram -, exhibiendo casi total identidad con hLz [Ibrahim, H. y col., 2001].

Con el fin de deducir el rol que cumple esta disposición de aminoácidos en la interacción del análogo con la membrana bacteriana y de comprender más acerca de la relación de estructura-actividad del nuevo péptido, se llevó a cabo un análisis más exhaustivo de la estructura secundaria y su interacción con entornos de membranas miméticas mediante dicroísmo circular (CD) y espectroscopia de

fluorescencia. Para tal fin se utilizó un inductor de estructura secundaria trifluoroetanol (TFE) y micelas lipídicas que imitan la membrana plasmática como, por ejemplo, membranas sintéticas compuestas de lípidos aislados de estafilococos, fosfatidilcolinas saturadas (DMPC) y fosfatidil etanolaminas (DMPE) [Iannucci, N. y col., 2013].

A partir de los resultados obtenidos, los autores proponen que el péptido [$K^{108}W^{111}$]107-115 hLZ (figura 25) forma una molécula anfipática en forma de U con un núcleo hidrófobo (WVWW) flanqueado por regiones hidrofílicas cargadas positivamente en ambos extremos del péptido [Iannucci, N. y col., 2013]. Este hallazgo sugiere que esta combinación confiere al péptido resultante, la capacidad para atacar y unirse a las interfaces aniónicas, tales como las micelas y las membranas plasmáticas microbianas, lo que resulta en la actividad anti-estafilocócica mejorada [Iannucci, N. y col., 2013].

Figura 25: Secuencia del fragmento 107-115 de la lisozima humana y su análogo sustituido [$K^{108}W^{111}$]107-115 hLZ. R: arginina, A: alanina, K: lisina, W: triptofano, V: valina, N: asparragina. -NH2: grupo C-terminal amidado. hLz: lisozima humana.

La estructura secundaria del péptido [$K^{108}W^{111}$]107-115 hLZ (figura 25), se vio afectada drásticamente a través de la sustitución en la posición 111 (Ala por Trp). Los autores concluyeron que la carga positiva adicional cerca del extremo N-terminal en combinación con el residuo Trp adicional, podría conferir al péptido resultante una conformación adecuada y así mejorar la actividad anti-estafilocócica [Iannucci, N. y col., 2013]. Esta característica clave puede mejorar la interacción con la membrana plasmática microbiana y su partición en la interface.

Estos estudios revelaron que el aumento de la actividad del péptido [$K^{108}W^{111}$]107-115 hLZ podría deberse a un efecto sinérgico entre el aumento de las fuerzas electrostáticas (sustitución de Ala por Lys en posición 108), así como el

aumento de las interacciones hidrofóbicas (sustitución de Ala por Trp en posición 111) [Bouchet, A. y col., 2014].

El análisis conformacional sugirió la importancia de los residuos de Trp en la actividad antimicrobiana, probablemente mediada a través de las interacciones hidrofóbicas con la membrana plasmática [Iannucci, N. y col., 2013].

Como lo indica la Organización Mundial de la Salud, la resistencia a los antibióticos constituye actualmente una de las mayores amenazas para la salud. La resistencia a los antibióticos es un fenómeno evolutivo natural, aunque su uso indebido en seres humanos y animales está acelerando el proceso, impulsando la evolución de la resistencia. De hecho, estudios epidemiológicos han demostrado una relación directa entre el consumo de antibióticos y la aparición y diseminación de cepas bacterianas resistentes, problema agravado por una disminución alarmante en el descubrimiento y desarrollo de nuevas clases de antibióticos por parte de la industria farmacéutica. La resistencia a los antibióticos hace que se prolonguen las estancias hospitalarias, que se incrementen los costos médicos y que aumente la mortalidad.

El desarrollo de nuevas entidades dirigidas a componentes de las células difíciles de modificar para generar resistencia (como la membrana celular) representa un enfoque estratégico para la industria farmacéutica. En este contexto, el fragmento de 107 a 115 del extremo C-terminal de la lisozima humana posee una actividad antimicrobiana significativa [Iannucci, N. y col., 2013].

Como se mencionó con anterioridad, los atributos de los péptidos antimicrobianos son, principalmente, la presencia de aminoácidos cargados positivamente e hidrófobos y una conformación helicoidal anfifílica. Estas características permiten interacciones péptido-membrana con la consiguiente disrupción de la membrana bacteriana. Los cAMP ejercen su poder destructivo por diversos mecanismos, como la generación de poros (figura 22); por lo tanto, podría decirse que, el desarrollo de la resistencia microbiana debería ser extremadamente difícil.

La sustitución de aminoácidos en un péptido con actividad antimicrobiana conocida puede afectar dramáticamente su actividad biológica. En consecuencia, cuando la alanina en posiciones 108 y 111 de este péptido se sustituye por lisina (Lys) y triptófano (Trp), respectivamente, la actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se ve aumentada por cuatro y por veinte veces respectivamente [Iannucci, N. y col., 2013]. En consecuencia, su bioactividad se podría mejorar mediante el aumento de su hidrofobicidad local. La arilación sitio-especifica de residuos hidrófobos es un método interesante para llevar a cabo dicha modificación.

Se han desarrollado recientemente métodos para la arilación selectiva de residuos de Trp en péptidos en C-2 indol [Ruiz-Rodríguez, J. y col., 2010]. En estas transformaciones, se puede introducir una variedad de grupos arilo sustituidos diversamente en Trp protegido en N. Esta modificación post-sintética formal tiene importantes consecuencias estructurales, alterando directamente las propiedades físico-químicas, y más importante la actividad biológica de los aductos.

3.2 Objetivos:

1- Modificación secuencial de los tres residuos triptófanos presentes en el péptido antimicrobiano derivado de la lisozima humana, [$K^{108}W^{111}$] 107-115 hLZ. Se llevará a cabo la arilación secuencial en los tres residuos de Trp (Trp-arilación) del péptido [$K^{108}W^{111}$]107-115 hLZ en la posición 2 a través de un grupo fenilo. El objetivo de esta sustitución es mejorar la hidrofobicidad del péptido antimicrobiano RKWVWWRNR por arilación programada y selectiva de sus residuos de Trp.

2- Estudio de la actividad antimicrobiana sobre cepas bacterianas Gram + y determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CIMs). Se analizará el efecto de la modificación sobre el crecimiento de dos cepas bacterianas de importancia clínica: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

3.3 Materiales y métodos:

3.3.1 Síntesis de triptófanos modificados. Síntesis de Fmoc-2-ariltriptofanos:

La C2-arilación de indoles en Trp se llevó a cabo a través de la técnica de C-H activación catalizada por Pd [Ruiz-Rodríguez, J. y col., 2010] (figura 26). Se colocó en un reactor de síntesis asistida por microondas, Monowave (MW); Fmoc-Trp-OH (1 equiv), yoduro de arilo (1,5 equiv), Tetrafluoroborato de plata ($AgBF_4$) (2 equiv), Ácido trifluoroacético (1 equiv) y **acetato de paladio (II)** ($Pd(OAc)_2$) (0.05 equiv) y se añadió N,N-dimetilformamida (2 ml). La mezcla se agitó durante 1 min a temperatura ambiente y se calentó bajo irradiación de microondas (250 W) a 90ºC durante 20 min. El ciclo se repitió 6 veces. Se añadió acetato de etilo (20 ml) y la suspensión resultante se filtró a través de Celite. El filtrado se deshidrató con Na_2SO_4 y se concentró al vacío.

El extracto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice para obtener Fmoc-2-ariltriptofano puro (figura 26). El producto se obtuvo con un 67% de rendimiento.

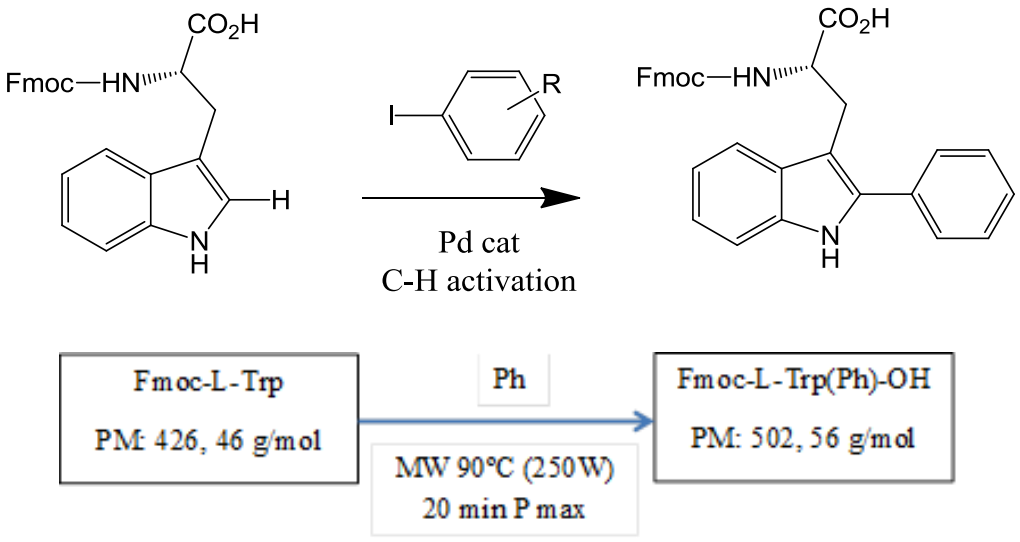


Figura 26: C2-arilación de Fmoc-Trp bajo irradiación por microondas.

3.3.2 Síntesis de [$K^{108}W^{111}$] 107-115 hLZ con Fmoc-2-ariltriptofano:

La síntesis se realizó en forma manual en fase sólida utilizando la resina comercial Fmoc-Rink-Amid AM Resin (Mesh size 100-200 mesh (75–150 µm). Carga: 0,48 mmol/g). Como reactivos acoplantes, se usaron Hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) y diisopropiletilamina (DIPEA) en DMF. Los péptidos son desprotegidos y clivados de la resina empleando una solución de TFA/H_2O/TIS (95:2,5:2,5) por 1:30 h a temperatura ambiente.

3.3.3 Purificación, cuantificación y caracterización de los péptidos:

Los péptidos se purificaron mediante RP-HPLC en una columna C-18 Ultrasphere ODS (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) usando un gradiente lineal de 10-55% de acetonitrilo en agua que contiene 0,05% de TFA.

3.3.4 Caracterización de los péptidos:

Los péptidos fueron identificados mediante ESI-MS en un espectrómetro de masas LCQ Duo (Thermo Fisher, San José, CA). Las muestras se introdujeron desde una bomba Surveyor (Thermo Fisher) con un flujo de disolvente de 40 ml/min. Los pesos moleculares teóricos se calcularon con la herramienta ProtParam desde el servidor de Expasy: http://www.expasy.org/tools/protparam.html.

3.3.5 Ensayos antibacterianos:

Las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* fueron cultivadas a 37°C en caldo Mueller-Hinton (MH) hasta alcanzar la fase logarítmica de 1 x 10^8 UFC/ml. En los ensayos se utilizó una concentración bacteriana final de 1-5 x 10^5 UFC/ml.

El ensayo de inhibición de crecimiento se llevó a cabo en tubos de ensayo. Se adicionó una suspensión bacteriana en caldo MH concentrado al 2X a la solución peptídica, a concentraciones que varían desde 2.5 a 0.1 mg/ml en dos diluciones seriadas, y luego fue incubado a 37°C por 21 h. El crecimiento bacteriano se

determinó midiendo la densidad óptica a 620 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Como control positivo de crecimiento se utilizó una solución en la que se sustituyó el péptido por agua y se consideró como el 100% de crecimiento. Como control negativo se utilizó una solución en ausencia de suspensión bacteriana.

El ensayo de microdilución se llevó a cabo en placas de 96 wells de fondo plano para los péptidos con la mayor actividad inhibitoria a fin de determinar la CIM. Las CIMs se determinaron como la concentración más baja de péptido que inhibe el crecimiento bacteriano cuando se incubaron en caldo MH a 37°C durante 21 h. Las concentraciones de péptido variaron desde 1.25 mg/ml a 1µg/ml en dos diluciones seriadas. El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la densidad óptica a 620 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en dos experimentos independientes.

3.3.6 Microscopia electrónica:

Staphylococcus aureus ATCC 29213 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 se cultivaron a partir de una sola colonia en fase estacionaria en caldo MH a 37°C con agitación. Una dilución 1:100 de ambos cultivos fueron expuestos a péptidos aril-Trp en la concentración inhibitoria y se cultivaron durante 6 h. Como control de crecimiento positivo se utilizó caldo de MH estéril. Los cultivos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C y se prepararon para la microscopia electrónica de barrido (SEM).

Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 1% en 0,1 M de tampón de cacodilato, pH 7 durante 10 min, a continuación, se deshidrataron con lavados EtOH (50-100% EtOH) y se sumergieron en EtOH/ Hexametildisilazano (HDMS) (1:1) y 100% durante 60 minutos. Luego las muestras fueron secadas, montadas sobre el microscopio electrónico de barrido y recubiertas por pulverización catódica con oro/paladio (Cressington Scientific Instruments). Las micrografías fueron obtenidas en un microscopio electrónico de barrido Zeiss 40 *Supra.*

3.3.7 Ensayos hemolíticos:

La actividad hemolítica de los péptidos fue determinada sobre eritrocitos humanos. La sangre fue recolectada en heparina y los eritrocitos humanos fueron lavados tres veces con buffer fosfato salino (PBS) (buffer 35 mM de fosfato, 0.15 M de NaCl, pH 7.2) y finalmente se resuspendió en PBS. Se adicionaron 500 µl de una suspensión de 0.5 % de eritrocitos humanos a un volumen igual de cada solución de péptidos a concentraciones de 15, 50 y 125 mg/ml. Las mezclas fueron incubadas a 37°C durante 1 h y centrifugadas a 2800 rpm durante 5 min. Se midió el valor de A_{414nm} del sobrenadante. Como control negativo de hemolisis se utilizó PBS y como control positivo, 0.1% de Tritón X-100. El porcentaje de hemólisis se calculó como sigue: $[(A_{péptido} - A_{PBS}) / (A_{Tritón} - A_{PBS})] \times 100$.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.4 Resultados y discusión:

La figura 27 muestra la caracterización por RP-HPLC y MALDI-MS para el Fmoc-2-ariltriptofano. En el espectro de masa se puede observar un pico de masa de 503 g/mol correspondiente al triptófano arilado.

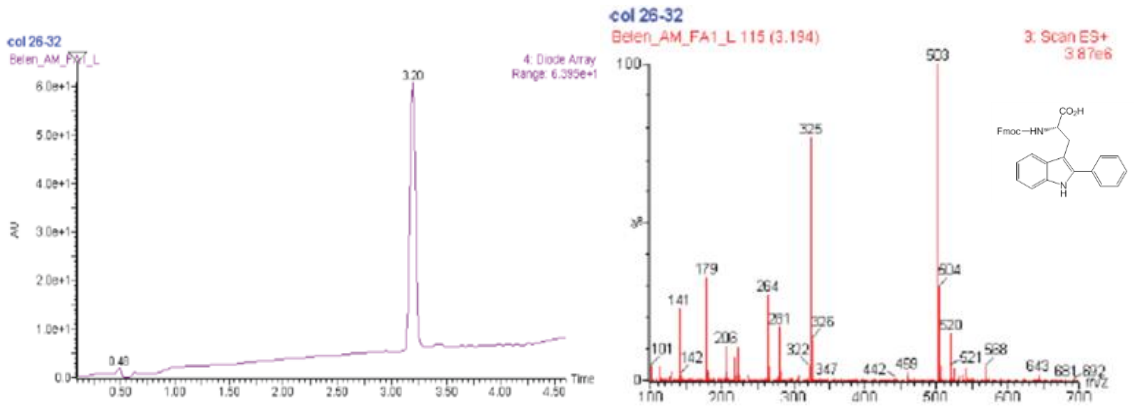


Figura 27: Espectro de HPLC y espectro de masa de Fmoc-2-ariltriptofano.

