



CIENCIAS BIOMÉDICAS

Artículo original de investigación

Aportes al conocimiento de la relación estructura-función en la actividad antitumoral del péptido CIGB-552

Julio R. Fernández Massó ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-0858-8465>

Mariela Bollati-Fogolín ² <https://orcid.org/0000-0001-6829-3135>

Soledad Astrada ² <https://orcid.org/0000-0002-0725-7883>

Hellen Daghero ² <https://orcid.org/0000-0001-6549-3000>

Brizaida Oliva Argüelles ¹ <https://orcid.org/0000-0003-4422-675X>

Gisela García Pérez ¹ <https://orcid.org/0000-0002-4060-404X>

Ania Cabrales Rico ¹ <https://orcid.org/0000-0002-9868-1830>

Maidel Carpio Alvarez ¹ <https://orcid.org/0000-0002-4718-050X>

Nivaldo A. Gómez Hernández ¹ <https://orcid.org/0000-0002-9999-9058>

Hilda Garay Pérez ¹ <https://orcid.org/0000-0003-3101-255X>

Daniel Palenzuela Gardón ¹ <https://orcid.org/0000-0001-9631-8336>

Mario Riera Romo ¹ <https://orcid.org/0000-0002-5384-5897>

Maribel Guerra Vallespí ¹ <https://orcid.org/0000-0002-4043-2364>

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, BioCubaFarma. La Habana, Cuba

² Instituto Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay

*Autor para la correspondencia: julio.fernandez@cigb.edu.cu

RESUMEN

Editor

Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Traductor

Darwin A. Arduengo García
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Introducción: El CIGB-552 es un péptido sintético que ha demostrado ser eficaz para reducir el tamaño del tumor en modelos animales. La actividad antitumoral del péptido se debe a su capacidad de penetración celular y unión a la proteína COMMD1. Esta proteína modula las vías de señalización de los factores de transcripción NF- κ B y HIF-1, que son importantes para la supervivencia de los tumores. La optimización química de un péptido terapéutico se basa en estudios de relación estructura-función. **Objetivo:** Profundizar en la relación de la estructura del CIGB-552 con las propiedades antitumorales. **Métodos:** La unión a la proteína COMMD1 se evaluó mediante **test** ELISA de competencia y resonancia de plasmones superficiales. Los ensayos de internalización se realizaron mediante microscopía confocal y citometría. La capacidad inhibitoria de NF- κ B y HIF-1 dependiente de COMMD1 se evaluó en líneas celulares de inactivación genómica para COMMD1 y sus parentales. **Resultados:** Los metabolitos del CIGB-552 no se unen a COMMD1, tienen menor capacidad de penetración y no activan la apoptosis. Tanto el mecanismo de endocitosis como la transducción están involucrados en la internalización del CIGB-552 en las 3 líneas celulares evaluadas. Se confirma que las propiedades antiinflamatorias y antiangiogénicas del péptido CIGB-552 son mediadas a través de COMMD1 y no están presentes en el péptido CIGB-550. **Conclusiones:** El péptido CIGB-552 contiene la secuencia de aminoácidos mínima y necesaria que le conceden las propiedades de penetración celular, unión a su blanco específico y propiedades proapoptóticas, antiinflamatorias y antiangiogénicas que lo convierten en un péptido con propiedades anticancerígenas novedosas.

Contributions to the knowledge of the structure-function relationship in the antitumor activity of the CIGB-552 peptide

ABSTRACT

Introduction: CIGB-552 is a synthetic peptide that proved to be effective in reducing tumor size in animal models. The antitumor activity of the peptide is due to its cell penetration capacity and binding to the COMMD1 protein. This protein modulates the signaling pathways of the transcription factors NF-kB and HIF-1, that are important for tumor survival. The chemical optimization of a therapeutic peptide is based on structure-function relationship studies. **Objective:** To deepen the relationship of the structure of CIGB-552 with the antitumor properties. **Methods:** It was evaluated the binding to the protein COMMD1 by test ELISA and surface plasmon resonance. They were performed internalization assays by confocal microscopy and cytometry. The inhibitory capacity of NF-kB and HIF-1 dependent on COMMD1 was evaluated in cell lines with genomic inactivation for COMMD1 and their parents. **Results:** CIGB-552 metabolites do not bind to COMMD1, have a lower penetration capacity and do not activate apoptosis. Both the endocytosis and transduction mechanisms are involved in the internalization of CIGB-552 in the 3 cell lines evaluated. It is confirmed that the anti-inflammatory and anti-angiogenic properties of the CIGB-552 peptide are mediated through COMMD1 and are not present in the CIGB-550 peptide. **Conclusions:** The CIGB-552 peptide contains the minimum and necessary amino acid sequence that grants it the properties of cell penetration, binding to its specific target, proapoptotic, anti-inflammatory and anti-angiogenic that make it a peptide with novel anticancer properties.

Keywords: cell penetration peptide; CIGB-552; metabolites; COMMD1; NF-kB

INTRODUCCIÓN

Los péptidos de penetración celular (CPP, del inglés cell penetration peptides) se definen como pequeñas moléculas que son principalmente catiónicas, con un rango de 5 a 30 aminoácidos, capaces de penetrar las células con o sin la mediación de un receptor. ⁽¹⁾ En particular, ya se ha informado que los péptidos antimicrobianos (AMP, del inglés anti-microbial peptides) promueven efectos antitumorales, dada su capacidad para identificar células malignas. ⁽²⁾ Dicho reconocimiento se basa en interacciones electrostáticas favorecidas por el aumento de componentes cargados negativamente en la superficie externa de las células malignas. ⁽³⁾