Se han sintetizado eficientemente los tres péptidos monofenilados selectivamente en la posición indol 2 de cada Trp (figura 26). Una vez preparados los péptidos, la purificación y los análisis espectroscópicos confirmaron las estructuras esperadas (tabla 15). La tabla 14 muestra las secuencias del péptido líder, la secuencia intermedia (1) de K^{108}-W^{111}107-115 hLz y los tres péptidos arilados 2, 3 y 4, cada uno con un Trp-fenilo respectivamente.

Tabla 14: secuencias del péptido líder, a continuación, la secuencia intermedia 1 de K^{108}-W^{111} y los tres péptidos arilados 2, 3 y 4, cada uno con un fenilo-Trp, respectivamente.

Nombre	Fórmula	Secuencia
Líder	107-115 hLz	RAWVAWRNR-NH_2
1	[$K^{108}W^{111}$] 107-115 hLz	RKWVWWRNR-NH_2
2	[K^{108}W-$Ar^{109}W^{111}$] 107-115 hLz	RKWArVWWRNR-NH_2
3	[K^{108}W-Ar^{111}] 107-115 hLz	RKWVWArWRNR-NH_2
4	[$K^{108}W^{111}$W-Ar^{112}] 107-115 hLz	RKWVWWArRNR-NH_2

Referencias de la tabla 14: R: arginina, K: lisina, A: alanina, W: triptofano, WAr: triptofano-arilado, V: valina, N: asparragina. -NH2: grupo C-terminal amidado, RT: tiempo de retención, PM: peso molecular. hLz: lisozima humana. Las letras en rojo representan el Trp de la secuencia que fue arilado.

La tabla 15 muestra los resultados de la caracterización por RP-HPLC y MALDI-MS del péptido 1 y los tres péptidos arilados. El tiempo de retención de los péptidos arilados 2, 3 y 4 en RP-HPLC fue más largo que el del péptido 1 no arilado, evidenciando así, el aumento de la hidrofobicidad debido a la adición de un grupo fenilo. Además, el peso molecular experimental coincidió con el teórico.

Tabla 15: caracterización por RP-HPLC y MALDI-MS del péptido intermedio (1) y los tres péptidos arilados.

Péptido	RT (min)	PM (Da), Experimental (Teórico)
1	4.7	1385.8 (1386.6)
2	5.1	1462.1 (1462.7)
3	5.2	1462.0 (1462.7)
4	5.2	1462.1 (1462.7)

Referencias de la tabla 15: R: arginina, K: lisina, A: alanina, W: triptofano, WAr: triptofano-arilado, V: valina, N: asparragina. -NH_2: grupo C-terminal amidado, RT: tiempo de retención, PM: peso molecular. hLz: lisozima humana.

La tabla 16 muestra las CIM de los péptidos fenilo comparadas con las del péptido líder y el péptido 1, frente a los dos microorganismos estudiados. En *S. aureus* ATCC 29213, la CIM disminuyó dos veces con el péptido 2 y cuatro veces con los péptidos 3 y 4 con respecto al péptido 1. En *S. epidermidis*, la arilación de Trp 109 (péptido 2) no provocó cambios en la CIM, mientras que la arilación de Trp 111 o Trp 112 (péptidos 3 y 4, respectivamente) la disminuyó dos veces respecto al péptido 1. En todos casos, la arilación de Trp del péptido 1 provocó una disminución significativa en la CIM, pero el grado de inhibición fue diferente si la Trp arilada estaba en las posiciones 109 o 111-112. Además, la arilación de Trp en estos péptidos aumentó su actividad antimicrobiana, llegando a CIMs compatibles con una ventana terapéutica eficaz y evidenciando sus excelentes posibilidades como ingredientes farmacéuticos activos para la renovación de agentes antimicrobianos.

Tabla 16: Concentración inhibitoria mínima (CIM) del péptido [$K^{108}W^{111}$] 107-115 hLz y sus análogos Aril-Trp contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

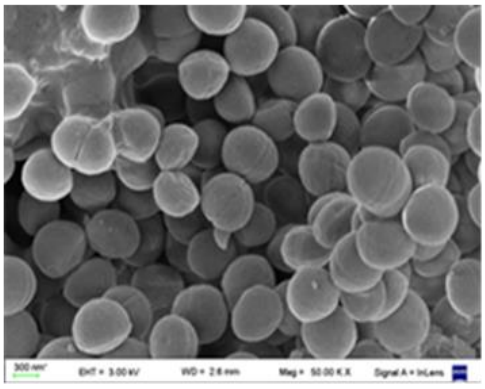
Péptido	***S. aureus* ATCC 29213**		***S. epidermidis* ATCC 12228**	
	µg/mL	µM	µg/mL	µM
Lider (107-115 hLz)	250	206	ND*	ND*
1 ([$K^{108}W^{111}$] 107-115 hLz)	16	11	8	5
2 ([$K^{108}W$-$Ar^{109}W^{111}$] 107-115 hLz)	8	5	8	5
3 ([$K^{108}W$-Ar^{111}] 107-115 hLz)	4	3	4	3
4 ([$K^{108}W^{111}W$-Ar^{112}] 107-115 hLz)	4	3	4	3

*ND: no determinado

Las determinaciones de las CIM muestran claramente que los residuos aril-Trp mejoran la actividad antimicrobiana del péptido 1 reduciendo el valor de 2 a 4 veces.

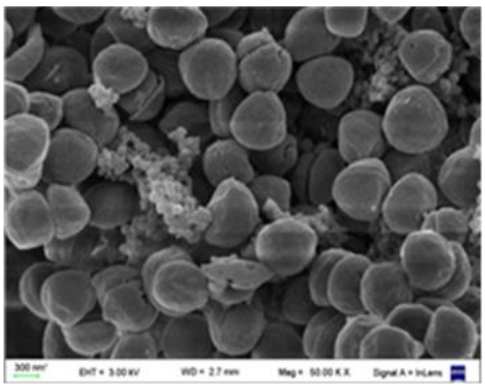
La figura 28 muestra las imágenes de SEM de *S. aureus* y *S. epidermidis* tratadas con los péptidos aril-Trp sintetizados, donde puede verse el daño en la membrana microbiana debido al tratamiento. Las microscopias revelan que el mecanismo de acción de los péptidos modificados con aril-Trp es el daño de la membrana plasmática. Aril-Trp podría promover el anclaje de los AMPs a la membrana plasmática proporcionando una herramienta adicional para el desarrollo de nuevos compuestos a partir de péptidos ricos en Trp.

A



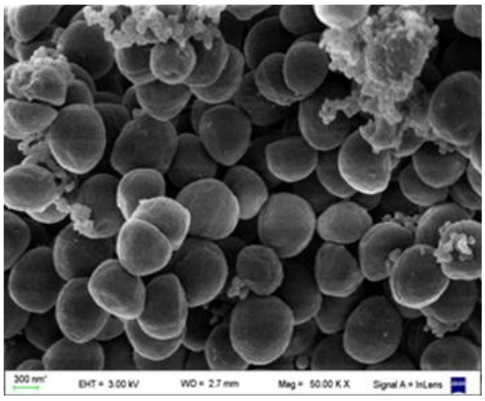
Control

B



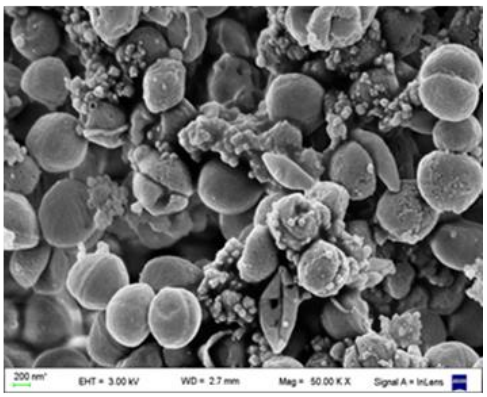
[$K^{108}W^{111}$] 107-115 hLz

C



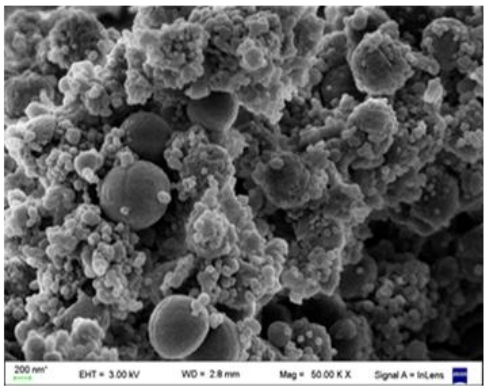
[$K^{108}W$-$Ar^{109}W^{111}$]107-115 hLz

D



[$K^{108}W$-Ar^{111}] 107-115 hLz

E



[$K^{108}W^{111}W$-Ar^{112}] 107-115 hLz

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

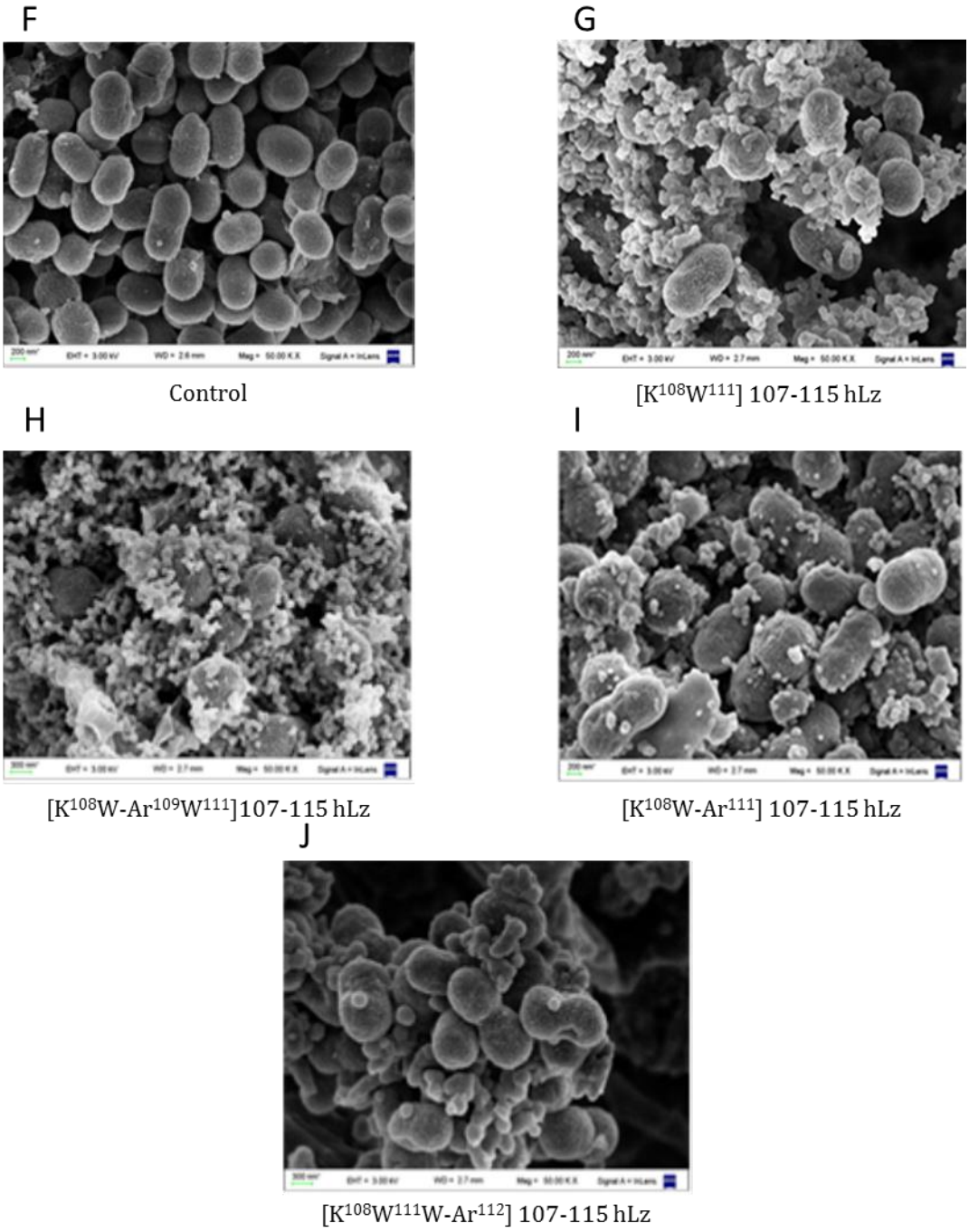


Figura 28: fotos obtenidas por microscopía electrónica de barrido que revelan el mecanismo de acción de los peptidos aril-Trp frente a *Staphylococcus aureus* (S. aureus) ATCC 29213 y *Staphylococcus epidermidis* (S. epidermidis) ATCC 12228. A-E: S. aureus ATCC 29213, en donde A: control, 0% de inhibición, B: [$K^{108}W^{111}$] 107-115 hLz (100 µg/mL), 42% de inhibición, C: el análogo arilado[$K^{108}W$-$Ar^{109}W^{111}$] 107-115 hLz (89 µg/mL), 28% de Inhibición, D: el análogo arilado [$K^{108}W$-Ar^{111}] 107-115 hLz (90 µg/mL), 55% de Inhibición y E: [$K^{108}W^{111}W$-Ar^{112}] 107-115 hLz (87 µg/mL), 91% de Inhibición. F-J: S. epidermidis ATCC 12228, en donde F: control, 0% de inhibición, G: [$K^{108}W^{111}$] 107-115 hLz (100 µg/mL), 86 % de Inhibición, H: el análogo

arilado[$K^{108}W$-$Ar^{109}W^{111}$] 107-115 hLz (89 µg/mL), 91% de Inhibición, I: el análogo arilado [$K^{108}W$-Ar^{111}] 107-115 hLz (90 µg/mL), 91% de Inhibición y J: el análogo arilado [$K^{108}W^{111}W$-Ar^{112}] 107-115 hLz (87 µg/mL), 91% de Inhibición.

Tabla 17: Porcentaje de hemolisis de los péptidos arilados a 15, 50 y 125 µg/ml.

Péptido	15 µg/ml	50 µg/ml	125 µg/ml
1	2.6	5.4	30.7
2	2.7	6.1	30.9
3	2.7	5.8	31.6
4	2.9	5.6	29.8

Los resultados del ensayo de hemólisis mostrados en la tabla 17 son similares a los obtenidos con el péptido intermedio y sólo son significativos a concentraciones mayores de diez veces sus CIM, evidenciando así la seguridad de los péptidos arilados frente a los glóbulos rojos humanos.

3.5 Conclusiones y perspectivas:

En el presente trabajo, se describe una nueva metodología basada en la preparación de un péptido Trp arilado a través de la activación de C-H, que conduce a la mejora de su actividad antimicrobiana. Esto puede abrir la puerta a nuevas transformaciones de este tipo, dirigidas a mejorar la acción farmacológica sin alterar la naturaleza anfipática existente del péptido, pero incrementando localmente la lipofilicidad de residuos específicos. Este novedoso proceso de arilación de los triptófanos (W-Ar) aumentó 4 veces la actividad antimicrobiana de los péptidos, alcanzando CIMs compatibles con una ventana terapéutica efectiva. De acuerdo a nuestro conocimiento del área, esta es la primera vez que la arilación de un triptófano se aplica en el desarrollo de un péptido con actividad antimicrobiana.

Las modificaciones introducidas en los peptidos aumentaron su hidrofobicidad y en consecuencia el poder de anclaje a la membrana bacteriana, su principal blanco de acción. La membrana plasmática es un componente celular muy difícil de modificar y/o reparar, por lo que constituye un excelente target para la formulación de nuevos ingredientes farmacéuticos activos ya que la probabilidad de generación de resistencia microbiana es muy baja.

Los ensayos de hemólisis demostraron la seguridad de estos péptidos frente a glóbulos rojos humanos. Los péptidos arilados pueden incluirse en una formulación oral adecuada para lograr una biodisponibilidad efectiva. Asimismo, los péptidos arilados pueden incluirse en una formulación tópica para el tratamiento de afecciones dermatológicas causadas por estafilococos. Asimismo, pueden incluirse en apósitos para prevenir la infección de heridas durante la cicatrización. Finalmente, los péptidos arilados pueden inmovilizarse en prótesis y catéteres para inhibir el crecimiento de estafilococos, principal agente infectivo de estos materiales. Se ha demostrado que la arilación en péptidos conteniendo Trp mejora la actividad biológica antibacteriana, manteniendo una baja capacidad hemolítica.

Estos péptidos poseen alta actividad y baja toxicidad, debido a que su blanco terapéutico es la membrana plasmática, y como se mencionó anteriormente, existe una escasa probabilidad de generar resistencia. Al generar daños en la membrana los péptidos pueden administrarse en combinación con un antibiótico que posea un blanco intracelular y de esta forma promover un efecto sinérgico. Al ser el blanco de los péptidos arilados la membrana microbiana y producirse la interacción por fuerzas electrostáticas, pueden sintetizarse los isómeros-D con el objetivo de mejorar su estabilidad y biodisponibilidad. Estos isómeros serían resistentes a las enzimas peptidasas, manteniendo su actividad antimicrobiana. Su producción industrial es rentable mediante síntesis química.

Estos resultados también permiten corroborar la relevancia que tienen los residuos de Trp como el centro de la molécula para la actividad antimicrobiana del péptido.

Muchos estudios han confirmado la actividad antitumoral de la lisozima en sistemas experimentales *in vivo* de tumores en animales. La lisozima es capaz de activar directamente a las células inmunes (monocitos y linfocitos), y aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales [Sava, G. y col., 1989]. En función de lo expuesto y teniendo en cuenta que los AMPs catiónicos poseen propiedades antitumorales, el péptido [$K^{108}W^{111}$] 107-115 hLz con su carga positiva adicional y sus análogos Aril-Trp son candidatos para ser evaluados como posibles futuras drogas antitumorales.

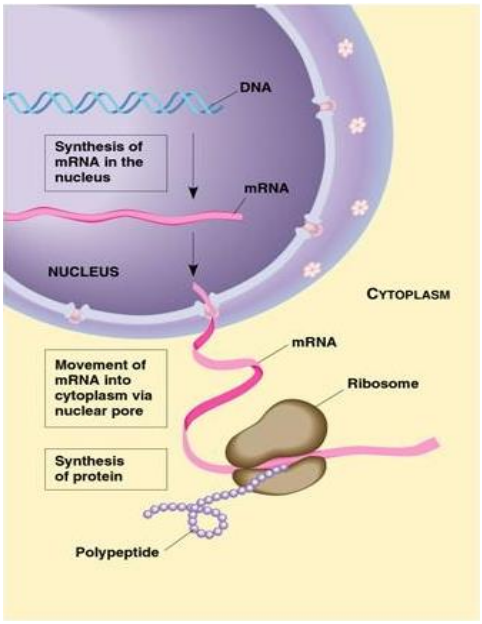
Es importante destacar que al ser las membranas microbianas las dianas biológicas de los péptidos arilados, la posibilidad de generar resistencia se ve seriamente disminuida. Por lo tanto, el uso terapéutico eventual de estos agentes puede mostrar ventajas pertinentes frente a los antibióticos convencionales para combatir la resistencia bacteriana. Esta prueba de concepto puede abrir nuevas vías en el desarrollo de nuevos péptidos anfipáticos sobre la base de arilación de diferentes residuos de Trp

4 Capítulo III:

Puesta a punto de la técnica de electroforesis en geles 2D y análisis proteómico de células tratadas con un péptido modelo proapoptótico CIGB-300.

4.1 Introducción:

En línea de investigación en colaboración con el grupo del laboratorio de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana-Cuba, se ha logrado la caracterización del péptido antitumoral CIGB-300, y se identificaron blancos moleculares modificados a partir de su aplicación.



En esta etapa de trabajo se puso a punto la técnica de proteómica 2D-PAGE, a fin de lograr la optimización del análisis proteómico, con el fin de poder brindarlo como un servicio a la comunidad científica. Una vez lograda la rutinización del proceso, se ensayó y evaluó la respuesta a nivel molecular del péptido CIGB-300 sobre la línea tumoral murina 3LL proveniente de un carcinoma de pulmón.

4.1.1 Utilidad de la proteómica:

Desde el advenimiento del dogma central de la biología anunciado por Crick en el año 1958, se sabe que el proteoma presenta un escenario dinámico y es el reflejo del medio ambiente en el que es estudiado [Rabilloud, T., 2002].

Las proteínas pueden ser modificadas post-traduccionalmente, translocadas o degradadas en respuesta a estímulos internos y externos. El término “Proteoma” acuñado por Wilkins y colaboradores en 1996, describe el conjunto de PROTEínas

de un genOMA, en una célula o un tejido. De forma imperceptible, la palabra proteoma dio lugar a una nueva disciplina, la "Proteómica".

La proteómica se define como "el uso de las medidas cuantitativas a nivel de proteínas de la expresión de genes para caracterizar procesos biológicos (ej: procesos de enfermedades, efectos de drogas, etc.) y descifrar los mecanismos de control de la expresión génica" [Anderson, N. y Anderson, N., 1998]. El término proteómica se ha asociado tradicionalmente con la separación de un gran número de proteínas de una célula u organismo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE) [O'Farrells, P., 1975].

2D-PAGE es una técnica que se puede aplicar de forma rutinaria para el análisis de perfiles de expresión cuantitativa de grandes mezclas complejas de proteínas, tal como, lisados de células enteras o la extracción proteica selectiva de cada compartimento celular [Görg, A. y col., 2004].

2-DE permite la separación de mezclas complejas de proteínas de acuerdo con el punto isoeléctrico (pI) y la masa molecular (Mr), la solubilidad, y la abundancia relativa [Gygi, S. y col., 2000] ver figura 29. De esta manera, se puede obtener una fotografía que refleja la expresión diferencial de proteínas bajo una determinada circunstancia, por ejemplo, a partir del tratamiento con una droga. Además, debido a que la técnica permite separar las proteínas condicionado a dos características, el punto isoeléctrico y la masa molecular, cada spot pertenece a una única especie proteica.

En contraste con los métodos en tándem de cromatografía líquida y espectrometría de masas, estos realizan análisis de péptidos, razón por la que se pierde la información de pI y la Mr, y en las que se requiere el etiquetado de isótopos estables para el análisis cuantitativo [Görg, A. y col., 2004].

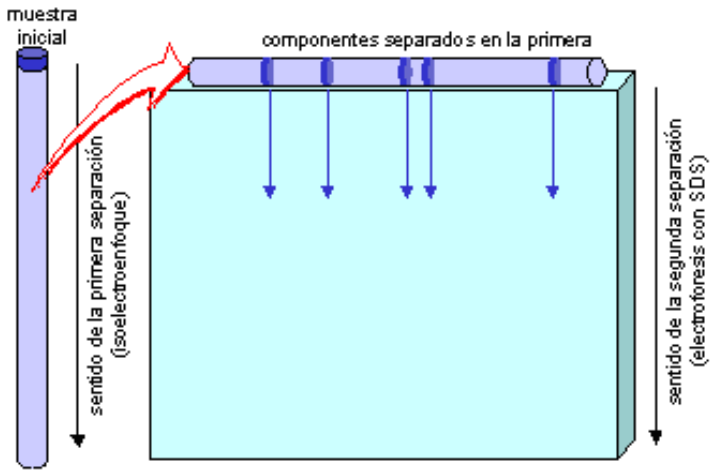


Figura 29: Esquema de la separación de proteínas mediante la técnica 2D-PAGE. Tomado de http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm

Se puede decir que hubo tres factores decisivos para el desarrollo de la proteómica: 1- La secuenciación de genomas a gran escala y el desarrollo de bases de datos de proteínas, 2- El desarrollo de técnicas de espectrometría de masas para analizar proteínas y péptidos, 3- Los avances realizados en la separación de proteínas mediante 2D-PAGE con la introducción de los gradientes de pH inmovilizados (IPGs). El desarrollo de los IPGs entre 2,5-12 pH ha permitido el análisis de proteínas muy alcalinas y la construcción de las bases de datos correspondientes.

Debido a su resolución y sensibilidad, esta técnica es una poderosa herramienta para el análisis y la detección de proteínas provenientes de fuentes biológicas complejas. Las proteínas se separan de acuerdo con el punto isoeléctrico por enfoque isoeléctrico en la primera dimensión, y según el peso molecular por electroforesis con dodecil sulfato de sodio (SDS) en la segunda dimensión.

Puesto que estos dos parámetros están relacionados, es posible obtener una distribución casi uniforme de manchas de proteínas a través de un gel de dos dimensiones.

La proteómica tiene numerosas aplicaciones y su importancia ha ido en aumento. En la actualidad hay varias revistas dedicadas exclusivamente a publicar

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

los resultados de las investigaciones en este campo. Entre las más importantes se destacan: Molecular and Cellular Proteomics, Journal of Proteomics, Journal of Proteome Research y Proteomics.

Entre los principales campos de aplicación se destacan:

- ✓ Estudios sobre el funcionamiento celular y la organización molecular.
- ✓ Identificación de marcadores moleculares para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades.
- ✓ Identificación de nuevos blancos para el diseño de fármacos.
- ✓ Estudio de la resistencia a factores bióticos y abióticos en plantas.
- ✓ Interacción entre hospedero y patógenos en animales y plantas.
- ✓ Estudio de los mecanismos de acción y efectos secundarios de fármacos.
- ✓ Predicción de respuesta (farmacoproteómica).
- ✓ Desarrollo de nuevas técnicas, métodos y procedimientos.

4.1.2 Descripción y actividad del péptido CIGB-300:

El CIGB-300 se originó a partir del screening al azar sobre una biblioteca de fagos y fue identificado como P15, luego fue fusionado al péptido penetrador Tat derivado de la proteína HIV-Tat [Perea, S. y col., 2004]. P15-Tat también conocido como CIGB-300 induce apoptosis mediante la activación de la vía de caspasas sobre una variedad de líneas celulares tumorales y modelos animales [Perea, S. y col., 2004], [Perera, Y. y col., 2008] y [Perea, S. y col., 2008].

Por lo tanto, CIGB-300 es un péptido cíclico (CWMSPRHLGTC) fusionado al péptido penetrador Tat (48GRKKRRQRRRPPQ60), como se puede apreciar en la figura 30. El dominio cíclico P15, inhibidor de la fosforilación, se une al péptido penetrador Tat por medio de un espaciador β-Ala y contiene un puente disulfuro incluyendo residuos hidrófobos y residuos cargados positivamente que le confieren una carga neta de 2 a pH fisiológico [Perera, Y. y col., 2012].

Figura 30: Estructura química del péptido CIGB-300. Tomado de Benavent, F. y col., 2014.

El CIGB-300 es una droga de naturaleza peptídica que anula la fosforilación mediada por la proteína caseína quinasa 2 (CK2) [Rodríguez-Ulloa, R. y col., 2010], induciendo apoptosis en células malignas, y demostrando su actividad antitumoral en diferentes modelos animales de cáncer, y actualmente está siendo examinada a nivel clínico en pacientes con tumores de cuello uterino [Perera, Y. y col., 2012].

Recientemente se propuso un posible mecanismo para la captación celular, el transporte intracelular y la degradación del CIGB-300. Se demostró que el CIGB-300 es capaz de interactuar con los proteoglicanos de heparán sulfato presentes en la membrana celular, e ingresaría a la célula mediante mecanismos dependientes e independientes de energía [Benavent, F. y col., 2014]. El CIGB-300 es vehiculizado al interior celular por la vía dependiente de energía mediada por caveolinas en forma de vesículas endocíticas, y por otro lado mediante la translocación directa de la membrana plasmática en un mecanismo independiente de energia [Benavent, F. y col., 2014]. Finalmente, CIGB-300 se transporta desde el citoplasma al núcleo mediante la señal de localización nuclear Tat. En el núcleo el CIGB-300 se concentra en los nucléolos, inhibiendo la fosforilación mediada por CK2, provocando la desintegración nucleolar y la inducción de la apoptosis [Benavent, F. y col., 2014].

Mediante el análisis 2-DE y la secuenciación por espectrometría de masas se investigó el perfil de algunas de las proteínas moduladas a partir del tratamiento con CIGB-300 sobre la línea celular de cáncer de pulmón humano NCI-H125 [Rodríguez-Ulloa, R. y col., 2010]. Los resultados preliminares demostraron que la proteína multifuncional nucleofosmina (B23/NPM) constituye el principal blanco molecular del péptido CIGB-300 en el núcleo de las células tumorales derivadas de

pulmón, cérvix, colon y próstata [Perera, Y. y col., 2009]. La inhibición de la fosforilación de B23/NPM indujo muerte celular por apoptosis y arresto del ciclo celular en dichas células, proceso antecedido por la disrupción nucleolar [Perera, Y. y col., 2009].

Finalmente, se evidenció que el CIGB-300 es capaz de modular la expresión de genes relacionados con la traducción de proteínas, el metabolismo energético y la biogénesis ribosomal, en correspondencia con las funciones adscritas a B23/NPM sobre su actividad chaperona, favorecida por la fosforilación de CK2 [Perera, Y. y col., 2009].

4.1.3 Proteína quinasa CK2:

La enzima CK2 fosforila un amplio rango de sustratos relacionados con vías de expresión génica, supervivencia celular y apoptosis. Por otro lado, se encuentra sobreexpresada en una variedad de tumores sólidos, donde promueve la proliferación y suprime la apoptosis [Sarno, S. y Pinna, L., 2008].

La enorme diversidad funcional de los sustratos fosforilados por CK2 sustenta el carácter pleiotrópico de la enzima a través de su participación en procesos celulares globales como la síntesis de ARN ribosomal y de transferencia [Ghavidel, A. y Schultz, M., 2001], la apoptosis [Guo, C. y col., 2001], la supervivencia celular [Ahmed, K. y col., 2002], y la transformación maligna [Tawfic, S. y col., 2001].

La figura 31 representa un esquema de CK2 como proteína pro-tumoral debido a la actividad anormal elevada en células tumorales, lo que conlleva a la supervivencia celular exacerbada y la inhibición de la respuesta apoptótica, que, junto a la combinación con otros oncogenes, promueve la transformación neoplásica [Sarno, S y Pinna, L., 2008].

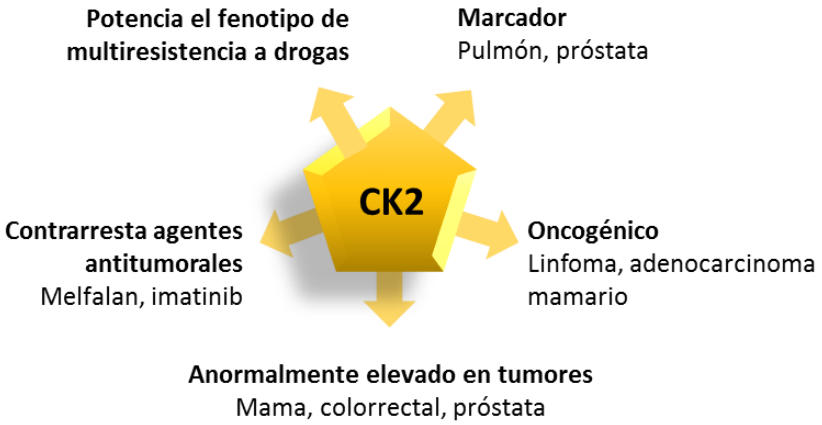


Figura 31: esquema de CK2 como inductor de cáncer. Modificado de Sarno, S y Pinna, L., 2008.

Esto sugiere que CK2 juega un papel pro-supervivencia, que en circunstancias especiales crea un ambiente celular particularmente favorable para el desarrollo y la potenciación del fenotipo tumoral [Sarno, S. y Pinna, L., 2008].

La enzima CK2 también juega un rol esencial en la angiogénesis por su interacción con factores de crecimiento y por la fosforilación con las proteínas involucradas en las cascadas de señalización, que están implicadas en dicho proceso [Montenarh, M., 2014].

Todo esto lleva a suponer, que cualquier estrategia dirigida a la atenuación de la actividad de CK2 puede ser clave para el tratamiento de diferentes enfermedades neoplásicas.

La enzima CK2 participa en la fosforilación de más de 300 proteínas celulares que en su conjunto representan cerca del 20% del fosfoproteoma celular [Meggio, F. y Pinna, L. 2003] y [Salvi, M. y col., 2009].

Entre los sustratos de la enzima CK2, se encuentran factores transcripcionales, moléculas que participan en vías de señalización, modificadores del ADN/ARN, reguladores de la síntesis proteica, proteínas estructurales, y enzimas del metabolismo celular. Ejemplo de lo expuesto, es el caso de la

nucleolina (NCL); esta proteína fue descripta por primera vez en el año 1973 por Orrick, L. y *col*. Esta fosfoproteína multifuncional se encuentra en todos los compartimentos celulares donde cumple variadas funciones [Abdelmohsen, K. y Gorospe, M., 2012].

4.1.4 La Nucleolina:

Es una de las proteínas no ribosomales del núcleo y representa no más del 10% de las proteínas totales [Ginisty, H. y col., 1999]. Lapeyre y *col*., en 1987, la describieron como una proteína de 77 KDa. Posee 3 dominios: 1- N-terminal, sitio de fosforilación por CK2 y CDK1, 2- El denominado dominio central que contiene cuatro motivos de reconocimiento del ARN y 3- Un dominio C-terminal rico en los aminoácidos Arg y Gly. El dominio N-terminal contiene múltiples sitios de fosforilación, los cuales son localizados en regiones ricas en acido glutámico y aspártico [Venkatarama Rao, S. y col., 1982].

La masa molecular aparente de la NCL se encuentra entre 100 y 110 KDa, la diferencia en el peso molecular es atribuida a la composición del dominio N-terminal el cual es altamente fosforilado [Tajrishi, M. y col., 2011].

Esta omnipotente proteína está sujeta a varias modificaciones postraduccionales incluyendo la glicosilacion [Srivastava, M y col., 1989], la metilación [Lischwe, M. y col., 1985] y la **fosforilación** [Olson, M. y col., 1974].

La fosforilación juega un rol importante en la modulación de varias actividades de la NCL y es profundamente dependiente de andrógenos. La privación de estas hormonas produce una rápida reducción de la fosforilación de la NCL y consecuentemente conduce a la cesación del crecimiento prostático [Tawfic, S. y col., 1994]. La transcripción del rARN se correlaciona con la NCL altamente fosforilada [Schneider, H. y col., 1986].

Schwab, M. y Dreyer, C en 1997, reportaron que la localización citoplasmática de la NCL coincide con una masiva fosforilación por CK2 y CDK1, y la translocación nuclear es acompañada por una desfosforilación neta. La NCL es

fosforilada por CK2 durante la interfase en las serinas y por CDK1 durante la mitosis en las treoninas y su fosforilación regula sus funciones durante el ciclo celular [Tajrishi, M. y col., 2011]. La fosforilación secuencial por CK2 y CDK1 modula la función de la NCL [Tajrishi, M. y col., 2011].

La NCL es una proteína multifacética, conocida como proteína "shuttling" que migra entre el núcleo y el citoplasma como respuesta a una señal y a través de su propiedad de vaivén nucleocitoplasmático, puede ayudar al transporte ribosomal durante la biogénesis del ribosoma [Borer, R. y col., 1989].

La NCL es abundante en el nucléolo, pero también se encuentra en otras regiones celulares, como en el citoplasma y la membrana plasmática. Esta proteína desempeña funciones clave en procesos como la remodelación de la cromatina, la transcripción del ARN ribosomal, la maduración del rARN, el ensamblaje de ribosomas, el transporte nucleocitoplasmático y la biogénesis de los ribosomas [Ginisty, H. y col., 1999]. Se une a ADN y ARN, funciona como una ADN- y ARN-helicasa, y tiene actividad de auto-escisión [Tajrishi, M. y col., 2011].

También se ha demostrado que la NCL se une al mARN de BCL2 y promueve la expresión del proto-oncogen Bcl-2 que bloquea la apoptosis en células cancerígenas [Sengupta, T. y col., 2004].

La NCL suprime la translación del mARN de TP53, previene la inducción del supresor tumoral p53 y anula la apoptosis [Takagi, M. y col., 2005]. Por otro lado, se sabe que las metaloproteinasas participan activamente en la degradación de la matriz extracelular en el proceso de angiogénesis y metástasis. La NCL se une al mARN de la metaloproteinasa 9 y mejora su translación [Fähling, M. y col., 2005].

Existe evidencia de que la NCL cumple una función en el anclaje de ciertos virus a la membrana [Izumi, R. y col., 2001], algunos ejemplos son HPIV3 (virus de la parainfluenza humano tipo 3 [Bose, S. y col., 2004], HIV (virus de la inmunodeficiencia humana) [Nisole, S. y col., 2002], HCV (virus de la hepatitis C) [Hirano, M. y col., 2003], HSV (virus del herpes simple tipo 1) [Sagou, K. y col., 2010], WSSV (virus del síndrome de la mancha blanca).

Por otro lado, la señalización por PI3K/Akt es la vía esencial que regula la distribución de la NCL, debido a que esta última, puede interactuar con fosfo-PI3K-p55. A partir del bloqueo de la fosforilación mediada por el inhibidor general de PI3K, se pudo observar que la fracción de membrana y citosólica de NCL disminuyó mientras que en la fracción nuclear aumentó considerablemente [Wu, D. y col., 2014].

El bloqueo de la NCL de la superficie celular en células endoteliales, inhibe la migración y la formación de túbulos capilares causando la apoptosis de las células, lo que lleva a sugerir que la distribución de la NCL está relacionada con el potencial metastásico [Wu, D. y col., 2014].

Muchos autores, luego de evaluar la actividad de la NCL, concluyen que esta proteína tiene un papel activo en la progresión tumoral cumplimentando su actividad en los diferentes compartimentos celulares, lo que la convierte en un blanco terapéutico, mientras que la distribución de ella puede ser un indicador predictivo, para algunos tipos de cáncer.

4.2 Objetivos:

1- Puesta a punto de la técnica 2D-PAGE. El objetivo es la adaptación y puesta a punto de la técnica de Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Bidimensional para alcanzar la sensibilidad y resolución adecuadas.

2- Análisis proteómico. Identificación de blancos moleculares relacionados con la progresión tumoral del extracto nuclear de células 3LL (carcinoma pulmonar murino), tratadas con el péptido CIGB-300.

4.3 Materiales y métodos:

4.3.1 Péptido:

El péptido cíclico CIGB-300 fue sintetizado por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba.

4.3.2 Cultivo celular y tratamiento:

La línea celular 3LL procedente de un carcinoma pulmonar espontaneo de ratón, fue cultivada en medio de cultivo esencial mínimo modificado (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 100 µg/mL de gentamicina a 37°C en atmosfera humidificada conteniendo 5% CO_2.

Para el análisis proteómico, 20 x 10^6 células tumorales se sembraron en frascos T-75. Las células fueron incubadas a una concentración de 200 µM de CIGB-300 durante 45 min.

4.3.3 Extracción de proteínas nucleares:

Las células 3LL fueron recolectadas mediante tripsinización. Luego fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) y resuspendidas en 500 µL de buffer isotónico conteniendo 10 mM acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico (HEPES)-NaOH a pH 7.5, 0.25 M de sacarosa, 1 mM acido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'N'-tetraacético (EGTA) e inhibidor de proteasas. Para solubilizar la membrana plasmática se adicionó Tritón X-100 a una concentración final de 0.25 %. Luego de 15 min a 4°C el lisado celular fue centrifugado por 15 min a 12.000 x g a 4°C. El pellet nuclear fue lavado con 500 µL de una solución conteniendo 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 0.34 M sacarosa, 0.75 mM espermidina, 0.15 mM espermina, 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 0.1% Tritón X-100 e inhibidor de proteasas, centrifugado a 1000 x g durante 5 min a 4°C y decantado. Las proteínas nucleares fueron solubilizadas en una solución de lisis conteniendo 7 M urea, 2 M tiourea, 2% 3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato (CHAPS), 0.5 % amidosulfobetaina-14 (ASB-14), 15% glicerol, 2% Dithiothreitol (DTT) e inhibidor de proteasas y centrifugado a 12000 x g

durante 1 h. El sobrenadante conteniendo las proteínas nucleares fue conservado a -70 °C para el análisis 2D-LC-MS/MS.

4.3.4 Cuantificación proteica:

Para la cuantificación se utilizó la técnica de Bradford (Bio-Rad Protein Assay). Se colocan 5 µl de la dilución de 1/10 de cada muestra y de las diluciones seriadas de la albúmina de suero bovino (ASB) por triplicado en una placa de 96 wells. Se adicionó 250 µl de reactivo Bio-Rad RCDC (compatible con agentes reductores y detergentes). Se mezcló durante 5 min y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, luego se midió la absorbancia a 595 nm. El ensayo tiene una relación lineal a la concentración de proteínas en un intervalo de 0.05-0.5mg/ml.

Una vez determinada la concentración se tomó el volumen equivalente a 600 µg de proteína y se completó con 340 µl de buffer de hidratación (7M Urea, 2M Tiourea, 2% p/v CHAPS, 0.02% azul de bromofenol, 10mM DTT y 0.5% v/v IPG buffer de 3-10 (GE Healthcare)), que es el volumen adecuado para las tiras de poliacrilamida de 18 cm.

4.3.5 Electroforesis bidimensional (2-DE):

Primera dimensión:

La primera dimensión consistente en la separación por punto isoeléctrico, se llevó a cabo a 20°C en un equipo Ettan IPGphor III (GE Healthcare Life Sciences) a 50 kV-h en aceite de silicona. Se usaron tiras de 18 cm en un rango de pH de 3-10 NL (ImmobilineDryStrip, GE Healthcare). Para la rehidratación pasiva de la tira, se colocó la muestra ya cuantificada en la tira durante 14 h para absorber todas las proteínas que hubiera en cada muestra. Ver tabla 18.

Se estableció el programa y/o los parámetros deseados para la migración electroforética en primera dimensión como se muestra a continuación:

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tabla 18: Protocolo de la 1ª Dimensión, Isoelectroenfoque Ettan IPGphorIII:

Modo de Voltaje	Voltaje (volt)	Tiempo (min)
Gradiente	0-150	5
Step	150	30
Gradiente	150-300	15
Step	300	30
Gradiente	300-3500	150
Step	3500	600

La separación por isoelectroenfoque se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones de Orbán, E. y col., 2011 y se procedió al corrimiento en 1-D donde las proteínas se localizaron en base a su pI, ver figura 32.

Figura 32: Perfil de Isoelectroenfoque.

Segunda dimensión:

Posteriormente, a la separación por isoelectroenfoque, se llevó a cabo la segunda dimensión, que es la separación por peso molecular (PM) en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% de 26×20 cm. La segunda dimensión consistió de los siguientes pasos: preparación del gel y polimerización durante 24 h, se equilibraron las tiras en 5ml de buffer de equilibrio (50mM de buffer Tris-HCl,

pH 8.8, 6M Urea, 30% v/v glicerol, 2% p/v dodecil sulfato sódico (SDS) y 0.002% p/v Azul de bromofenol) conteniendo iodoacetamida y DTT, con el fin de permitir la solubilización de las proteínas previamente enfocadas y de una completa interacción de las proteínas con el SDS de la segunda dimensión. El primer paso es colocar la tira con 5 ml de buffer de equilibrio adicionando 50 mg de DTT (concentración de 10 mg/ml) para mantener el estado reducido de las proteínas desnaturalizadas, este paso se realiza durante 20 min en agitación y a temperatura ambiente, posteriormente se quitó la solución y a continuación se añadió 225mg de iodoacetamida (concentración de 45 mg/ml) a 5 ml del buffer de equilibrio para evitar una posible reoxidación de las proteínas. Se repite la incubación de 20 min con agitación a temperatura ambiente.

Se colocaron las tiras sobre los geles y se sellaron con agarosa al 0.1%. Las condiciones de corrida para la electroforesis fueron 20 mA por 1 h y luego a 30 mA durante 12 h.

Para ambas fracciones, tratadas y no tratadas con CIGB-300, se corrieron tres geles preparativos (figura 33).

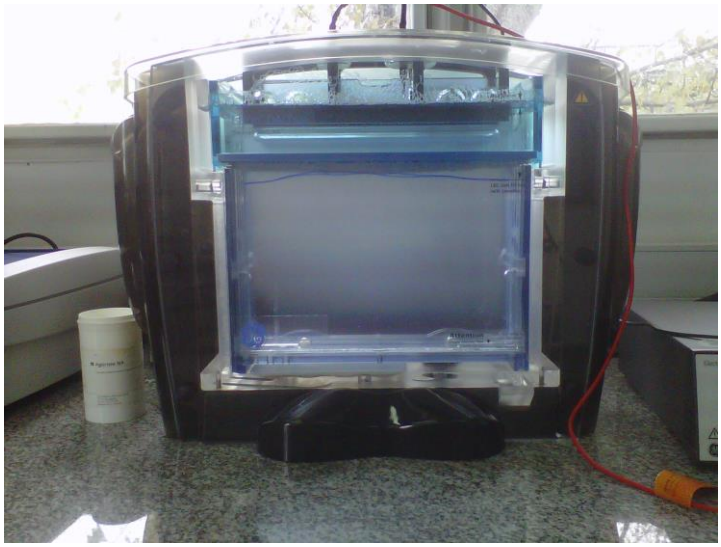


Figura 33: Segunda dimensión de la electroforesis bidimensional (2-DE).

4.3.6 Visualización proteica y análisis de imágenes 2-DE:

Los geles de cada muestra se tiñeron con PlusOne Coomassie Tablets, PhastGel Blue R-350 para el análisis de la imagen, para esto cada gel se colocó en solución conteniendo una pastilla de PhastGel Blue R, 10% v/v de ácido acético y 30% v/v de metanol durante 2 h. Luego se retiró la solución, se hicieron 3 lavados con agua destilada y se procedió a la destinción mediante 3 lavados con una solución al 40% de metanol en agua destilada.

Los geles se escanearon con el dispositivo ImageScanner III de GE Healthcare Life Sciences. Las imágenes de los geles 2D fueron analizadas y procesadas utilizando el software ImageMaster 2D Platinum 6.0. (GE Healthcare Life Sciences). La detección de los cambios en la expresión proteica se realizó primero mediante análisis automático y se confirmó por inspección visual. Se consideraron los spots que muestran un cambio en su expresión mayor a 2 veces (determinado a partir de la media) para la identificación de proteínas por MS. La masa teórica y el pI se calcularon a partir de la secuencia de las proteínas identificadas utilizando la herramienta Compute pI/MW ExPASy (http://ca.expasy.org/ herramientas / pi_tool.html).

4.3.7 Digestión en gel con tripsina:

Los spots elegidos fueron cortados en piezas de 1-3 mm^3, secados con acetonitrilo, rehidratados en 20 µl de una solución de tripsina de 25 ng/µl y digeridos a 37°C por 18 h. Luego se analizaron las proteínas mediante espectrometría de masas en un espectrómetro de masas 4800 MALDI TOF TOF *plus* de ABI en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en péptidos y proteínas de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Se aplicó el programa Mascot PMF para el estudio de los digeridos completos y el programa Mascot MSMS para el análisis de la fragmentación.

4.4 Resultados:

4.4.1 Identificación de blancos moleculares modificados a partir del tratamiento con CIGB-300:

En una primera aproximación, se utilizó 2-DE en combinación con análisis de imagen cuantitativo y secuenciación por espectrometría de masas para investigar el perfil de proteínas moduladas por CIGB-300. Para evaluar la resolución y la reproducibilidad de los mapas proteómicos, se comparó el total de spots en cada condición haciendo mínimo 3 experimentos independientes. La figura 34 y la figura 35 muestran el patrón 2-DE para las proteínas nucleares de las células 3LL tratadas con 200 µM de CIGB-300 o sin péptido (control) durante 45 min. Un total de 6 spots expresados diferencialmente se sometieron a digestión con tripsina y análisis de espectrometría de masas.

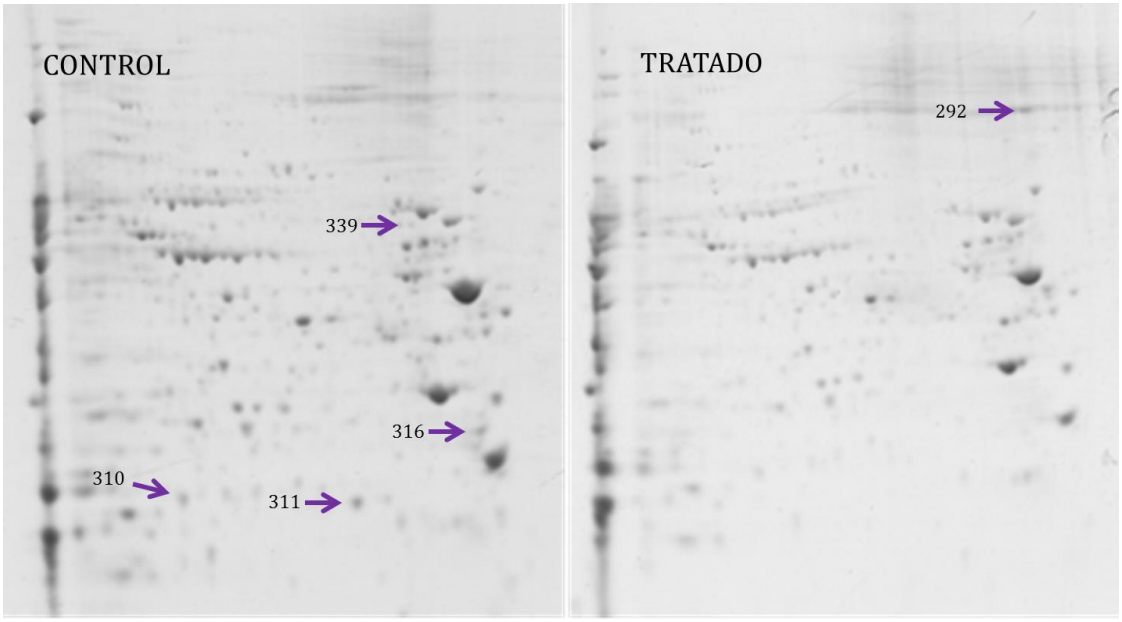


Figura 34: Perfil proteómico del extracto nuclear de células 3LL control y tratadas con el péptido CIGB-300. Las flechas indican 5 proteínas moduladas significativamente (cambio> 2) por el tratamiento con CIGB-300.

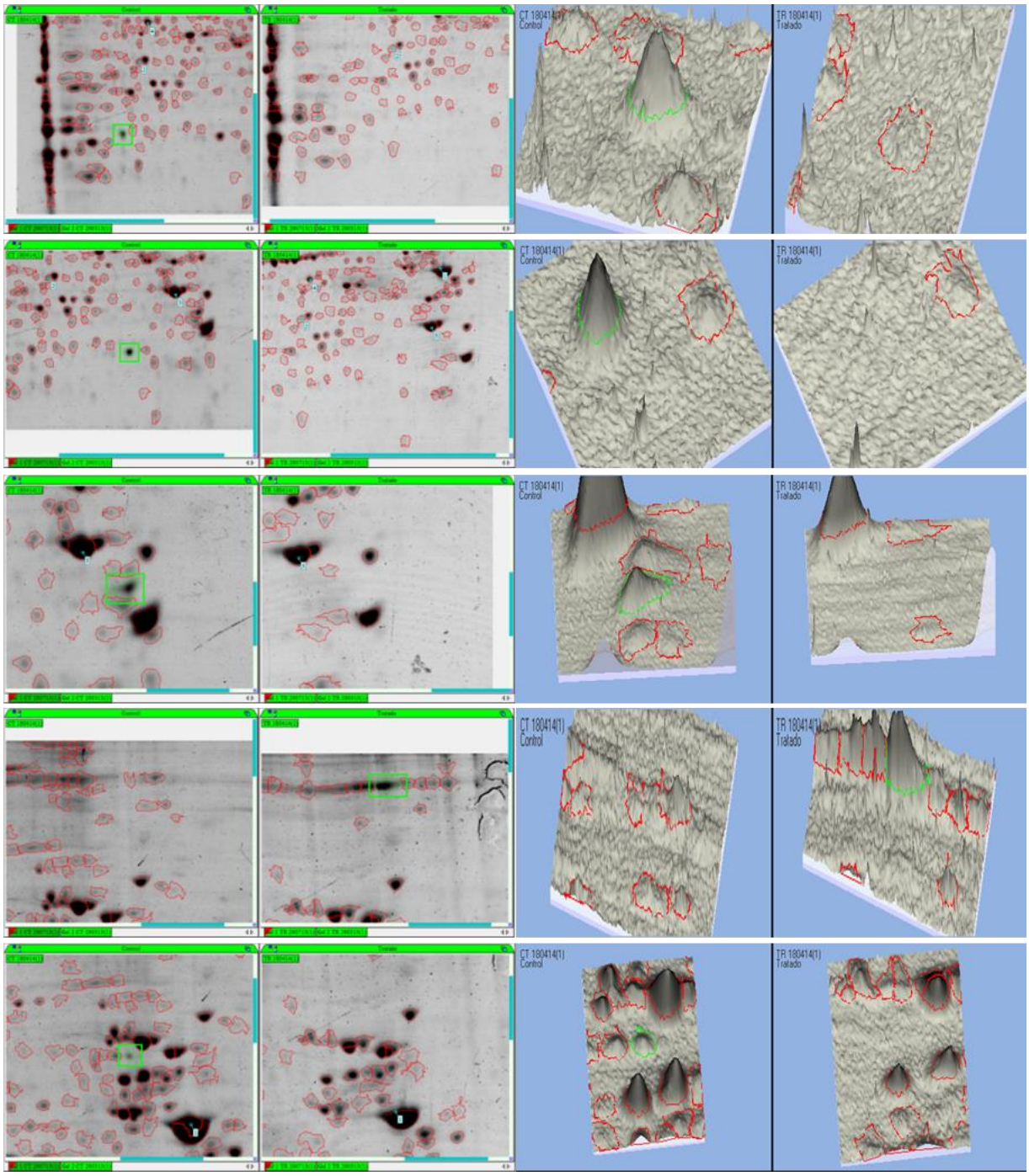


Figura 35: El panel de la izquierda muestra las regiones amplificadas de los geles correspondientes a las proteínas identificadas en el siguiente orden: 310, 311, 316, 292 y 339, control y tratado, el panel de la derecha muestra las abundancias relativas de cada spot.

Se identificaron 5 proteínas que fueron up o down reguladas más de 2 veces después del tratamiento con CIGB-300 (tabla 19).

Tabla 19: proteínas expresadas diferencialmente en células 3LL tratadas con CIGB-300, identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas.

Muestra	Proteína identificada	Peso molecular
310	**Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like**	33 KDa
311	**60S acidic ribosomal protein P0**	34 KDa
316	**Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2**	34 KDa
292	**Nucleolin**	77 KDa
339	**Péptido perteneciente a Ras GTPase-activating protein-binding protein1**	52 KDa

Las proteínas identificadas son: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like y heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 o también llamadas hnRNPs, que son proteínas de unión al ARN y están involucradas en el procesamiento del pre-mARN y el metabolismo y transporte del mARN.

La 60S acidic ribosomal protein P0 constituye una de las subunidades de los ribosomas, encargados de catalizar la síntesis de proteínas. Esta proteína está involucrada en el proceso de traducción.

Ras GTPase-activating protein-binding protein1 es un miembro de las proteínas de unión al ARN nuclear y es también un elemento de la vía de transducción de señales Ras.

4.5 Conclusión:

Se puso a punto la técnica de extracción de la fracción proteica nuclear. Se logró la obtención de geles 2D-PAGE y la rutinizacion y homogeneizacion de la técnica a fin de ofrecer servicios de análisis proteomico desde el Laboratorio de Oncología Molecular.

Como se mencionó anteriormente, el CIGB-300 es un péptido que está siendo explorado a nivel clínico. Se ha reportado su eficacia clínica en el tratamiento de mujeres con tumores malignos de cuello de útero [Solares, A. y col., 2009]. Por otro lado, las células de cáncer de pulmón han demostrado ser altamente sensibles al efecto del CIGB-300 tanto *in vitro* como *in vivo* [Perea, S. y col., 2004; Perea, S. y col., 2008; Perera, Y. y col., 2009; Perera, Y. y col., 2008], razón por la cual estos tumores se han vuelto un blanco atractivo para los ensayos clínicos.

El CIGB-300 parece promover la inestabilidad de la NCL, también llamada C23/NCL, y el deterioro del proceso de biogénesis ribosomal y traducción en células 3LL. Estos datos están en consonancia con los resultados anteriormente reportados que demuestran el efecto del CIGB-300 sobre la apoptosis mediante el bloqueo de la fosforilación mediada por CK2 de la chaperona nucleolar nucleofosmina (B23/NPM), con la consiguiente interferencia con el ensamblaje nucleolar [Rodríguez-Ulloa, A. y col., 2010].

Además, se encontraron otras proteínas implicadas en la apoptosis y la proliferación celular moduladas probablemente como consecuencia del efecto de CIGB-300. Estas proteínas podrían representar biomarcadores que podrian subrogar el efecto CIGB-300 en células tumorales. Por lo tanto, estos hallazgos podrían apoyar la combinación de CIGB-300 con fármacos quimioterapéuticos convencionales para mejorar la respuesta antitumoral.

4.5.1 Modelo propuesto:

En función de lo expuesto, el péptido CIGB-300 anularía la fosforilación de la NCL mediada por CK2, lo que provocaría un aumento de la NCL en el nucleo y aboliría la actividad de esta en los diferentes compartimentos celulares (figura 36). Estos resultados estan en concordancia con los obtenidos por Wu, D. y colaboradores que postulan que la inhibicion de la fosforilacion mediada por PI3K provoca un aumento de NCL en la fraccion nuclear [Wu, D. y col., 2014].

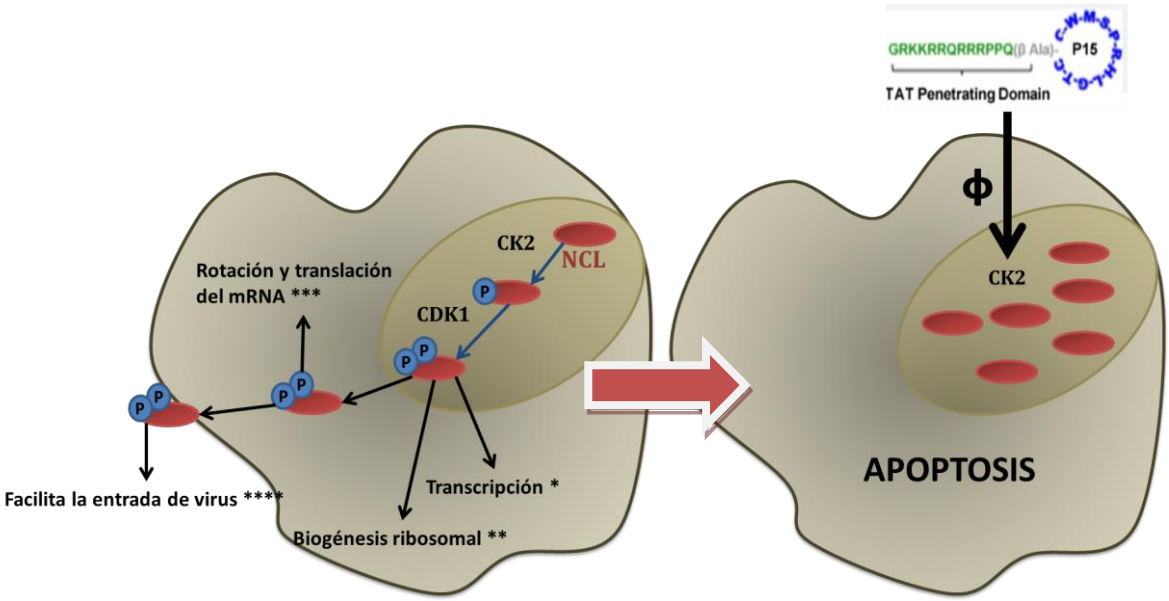


Figura 36: Modelo de actividad de la NCL en una célula tumoral. La NCL cumple variadas funciones en los diferentes compartimentos celulares luego de ser fosforilada secuencialmente por CK2 y CDK1. Una vez fosforilada, la NCL participa en la transcripción de proto-oncogenes* [Sengupta, T. y col., 2004], la biogénesis de los ribosomas** [Ginisty, H. y col., 1999], en la rotación y translación del mRNA de oncoproteínas involucradas en la carcinogénesis*** [Abdelmohsen, K. y Gorospe, M., 2012] y en el anclaje de ciertos virus a la membrana y su replicación**** [Izumi, R. y col., 2001].

5 Capítulo IV:

Conclusiones y perspectivas generales:

El desarrollo de terapias complementarias no invasivas basadas en péptidos con actividad biológica para el tratamiento de diversas enfermedades es una gran deuda del mundo científico con la sociedad.

Las habilidades alcanzadas durante el transcurso del presente trabajo sentaran las bases para el análisis de nuevos compuestos basados en péptidos y resultaran de gran utilidad en el desarrollo de moléculas antiproliferativas prometedoras destinadas a terapias oncológicas.

Los conocimientos adquiridos pueden contribuir al diseño racional de una nueva generación de péptidos terapéuticos con mayor eficacia y estabilidad, brindando al mercado farmacéutico, productos innovadores y optimizados.

La proyección es explorar nuevas rutas más allá del diseño tradicional de péptidos con péptidos multifuncionales y penetrantes de células, así como conjugados de fármacos peptídicos que conducirán a la obtención de medicamentos moleculares multifuncionales con eficacia mejorada, propiedades farmacocinéticas potenciadas y administración selectiva. Asimismo, se proyecta trasladar nuestra hipótesis a otras áreas de la medicina ávidas de nuevas moléculas activas.

Teniendo en cuenta estas premisas, los péptidos, ofrecen un potencial de crecimiento enorme como terapias futuras para el tratamiento de las necesidades médicas no cubiertas, anticipando un futuro promisorio para la terapéutica y el diagnóstico.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

6 Bibliografía:

Abdelmohsen, K. y Gorospe, M. 2012. RNA-binding protein nucleolin in disease. RNA Biology, 9:799-808.

Abdelmohsen, K., Tominaga, K., Lee, E., Srikantan, S., Kang, M., Kim, M., Selimyan, R., Martindale, J., Yang, X., Carrier, F., Zhan, M., Becker, K. y Gorospe, M. 2011. Enhanced translation by Nucleolin via G-rich elements in coding and non-coding regions of target mRNAs. Nucleic Acids Research, 1-18.

Adams, J. 2004. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. Cancer Cell, 5:417-421.

Adams, J. y Kauffman, M. 2004. Development of the Proteasome Inhibitor VelcadeTM (Bortezomib). Cancer Investigation, 22:304-311.

Ahmed, K., Gerber, D. y Cochet, C. 2002. Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. Trends in Cell Biology, 12:226-230.

Anderson, N. y Anderson, N. 1998. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. Electrophoresis, 19:1853-1861.

Ando, K., Mori, K., Corradini, N., Redini, F. y Heymann, D. 2011. Mifamurtide for the treatment of nonmetastatic osteosarcoma. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 12:285-292.

Albericio, F. 2004. Developments in peptide and amide synthesis. Current Opinion in Chemical Biology, 8:211-221.

Albericio, F., Annis, I., Royo, M. y Barany, G. 2000. Preparation and handling of peptides containing methionine and cysteine. In: Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach. Chan and White (eds) Oxford University Press Inc., New York, p.77-114.

Alonso, D., Ripoll, G., Garona, J., Iannucci, N. y Gomez, D. 2011. Metastasis: Recent Discoveries and Novel Perioperative Treatment Strategies with Particular Interest in the Hemostatic Compound Desmopressin. Current Pharmaceutical Biotechnology, 12:1974-1980.

Atherton, E., Fox, H., Harkiss, D., Logan, C., Sheppard, R. y Williams, B. 1978. A Mild Procedure for Solid Phase Peptide Synthesis: Use of Fluorenylmethoxycarbonylamino–acids. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 537-539.

Baker, M., Maloy, W., Zasloff, M. y Jacob, L. 1993. Anticancer Efficacy of Magainin2 and Analogue Peptides. Cancer Research, 53:3052-3057.

Barth, T., Pencheva, N., Barthová, J., Velek, J., Ježek, J., Kašička, V., Machová, A., Hauzerová L. y Ubik. K. 2002. Modification of the peptide bond in N-terminal part of [8-D-arginine] deaminovasopressin (dDAVP). Bulgarian Academy of Sciences, 55:35-40.

Blanco-Canosa, J. y Dawson, P. 2008. An Efficient Fmoc-SPPS Approach for the Generation of Thioester Peptide Precursors for Use in Native Chemical Ligation. Angewandte Chemie International, 47:6851-6855.

Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. y Tomita, M. 1992. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. Biochimica et Biophysica Acta, 1121:130-136.

Belluzzi, J. y Stein, L. 1977. Enkephalin may mediate euphoria and drive-reduction reward. Nature, 266:556-558.

Benavent, F., Perera, Y., Alonso, D., Perea, S., Gómez, D. y Farina, H. 2014. Mechanisms of Cellular Uptake, Intracellular Transportation, and Degradation of CIGB-300, a Tat-Conjugated Peptide, in Tumor Cell Lines. Molecular Pharmaceutics, 11: 1798-1807.

Bentley, R. 2009. Different roads to discovery; Prontosil (hence sulfa drugs) and penicillin (hence b-lactams). Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36:775-786.

Birnbaumer, M. 2000. Vasopressin Receptors. Trends in Endocrinology and Metabolism, 11:406-410.

Bischoff, R. y Kolbe, H. 1994. Deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins and peptides: structural determinants and analytical methodology. Journal of Chromatography B, 662:261-278.

Borer, R., Lehner, C., Eppenberger, H. y Nigg, E. 1989. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. Cell, 56:379-390.

Bose, S., Basu, M., y Banerjee, A. 2004. Role of Nucleolin in Human Parainfluenza Virus Type 3 Infection of Human Lung Epithelial Cells. Journal of Virology, 78:8146-8158.

Bouchet, A., Iannucci, N., Pastrian, M., Cascone, O., Santos, N., Disalvo, E. y Hollmann, A. 2014. Biological activity of antibacterial peptides matches synergism

between electrostatic and nonelectrostatic forces. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 114:363-371.

Bouvet, P., Diaz, J., Kindbeiter, K., Madjar, J. y Amalric, F. 1998. Nucleolin Interacts with Several Ribosomal Proteins through Its RGG Domain. The Journal of Biological Chemistry, 273:19025-19029.

Brogden, K. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature, 3:238-250.

Brul, S. y Coote, P. 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. International Journal of Food Microbiology, 50:1-17.

Buku, A., Yamin, N. y Gazis, D. 1987. 4-Proline and 4-hydroxiproline analogs of arginine vasopressin: Role of the proline substitution in the two β-turns of vasopressin. Experientia 43:1218-1219.

Burbach, J.P. 2011. What are neuropeptides?. Methods in Molecular Biology Springer, 789:1-36.

Carpino, L. y Han, G. 1972. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. Journal of Organic Chemistry, 37:3404-3409.

Carraway, R. y Leeman, S. 1973. The Isolation of a New Hypotensive Peptide, Neurotensin, from Bovine Hypothalami. Journal of Biological Chemistry, 248:6854-6861.

Carreño, C., Méndez, M., Kim, Y., Kim, H., Kates, S., Andreu, D. y Albericio, F. 2000. Nsc and Fmoc Na-amino protection for solid-phase peptide synthesis: a parallel study. Journal of Peptide Research, 56:63-69.

Cegielska-Radziejewska, R., Lesnierowski, G. y Kijowski, J. 2009. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by thermochemical technique. European Food Research and Technology, 228:841-845.

Chan, D., Prenner, E. y Vogel, H. 2006. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. Biochimica et Biophysica Acta, 1758:1184-1202.

Chandrudu, S., Simerska, P. y Toth, I. 2013. Chemical Methods for Peptide and Protein Production. Molecules, 18:4373-4388.

Chaudhary, J. y Munshi, M. 1995. Scanning electron microscopic analysis of breast aspirates. Cytopathology, 6:162-167.

Chavkin, C., James, I. y Goldstein, A. 1982. Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. Science, 215:413-415.

Clarke, S. 1987. Propensity for spontaneous succinimide formation from aspartyl and asparaginyl residues in cellular proteins. International Journal of Peptide and Protein Research, 30:808-821.

Colgrave, M. y Craik, D. 2004. Thermal, Chemical, and Enzymatic Stability of the Cyclotide Kalata B1: The Importance of the Cyclic Cystine Knot. Biochemistry, 43:5965-5975.

Craik, D., Daly, N., Bond, T. y Waine, C. 1999. Plant Cyclotides: A Unique Family of Cyclic and Knotted Proteins that Defines the Cyclic Cystine Knot Structural Motif. Journal of Molecular Biology, 294:1327-1336.

Craik, D., Fairlie, D., Liras, S. y Price, D. 2013. The Future of Peptide-based Drugs. Chemical Biology and Drug Design, 81:136-147.

Craik, D., Simonsen, S. y Daly, N. 2002. The cyclotides: novel macrocyclic peptides as scaffolds in drug design. Current Opinion in Drug Discovery and Development, 5:251-260.

Cunningham, F., Proctor, V. y Goetsch, S. 1991. Egg-white lysozyme as a food preservative: an overview. World's Poultry Science Journal, 47:141-163.

Czaplewski, C., Kaźmierkiewicz, R. y Ciarkowski, J. 1998. Molecular modeling of the human vasopressin V2 receptor/agonist complex. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 12:275-287.

Czikora, I., Sridhar, S., Gorshkov B., Alieva, I., Kasa, A., Gonzales, J., Potapenko, O., Umapathy, N., Pillich, H., Rick F., Block N., Verin, A., Chakraborty, T., Matthay, M., Schally, A. y Lucas R. 2014. Protective effect of Growth Hormone-Releasing Hormone agonist in bacterial toxin-induced pulmonary barrier dysfunction. Frontiers in Physiology. Oxidant Physiology, 5/259.

Daly, N., Gustafson, K. y Craik, D. 2004. The role of the cyclic peptide backbone in the anti-HIV activity of the cyclotide kalata B1. Febs Letters, 574:69-72.

Daly, N., Love S., Alewood, P. y Craik, D. 1999. Chemical Synthesis and Folding Pathways of Large Cyclic Polypeptides: Studies of the Cystine Knot Polypeptide Kalata B1. Biochemistry, 38:10606-10614.

Daly, N., Rosengren, K. y Craik D. 2009. Discovery, structure and biological activities of Cyclotides. Advanced Drug Delivery Reviews, 61:918-930.

Du Vigneaud, V., Ressler, C. y Trippett, S. 1953. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. Journal of Biological Chemistry, 205:949-957.

Dubos, R. 1939. Studies on bactericidal agent extracted from a soil Bacillus: II. Protective effect of the vactericidal agent against experimental Pneumococcus infections in mice. Journal of Experimental Medicine, 70:11-17.

Duro-Castano, A., Conejos-Sánchez, I. y Vicent, M. (2014). Peptide-Based Polymer Therapeutics. Polymers 6:515-551.

Eldar-Finkelman, H. y Eisenstein, M. 2009. Peptide Inhibitors Targeting Protein Kinases. Current Pharmaceutical Design, 15.

Eliassen, L., Berge, G., Leknessund, A., Wikman, M., Lindin, I., Løkke, C., Ponthan, F., Johnsen, J., Sveinbjørnsson, B., Kogner, P., Flægstad, T. y Rekdal, Ø. 2006. The antimicrobial peptide, Lactoferricin B, is cytotoxic to neuroblastoma cells in vitro and inhibits xenograft growth in vivo. International Journal of Cancer, 119:493-500.

Elliott, D., Horton, E. y Lewis, G. 1960. Actions of pure bradykinin. Journal of Physiology, 153:473-480.

Erlenbach, I. 2001. Tesis Doctoral: The Molecular Basis of V2 Vasopressin Receptor/G Protein Coupling Selectivity.

Esser, J., Krenning, E., Teunissen, J., Kooij, P., van Gameren, A., Bakker, W. y Kwekkeboom, D. 2006. Comparison of [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate and [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotide: which peptide is preferable for PRRT?. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 33:1346-1351.

Fähling, M., Steege, A., Perlewitz, A., Nafz, B., Mrowka, R., Persson, P. y Thiele, B. 2005. Role of nucleolin in posttranscriptional control of MMP-9 expression. Biochimica et Biophysica Acta, 1731:32-40.

Farber, E. 1984. The Multistep Nature of Cancer Development. Cancer Research, 44:4217-4223.

Fernández De Caleya, R., González-Pascual, B., García-Olmedo, F. y Carbonero, P. 1972. Susceptibility of Phytopathogenic Bacteria to Wheat Purothionins In Vitro. Applied Microbiology, 23:998-1000.

Ferrari, R., Callerio, C. y Podio, G. 1959. Antiviral activity of lysozyme. Nature, 183:548.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Fields, G. y Noble, R. 1990. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. International Journal of Peptide and Protein Research, 35:161-214.

Fountoulakis, M. y Lahm, H. 1998. Review Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. Journal of Chromatography A, 826:109–134.

Fosgerau, K y Hoffmann, T. 2014. Peptide therapeutics: current status and future directions. Drug Discovery Today, 20:122-128.

Fric, I., Kodicek, M., Flegel, M. y Zaoral, M. 1975. Circular-Dichroic Spectra of Vasopressin Analogues and Their Cyclic Fragments. European Journal of Biochemistry, 56:493-502.

Galmarini, C., D'Incalci, M. y Allavena, P. 2014. Trabectedin and Plitidepsin: Drugs from the Sea that Strike the Tumor Microenvironment. Marine Drugs, 12:719-733.

Gaspar, D., Veiga, S. y Castanho, A. 2013. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. Frontiers in Microbiology. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy, 4, 294.

Geiger, T. y Clarke, S. 1986. Deamidation, Isomerization, and Racemization at Asparaginyl and Aspartyl Residues in Peptides. The Journal of Biological Chemistry, 262:785-794.

Gershengorn, M. 1982. Thyrotropin releasing hormone. A review of the mechanisms of acute stimulation of pituitary hormone release. Molecular and Cellular Biochemistry, 45:163-179.

Ghavidel, A. y Schultz, M. 2001. TATA Binding Protein-Associated CK2 Transduces DNA Damage Signals to the RNA Polymerase III Transcriptional Machinery. Cell, 106:575-584.

Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B. y Bouvet, P. 1999. Structure and functions of nucleolin. Journal of Cell Science, 112:761-772.

González, R., Albericio, F., Cascone, O. y Iannucci, N. 2010. Improved antimicrobial activity of h-lysozyme (107-115) by rational Ala substitution. Journal of Peptide Science, 16:424-429.

Gongora-Benítez, M., Tulla-Puche, J. y Albericio, F. (2014). Multifaceted Roles of Disulfide Bonds. Peptides as Therapeutics. Chemical Reviews.

Göransson, U. y Craik, D. 2003. Disulfide Mapping of the Cyclotide Kalata B1. The Journal of Biological Chemistry, 278:48188-48196.

Görg, A., Weiss, W. y Dunn, M. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics, 4:3665-3685.

Grammatopoulos, D. y Chrousos, G. 2002. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. Trends in Endocrinology and Metabolism, 13:436-444.

Gran, L. 1973. On the effect of a polypeptide isolated from "Kalata-Kalata" (Oldenlandia affinis DC) on the oestrogen dominated uterus. Acta Pharmacologica et Toxicologica, 33:400-408.

Greaves M. y Maley C. C. 2012. Clonal evolution in cáncer. Nature, 481:306-313.

Gregory, H., Hardy, P., Jones, D., Kenner, G. y Sheppard, R. 1964. The antral hormone gastrin. Structure of gastrin. Nature, 204:931-933.

Gunasekera, S., Daly, N., Anderson M. y Craik, D. 2006. Chemical Synthesis and Biosynthesis of the Cyclotide Family of Circular Proteins. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life, 58:515-524.

Guo, C., Yu, S., Davis, A., Wang, H., Green, J. y Ahmed, K. 2001. A Potential Role of Nuclear Matrix-associated Protein Kinase CK2 in Protection against Drug-induced Apoptosis in Cancer Cells. The Journal of Biological Chemistry, 276:5992-5999.

Gustafson, K., McKee, T. y Bokesch, H. 2004. Anti-HIV Cyclotides. Current Protein and Peptide Science, 5:331-340.

Gygi, S., Corthals, G., Zhang, Y., Rochon, Y. y Aebersold, R. 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis based proteome analysis technology. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97:9390-9395.

Hancock, R. y Diamond, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends in Microbiology, 8:402-410.

Harris, P. y Brimble, M. 2013. Comparison of Boc and Fmoc SPPS Strategies for the Preparation of C-Terminal Peptide α-Thiolesters: NY-ESO-1 ^{39}Cys-^{68}Ala-COSR. Peptide Science, 100:356-365.

Hechter, O., Terada, S., Spitsberg, V., Nakahara, T., Nakagawaga, S. y Flouret, G. 1978. Neurohypophyseal hormone-responsive renal adenylate cyclase. III. Relationship between affinity and intrinsic activity in neurohypophyseal hormones and structural analogs. The Journal of Biological Chemistry, 253:3230-3237.

Helander, I., von Wright, A. y Mattila-Sandholm, T. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. Trends in Food Science and Technology, 8:146-150.

Herrmann, A., Burman, R., Mylne, J., Karlsson, G., Gullbo, J., Craik, D., Clark, R. y Göransson, U. 2008. The alpine violet, Viola biflora, is a rich source of cyclotides with potent cytotoxicity. Phytochemistry, 69:939-952.

Hermo, G., Torres, P., Ripoll, G., Scursoni, A., Gomez, D., Alonso, D. y Gobello, C. 2008. Perioperative desmopressin prolongs survival in surgically treated bitches with mammary gland tumours: A pilot study. The Veterinary Journal, 178:103-108.

Henderson, R., Mossman, S., Nairn, N. y Cheever, M. 2005. Cancer vaccines and immunotherapies: emerging perspectives. Vaccine, 23:2359-2362.

Hill, C. y Dunbar J. 2002. The effects of acute and chronic alpha melanocyte stimulating hormone (MSH) on cardiovascular dynamics in conscious rats. Peptides, 23:1625-1630.

Hirano, M., Kaneko, S., Yamashita, T., Luo, H., Qin, W., Shirota, Y., Nomura, T., Kobayashi, K. y Seishi Murakami. 2003. Direct Interaction between Nucleolin and Hepatitis C Virus NS5B. The Journal of Biological Chemistry, 278:5109-5115.

Hoskin, D. y Ramamoorthy, A. 2008. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. Biochimica et Biophysica Acta, 1778:357-375.

Houghten, R. 1985. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids (simultaneous multiple-peptide synthesis). Proceedings of the National Academy of Sciences, 82:5131-5135.

Hoyle, C. 1998. Neuropeptide families: evolutionary perspectives. Regulatory Peptides, 73:1–33.

Hu, G. 2009. Peptide Synthesis in Pharmaceutical Manufacturing. BioProcessing Journal, 8:60-62.

Hui, L., Leung, K. y Chen, H. 2002. The combined effects of antibacterial peptide cecropin A and anti-cancer agents on leukemia cells. Anticancer Research, 22:2811-2816.

Iannucci, N., Curto, L., Albericio, F., Cascone, O. y Delfino, J. 2013. Structural Glance Into a Novel Anti-Staphylococcal Peptide. Biopolymers, Peptide Science, 102:49–57.

Iannucci, N., Ripoll, G., Garona, J., Cascone, O., Ciccia, G., Gómez, D. y Alonso, D. 2011. Antiproliferative effect of 1-deamino-8-darginine vasopressin analogs on human breast cancer cells. Future Medicinal Chemistry, 3:1987-1993.

Ibrahim, H., Thomas, U., y Pellegrini, A. 2001. A Helix-Loop-Helix Peptide at the Upper Lip of the Active Site Cleft of Lysozyme Confers Potent Antimicrobial Activity with Membrane Permeabilization Action. The Journal of Biological Chemistry, 276:43767-43774.

Iwasaki, T., Ishibashi, J., Tanaka, H., Sato, M., Asaoka, A., Taylor, D. y Yamakawa, M. 2009. Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface. Peptides 30:660-668.

Izumi, R., Valdez, B., Banerjee, R., Srivastava, M. y Dasgupta, A. 2001. Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. Virus Research, 76:17-29.

Jain, R., Duda, D., Clark J. y Loeffler, J. 2006. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. Nature Clinical Practice Oncology, 3:24-40.

Jemal A., Bray F., Center M., Ferlay J., Ward E. y Forman D. 2011. Global Cancer Statistics. A Cancer Journal for Clinicians, 61:69-90.

Jiménez, J., Giralt, E. y Albericio, F. 2004. Péptidos y la industria farmacéutica. Anales de la real sociedad española de química.

Jennings, C., West J., Waine C., Craik, D., y Anderson, M. 2001. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: The cyclic knotted proteins from Oldenlandia affinis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98:10614-10619.

Jost, K., Lbel, M. y Brtnik, F. 1987. CRC Handbook of Neurohypophyseal Hormone Analogs, 1:109.

Katz, J., Janik J. y Younes, A. 2011. Brentuximab Vedotin (SGN-35). Clinical Cancer Research, 17:6428-6436.

Kaufmann, J. y Vischer, U. 2003. Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP). Journal of Thrombosis and Haemostasis, 1:682-689.

Keegan, B., Akerman, B., Péqueux, C. y North, W. 2005. Provasopressin expression by breast cancer cells: implications for growth and novel treatment strategies. Breast Cancer Research and Treatment, 95:265-277.

Kimmerlin, T. y Seebach, D. 2005. 100 years of peptide synthesis: ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to b-peptide assemblies. The Journal of Peptide Research, 65:229-260.

Kosfeld, M., Heinrichs, M., Zak, P., Fischbacher, U. y Fehr, E. 2005. Oxytocin increases trust in humans. Nature, 435:673-676.

Kowalczyk, W., Prahl, A., Derdowska, I., Sobolewski, D., Olejnik, J., Zabrocki, J., Borovicková, L., Slaninová, J. y Lammek, B. 2006. Analogues of neurohypophyseal hormones, oxytocin and arginine vasopressin, conformationally restricted in the N-terminal part of the molecule. Journal of Medicinal Chemistry, 49:2016-2021.

Kritzer, J., Stephens, O., Guarracino, D., Reznik, S., y Schepartz, A. 2005. β-Peptides as inhibitors of protein–protein interactions. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 13:11-16.

Langs, D., Smith, G., Stezowski, J. y Hughes, R. 1986. Structure of pressinoic acid: the cyclic moiety of vasopressin. Science, 232:1240-2.

Lapeyre, B., Bourbon, H. y Amalric, F. 1987. Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: An unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. Proceedings of the National Academy of Sciences, 84:1472-1476.

Larsson, L., Fahrenkrug, J., Schaffalitzky de Muckadell, O., Sundler, F., Hakansont, R. y Rehfeld, J. 1976. Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. Cell Biology, 73:3197-3200.

Lischwe, M., Cook, R., Ahn, Y., Yeoman, L. y Busch, H. 1985. Clustering of glycine and NG,NG-dimethylarginine in nucleolar protein C23. Biochemistry, 24:6025-6028.

Loh, H., Tseng, L., Wei E. y Lit C. 1976. β-Endorphin is a potent analgesic agent. Proceedings of the National Academy of Sciences, 73:2895-2898.

Lu, J., Blazyk, J. y Lorigan, G. 2006. Exploring membrane selectivity of the antimicrobial peptide KIGAKI using solid-state NMR spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta, 1758:1303-1313.

Mader, J. y Hoskin, D. 2006. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. Expert Opinion on Investigational Drugs, 15:1354-3784.

Mader, J., Salsman, J., Conrad, D. y Hoskin, D. 2005. Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines. Molecular Cancer Therapeutics, 4:612-624.

Maggio, J. y Mantyh, P. 1994. History of Tachykinin Peptides. The Tachykinin Receptors. The Receptors, pp 1-21.

Mains R. y Eipper B. 1999. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. The Neuropeptides.

Macion-Dazard, R., Callahan, N., Xu, Z., Wu, N., Thibonnier, M. y Shoham, M. 2006. Mapping the Binding Site of Six Nonpeptide Antagonists to the Human V2-Renal Vasopressin Receptor. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 316:564–571.

Manning, M., Balaspiri, L., Acosta, M. y Sawyer, W. 1973. Solid Phase Synthesis of [1-Deamino, 4-valine]-8-D-arginine-vasopressin (DVDAVP), a Highly Potent and Specific Antidiuretic Agent Possessing Protracted Effects. Journal of Medicinal Chemistry, 16:975-978.

Manning, M., Balaspiri, L., Judd, J., Acosta, M. y Sawyer, W. 1974. Probing the molecular basis of antidiuretic specificity and duration of action with synthetic peptides. Febs Letters, 44:229-232.

Manning, M., Chou, D., Murphy, B., Payne, R. y Katayama, D. 2010. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. Pharmaceutical Research, 27:544-575.

Manning, M., Coy, E., Sawyer, W. y Acosta, M. 1973. Solid-Phase Synthesis and Some Pharmacological Properties of 4-Threonine Analogs of Vasopressins and Vasotocin and of Arginine-vasopressin and Arginine-vasotocin. Journal of Medicinal Chemistry, 16:463-466.

Manning, M., Misicka, A., Olma, A., Bankowski, K., Stoev, S., Chini, B., Durroux, T., Mouillac, B., Corbani, M. y Guillon, G. 2012. Oxytocin and Vasopressin Agonists and Antagonists as Research Tools and Potential Therapeutics. Journal of Neuroendocrinology, 24:609-628.

Manning, M., Stoev, S., Chini, B., Durroux, T., Mouillac, B. and Guillon, G. 2008. Peptide and non-peptide agonists and antagonists for the vasopressin and oxytocin V1a, V1b, V2 and OT receptors: research tools and potential therapeutic agents. Progress in Brain Research, 170:473-512.

Mannucci, M. 2012. Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders. Treatment of Hemophilia, 11.

Mannucci, P. y Cattaneo, M. 2013. Desmopressin (DDAVP). Chapter III. Platelets, 3rd edition, pp.1243-1255.

Matsuzaki, K. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. Biochimica et Biophysica Acta, 1462:1-10.

May, M. y Carey, R. 1985. Rapid Adrenocorticotropic Hormone Test in Practice. The American Journal of Medicine, 79:679-682.

Meggio, F. y Pinna, L. 2003. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? The FASEB Journal, 17:349-368.

Merrifield, R. 1963. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. Contribution from the Rockefeller Institute. N. Y., 85:2149-2154.

Micale, V., Campo, S., D'Ascola, A., Guerrera, M., Levanti M., Germanà, A. y Muglia, U. 2014. Cholecystokinin: How many functions? Observations in seabreams. General and Comparative Endocrinology. En Prensa.

Mine, Y., Ma, F. y Lauriau, S. 2004. Antimicrobial Peptides Released by Enzymatic Hydrolysis of Hen Egg White Lysozyme. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52:1088-1094.

Mochizuki, S., Soejima, K., Shimoda, M., Abe, H., Sasaki, A., Okano, H., Okano, H. y Okada, Y. 2012. Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor. Journal of the National Cancer Institute, 104:906-922.

Monstein, H., Truedsson, M., Ryberg, A. y Ohlsson, B. 2008. Vasopressin receptor mRNA expression in the human gastrointestinal tract. European Surgical Research, 40:34-40.

Montenarh, M. 2014. Protein Kinase CK2 and Angiogenesis. Advances in Clinical and Experimental Medicine, 23:153-158.

Morrison, K. y Weiss, G. 2001. Combinatorial alanine-scanning. Current Opinion in Chemical Biology, 5:302-307.

Murphy, D. y Gainer, H. 2016. Molecular Neuroendocrinology: From Genome to Physiology. ISBN: 978-1-118-76037-6. Wiley-Blackwell.

Nguyen, L., Haney, E. y Vogel, H. 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends in Biotechnology, 29:464-472.

Nisole, S., Said, E., Mische, C., Prevost, M., Krust, B., Bouvet, P., Bianco, A., Briand, J. y Hovanessian, A. 2002. The Anti-HIV Pentameric Pseudopeptide HB-19 Binds the C-terminal End of Nucleolin and Prevents Anchorage of Virus Particles in the Plasma Membrane of Target Cells. The Journal of Biological Chemistry, 277:20877-20886.

North, W., Fay, M. y Du, J. 1999. MCF-7 breast cancer cells express normal forms of all vasopressin receptors plus an abnormal V2R. Peptides, 20:837-842.

North, W., Fay, M., Longo, K., y Du J. 1998. Expression of All Known Vasopressin Receptor Subtypes by Small Cell Tumors Implies a Multifaceted Role for this Neuropeptide. Cancer research, 58:1866-1871.

North, W., Pai, S., Friedmann, A., Yu, X., Fay, M. y Memoli, V. 1995. Vasopressin gene related products are markers of human breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment, 34:229-235.

O'Farrells, P. 1975. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. The Journal of Biological Chemistry, 250:4007-4021.

O'halloran, D. 1991. Calcitonin gene related peptide. British Medical Journal, 302:739-740.

Olson, M., Orrick, L., Jones, C. y Busch, H. 1974. Phosphorylation of Acid-soluble Nucleolar Proteins of Novikoff Hepatoma Ascites Cells in Vitro. The Journal of Biological Chemistry, 249:2823-2827.

Orbán, E., Manea, M., Marquadt, A., Bánóczi, Z., Csík, G., Fellinger, E., Bősze, S. y Hudecz, F. 2011. A New Daunomycin. Peptide Conjugate: Synthesis, Characterization and the Effect on the Protein Expression Profile of HL-60 Cells in Vitro. Bioconjugate Chemistry, 22:2154-2165.

Orrick, L., Olson, M. y Busch, H. 1973. Comparison of Nucleolar Proteins of Normal Rat Liver and Novikoff Hepatoma Ascites Cells by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 70:1316-1320.

Osugi, T., Ubuka, T. y Tsutsui, K. 2014. Review: evolution of GnIH and related peptides structure and function in the chordates. Frontiers in Neuroscience, Neuroendocrine Science, 8/255.

Papo, N. y Shai, Y. 2003. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? Peptides, 24:1693-1703.

Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Klauser, S., Hunziker, P. y Von Fellenberg, R. 1997. Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. Journal of Applied Microbiology, 82:372-378.

Perea, S., Reyes, O., Baladron, I., Perera, Y., Farina, H., Gil, J., Rodríguez, A., Bacardi, D., Marcelo, J., Cosme, K., Cruz, M., Valenzuela, C., López-Saura, P., Puchades, Y., Serrano J., Mendoza, O., Castellanos, L., Sánchez, A., Betancourt, L., Besada, V., Silva, R., López, E., Falcón, V., Hernández, I., Solares, M., Santan, A., Díaz, A., Ramos, T., López, C., Ariosa, J., González L., Garay, H., Gómez, D., Gómez, R., Alonso, D., Sigman, H., Herrera, L. y Acevedo, B. 2008. CIGB-300, a novel proapoptotic peptide that impairs the CK2 phosphorylation and exhibits anticancer properties both in vitro and in vivo. Molecular and Cellular Biochemistry, 316:163-167.

Perea, S., Reyes, O., Puchades, Y., Mendoza, O., Vispo, N., Torrens, I., Santos, A., Silva, R., Acevedo, B., López, E., Falcón, V. y Alonso, D. 2004. Antitumor Effect of a Novel Proapoptotic Peptide that Impairs the Phosphorylation by the Protein Kinase 2 (Casein Kinase 2). Cancer Research, 64:7127-7129.

Perera, Y., Costales, H., Díaz, Y., Reyes, O., Farina, H., Mendez, L., Gómez, R., Acevedo, B., Gómez, D., Alonso, D. y Perea, S. 2012. Sensitivity of tumor cells towards CIGB-300 anticancer peptide relies on its nucleolar localization. Journal of Peptide Science, 18:215-223.

Perera, Y., Farina, H., Gil, J., Rodriguez, A., Benavent, F., Castellanos, L., Gómez, R., Acevedo, B., Alonso, D. y Perea, S. 2009. Anticancer peptide CIGB-300 binds to nucleophosmin/B23, impairs its CK2-mediated phosphorylation, and leads to apoptosis through its nucleolar disassembly activity. Molecular Cancer Therapeutics, 8:1189-1196.

Perera, Y., Farina, H., Hernández, I., Mendoza, O., Serrano, J., Reyes, O., Gómez, D., Gómez, R., Acevedo, B., Alonso, D. y Perea, S. 2008. Systemic administration of a peptide that impairs the Protein Kinase (CK2) phosphorylation reduces solid tumor growth in mice. International Journal of Cancer, 122:57-62.

Perrett, R. y McArdle, C. 2013. Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone signaling: integrating cyclic nucleotides into the network. Frontiers in Endocrinology. Pituitary Endocrinology, 4/180.

Peschel, A. y Sahl, H. 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. Nature Reviews, Microbiology, 4:529-536.

Phillis, J. y Kirkpatrick, J. 1980. The actions of motilin, luteinizing hormone releasing hormone, cholecystokinin, somatostatin, vasoactive intestinal peptide,

and other peptides on rat cerebral cortical neuron. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 58: 612-623.

Phoenix, D., Dennison, S. and Harris, F. 2013. Antimicrobial Peptides, First Edition.

Pränting, M., Lööv, C., Burman, R., Göransson, U. y Andersson, D. 2010. The cyclotide cycloviolacin O2 from Viola odorata has potent bactericidal activity against Gram-negative bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65:1964-1971.

Purrello, S., Daum, R., Edwards, G., Lina, G., Lindsay, J., Peters, G. y Stefani, S. 2014. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) update: New insights into bacterial adaptation and therapeutic targets. Journal of Global Antimicrobial Resistance, en prensa.

Rabilloud, T. 2002. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. Proteomics, 2:3-10.

Ramamoorthy, A., Thennarasu, S., Tan, A., Lee, D., Clayberger, C. y Krensky, A. 2006. Cell selectivity correlates with membrane-specific interactions: A case study on the antimicrobial peptide G15 derived from granulysin. Biochimica et Biophysica Acta, 1758:154-163.

Reinwarth, M., Nasu, D., Kolmar, H. y Avrutina, O. 2012. Chemical Synthesis, Backbone Cyclization and Oxidative Folding of Cystine-knot Peptides — Promising Scaffolds for Applications in Drug Design. Molecules, 17:12533-12552.

Ripoll, G., Iannucci, N., Giron, S., Cascone, O., Gomez, D. y Alonso, D. 2008. Angiostatic activity of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin and novel peptide analogs in breast cáncer cells. Proceedings of the American Association for Cancer Research, 49:295.

Robertson, G., Shelton, R. y Athar, S. 1976. The osmoregulation of vasopressin. Kidney International, 10:25-37.

Robinson, N. y Robinson, A. 2001. Deamidation of human proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98:12409-12413.

Rodríguez-Ulloa, A., Ramos, Y., Gil, J., Perera, Y., Castellanos-Serra, L., García, Y., Betancourt, L., Besada, V., González, L., Fernández-de-Cossio, J., Sanchez, A., Serrano, J., Farina, H., Alonso, D., Acevedo, B., Padrón, G., Musacchio, A. y Perea, S. 2010. Proteomic Profile Regulated by the Anticancer Peptide CIGB-300 in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cells. Journal of Proteome Research, 9:5473-5483.

Roger, B., Moisand, A., Amalric, F. y Bouvet, P. 2003. Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and pre-ribosome assembly. Chromosoma, 111:399-407.

Rosca, E., Koskimaki, J., Rivera C., Pandey, N., Tamiz, A. y Popel, A. 2011. Anti-angiogenic peptides for cancer therapeutics. Current Pharmaceutical Biotechnology, 12:1101-1116.

Ruiz-Rodríguez, J., Albericio, F. y Lavilla, R. 2010. Postsynthetic Modification of Peptides: Chemoselective C-Arylation of Tryptophan Residues. Chemistry, A European Journal, 16:1124-1127.

Saether, O., Craik, D., Campbell, I., Sletten, K., Juul, J. y Norman, D. 1995. Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. Biochemistry; 34:4147-4158.

Sagou, K., Uema, M. y Kawaguchi, Y. 2010. Nucleolin Is Required for Efficient Nuclear Egress of Herpes Simplex Virus Type 1 Nucleocapsids. Journal of Virology, 84:2110-2121.

Saltz, L., Trochanowski, B., Buckley, M., Heffernan, B., Niedzwiecki, D., Tao, Y. y Kelsen, D. 1993. Octreotide as an antineoplastic agent in the treatment of functional and nonfunctional neuroendocrine tumors. Cancer, 72:244-8.

Salvi, M., Sarno, S., Cesaro, L., Nakamura, H. y Pinna, L. 2009. Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis. Biochimica et Biophysica Acta, 1793:847-859.

Sarno, S y Pinna, L. 2008. Protein kinase CK2 as a druggable target. Molecular BioSystems, 4:889-894.

Sava, G., Benetti, A., Ceschia, V. y Pacor, S. 1989. Lysozyme and cancer: role of exogenous lysozyme as anticancer agent (review). Anticancer Research, 9:583-591.

Sava, G., Ceschia, V. y Zabucchi, G. 1988. Evidence for Host-mediated Antitumor Effects of Lysozyme in Mice Bearing the MCa Mammary Carcinoma. European Journal of Cancer and Clinical Oncology, 24:1737-1743.

Schally, A., Comaru-Schally, A., Plonowski, A., Nagy, A., Halmos, G. y Rekasi, Z. 2000. Peptide Analogs in the Therapy of Prostate Cancer. The Prostate, 45:158-166.

Schally, A. y Nagy, A. 2004. Chemotherapy targeted to cancers through tumoral hormone receptors. Trends in Endocrinology and Metabolism, 15:300-310.

Schibli, D., Epand, R., Vogel, H. y Epand, R. 2002. Tryptophan-rich antimicrobial peptides: comparative properties and membrane interactions. Biochemistry and Cell Biology, 80:667-677.

Schneider, H., Reichert, G. y Issinger, O. 1986. Enhanced casein kinase II activity during mouse embryogenesis. Identification of a 110-kDa phosphoprotein as the major phosphorylation product in mouse embryos and Krebs II mouse ascites tumor cells. European Journal of Biochemistry, 161:733-738.

Schwab, M. y Dreyer, C. 1997. Protein phosphorylation sites regulate the function of the bipartite NLS of nucleolin. European Journal of Cell Biology, 73:287-297.

Schweizer, F. 2009. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. European Journal of Pharmacology, 625:190-194

Schwyzer, R. y Sieber, O. 1963. Total synthesis of adrenocorticotrophic hormone. Nature, 199:172-174.

Sengupta, T., Bandyopadhyay, S., Fernandes, D. y Spicer, E. 2004. Identification of Nucleolin as an AU-rich Element Binding Protein Involved in bcl-2 mRNA Stabilization. The Journal of Biological Chemistry, 279:10855-10863.

Senter, P. y Sievers, E. 2012. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. Nature Biotechnology, 30:631-637.

Shai, Y. 2002. Mode of Action of Membrane Active Antimicrobial Peptides. Biopolymers, 66:236-248.

Shimon, I. y Melmed, S. 1997. Structure and function of somatostatin receptors in growth hormone control. Journal of Endocrinology, 155: S3–S6.

Sok, M., Šentjurc, M. y Schara, M. 1999. Membrane fluidity characteristics of human lung cancer. Cancer Letters, 139:215-220.

Solares, A., Santana, A., Baladrón, I., Valenzuela, C., González, C., Díaz, A., Castillo, D., Ramos, T., Gómez, R., Alonso, D., Herrera, L., Sigman, H., Perea, S., Acevedo, B. y López-Saura, P. 2009. Safety and preliminary efficacy data of a novel Casein Kinase 2 (CK2) peptide inhibitor administered intralesionally at four dose levels in patients with cervical malignancies. BioMed Central Cancer, 9:146.

Soucek, L., Whitfield, J., Sodir, N. y Massó-Vallés, D., Serrano,E., Karnezis, A., Swigart, L. y Evan, G. 2013. Inhibition of Myc family proteins eradicates KRas-driven lung cancer in mice. Genes and Development, 27:504-513.

Spindel, E., Chin, W., Price, J., Rees, L. y Besser, G. y Habener, J. 1984. Cloning and characterization of cDNAs encoding human gastrin-releasing peptide (bombesin/mRNA/neuropeptide). Proceedings of the National Academy of Sciences, 81:5699-5703.

Srivastava, M., Fleming, P., Pollard, H y Burns, A. 1989. Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. Febs Letters, 250:99-105.

Tajrishi, M., Tuteja, R. y Tuteja, N. 2011. The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. Communicative and Integrative Biology, 4:267-275.

Takagi, M., Absalon, M., McLure, K. y Kastan, M. 2005. Regulation of p53 Translation and Induction after DNA Damage by Ribosomal Protein L26 and Nucleolin. Cell, 123:49-63.

Tam, J., Liu, W., Zhang, J., Galantino, M., Bertolero, F., Cristiani, C., Vaghi, F. y De Castiglione, R. 1994. Alanine Scan of Endothelin: Importance of Aromatic Residues. Peptides, 15:703-708.

Tan, A., Russel, F., Thien, T y Benraad, T. 2012. Atrial Natriuretic Peptide. Clinical Pharmacokinetics, 24:28-45.

Tatemoto, K., C., M. y Mutt, V. 1982. Neuropeptide Y—a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. Nature, 296:659-660

Tatemoto, K., Riikaeus, A., Jtirnvall, H., McDonald, Thomas, J. y Mutt, V. 1983. Galanin a novel biologically active peptide from porcine intestine. Febs Letters, 164:124-128.

Tawfic, S., Goueli, S., Olson, M., Ahmed, K. 1994. Androgenic regulation of phosphorylation and stability of nucleolar protein nucleolin in rat ventral prostate. Prostate, 24:101-106.

Tawfic, S., Yu, S., Wang, H., Faust, R., Davis, A. y Ahmed, K. 2001. Protein kinase CK2 signal in neoplasia. Histology and Histopathology Cellular and Molecular Biology, 16:573-582.

Terraube, V., Pendum, R., Baruch, D., Gebbink, M., Meyer, D., Lenting, P. y Denis, C. 2006. Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factor-deficient mice. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 4:517-528.

Thundimadathil, J. 2012. Cancer Treatment Using Peptides: Current Therapies and Future Prospects. Journal of Amino Acids, 2012:1-13.

Thundimadathil, J. 2013. Challenges in the large scale production of peptides. Speciality Chemicals Magazine, pp 26-28.

Tu, A., Lee, J., Deb, K. y Hruby, V. 1979. Laser Raman Spectroscopy and Circular Dichroism Studies of the Peptide Hormones Mesotocin, Vasotocin, Lysine Vasopressin, and Argnine Vasopressin. The Journal of Biological Chemistry, 254:3272-3278.

Uematsu, N y Matsuzaki, K. 2000. Polar Angle as a Determinant of Amphipathic a-Helix-Lipid Interactions: A Model Peptide Study. Biophysical Journal, 79:2075-2083.

Van Epps, H. 2006. Rene Dubos: unearthing antibiotics. The Journal of Experimental Medicine, 203:259-259.

Vávra, I., Machová, A., Holecek, V., Cort, J., Zaoral, M. y Sorm, F. 1968. Effect of a synthetic analogue of vasopressin in animals and in patients with diabetes insipidus. The Lancet, pp 948-952.

Vázquez, A., Hernández, A., Macías, A., Montero, E., Gómez, D., Alonso, D., Gabri, M. y Gómez, R. 2012. Racotumomab: an anti-idiotype vaccine related to N-glycolyl-containing gangliosides–preclinical and clinical data. Frontiers in Oncology|Tumor Immunity, 2/150.

Venkatarama Rao, S., Mamrack, M. y Olson, M. 1982. Localization of Phosphorylated Highly Acidic Regions in the NH2-terminal Half of Nucleolar Protein C23. The Journal of Biological Chemistry, 257:15035-15041.

Verlander, M. 2007. Industrial Applications of Solid-Phase Peptide Synthesis - A Status Report. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 13:75-82.

Vita, M. y Henriksson, M. 2006. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. Seminars in Cancer Biology, 16:318-330.

Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez J. y Khrestchatisky, M. 2010. Synthetic therapeutic peptides: science and market. Drug Discovery Today, 15:40-56.

Wellings, D. y Atherton, E. 1997. Standard Fmoc Protocols. Methods in Enzymology, 289:44-67.

Wu, D., Zhang, P., Liu, R., Sang, Y., Zhou, C., Xu, G., Yang, J., Tong, A. y Wang, C. 2014. Phosphorylation and changes in the distribution of nucleolin promote tumor

metastasis via the PI3K/Akt pathway in colorectal carcinoma. Febs Letters 588:1921-1929.

Xu, Z., Fa-xing, W., Mil, S., Qing-yinz, W., Yue-jun, W. y Xiang-kez, Y. 2008. Study on Antimicrobial and Antiviral Activities of Lysozyme From Marine Strain S-12-86 In Vitro. Agricultural Sciences in China, 7:112-116.

Yoon, W., Park, H., Lim, K. y Hwang, B. 1996. Effect of O-Glycosylated Mucin on Invasion and Metastasis of HM7 Human Colon Cancer Cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 222:694-699.

Zaoral, M., Kolc, J. y Sorm, F. 1967. Synthesis of D-Arg8- and D-Lys8-Vasopressin. Collection Czechoslov. Chemical Communications, 32:1242-1249.

Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature, 415:389-395.

Páginas web consultadas:

http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/the-history-of-cancer-what-is-cancer#top.