La estrategia de optimización química de un péptido terapéutico se basa en estudios de relación estructura-función de derivados peptídicos con el objetivo de mejorar la biodisponibilidad, reducir la eliminación y la biodegradación, y aumentar la selectividad o afinidad por su receptor o diana. ⁽⁴⁾ El CIGB-552 es un péptido optimizado derivado del péptido CIGB-550 que se corresponde con la secuencia de aminoácidos de la región 32-

51 de la proteína LALF del cangrejo cacerola (*Limulus polyphemus*). Es un ejemplo de un péptido sintético derivado de AMP con capacidad de penetración celular y de producir un efecto citotóxico al aumentar los niveles de apoptosis de las células malignas. ^(5,6,7) Promueve específicamente la estabilización de la proteína COMMD1, una proteína relacionada en la homeostasis del cobre, el transporte de sodio y las vías de señalización de NF-kB y HIF-1. ^(8,9,10) Los estudios de silenciamiento de COMMD1, mediante shRNAi, demostraron que su expresión era necesaria para producir efectos proapoptóticos en la línea celular derivada del carcinoma de pulmón NCI-H460. ⁽⁶⁾

Cuando se expone al suero de ratones BALB/c, el CIGB-552 muestra un patrón típico de degradación de serina proteasa del que se derivan varios metabolitos. De estos metabolitos (3), el 17aa, 14aa y 10aa, son el metabolito de cuya primera caracterización mostró una disminución en su capacidad de penetración celular en las líneas celulares tumorales NCI-H460 y HT-29 en comparación con CIGB-552. ⁽⁷⁾ Sin embargo, no se caracterizaron completamente las propiedades de estos metabolitos, lo

cual es de importancia para el conocimiento de su contribución a la actividad del péptido CIGB-552.

Los mecanismos de internalización utilizados por los CPP se han estudiado ampliamente en una variedad de líneas celulares. Se han implicado 2 mecanismos diferentes para la internalización de los CPP: endocitosis y transducción directa a través de la membrana. ^(11,12,13,14) No se contaba con datos del CIGB-552 sobre su capacidad de penetración celular, los mecanismos involucrados y su relación con la sensibilidad en líneas celulares tumorales de orígenes diferentes, por lo que su estudio fue de interés.

Por ello, teniendo en cuenta los planteamientos anteriores, en este trabajo se compara las propiedades fisicoquímicas, los efectos proapoptóticos, la capacidad de unión a COMMD1 y los mecanismos de internalización del péptido CIGB-552 y sus metabolitos principales. Por otra parte, no se habían estudiado comparativamente la capacidad de inhibir las vías de señalización de NF- κ B y HIF-1 del CIGB-552 y su péptido parental CIGB-550 así como la relación con la expresión de COMMD1, lo cual resulta relevante para comprender la relación estructura-función de ambos péptidos. Con este trabajo se demostró que el péptido CIGB-552 contiene la secuencia de aminoácidos mínima y necesaria que le conceden las propiedades de penetración celular, unión a su blanco específico, y propiedades proapoptóticas, antiinflamatorias y antiangiogénicas que lo convierten en un péptido con propiedades anticancerígenas novedosas. El objetivo del trabajo es profundizar en la relación de la estructura aminoacídica del péptido CIGB-552 con sus propiedades antitumorales que nos permitan en un futuro realizar diseños optimizados del péptido con una mayor actividad biológica.

MÉTODOS

El presente trabajo es un estudio explicativo que profundiza en la relación estructura función del péptido CIGB-552 y sus propiedades biológicas. El estudio fue realizado como parte de una colaboración entre el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, de La Habana, Cuba y el Instituto Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay. Los estudios se realizaron entre los años 2015 y 2020.

Reactivos y químicos

A menos que se indique, los productos químicos utilizados se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Los medios de cultivo, el suero fetal bovino (FBS) y los consumibles para el cultivo celular se obtuvieron de Life Technologies (Carlsbad, CA, EE. UU.), GE Healthcare y Greiner. Todos los reactivos para la síntesis de péptidos fueron de grado de

síntesis. Los reactivos para la cromatografía eran de grado de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Líneas celulares y medios de cultivo

Las células MCF-7 (ATCC, HTB-22) se cultivaron en DMEM suplementado con Glutamax y FBS al 10 % (v/v). Las células HT-29 (ATCC, HT-38), H460 (ATCC, HTB-177), H460-NF- κ B-hrGFP 2G6, y HT-29-NF- κ B-hrGFP E5 se cultivaron en RPMI suplementado con Glutamax y FBS al 10 % (v/v). ⁽¹⁵⁾ Las células se propagaron de forma rutinaria en frascos de cultivo de tejidos de 25 cm² o 75 cm² a 37 °C, 5 % de CO₂ en una incubadora humidificada hasta alcanzar aproximadamente un 70 % de confluencia. Las células se tripsinizaron, se ajustó la concentración y se sembraron de acuerdo a las diferentes condiciones experimentales.

Síntesis de péptidos

El péptido CIGB-550, CIGB-552 y sus metabolitos análogos se sintetizaron en fase sólida y se purificaron mediante HPLC de fase inversa hasta una pureza mayor que 95 % y se confirmaron mediante espectrometría de masas por pulverización de iones (Micromass, Manchester, Reino Unido). El fluoróforo de carboxifluoresceína se unió selectivamente mediante un enlace amida al extremo N de las secuencias peptídicas durante la síntesis. ^(16,17,18)

ELISA competitivo

Se recubrieron placas de poliestireno (Costar, EE.UU.) con proteína recombinante COMMD1 (10 μ g/mL) en tampón de recubrimiento (NaCO₃/NaHCO₃ pH = 9,6) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Todos los lavados se realizaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X 0,1 % Tween-20. Las placas se bloquearon con leche al 1 % (p/v) en PBS 1X 2 h a 37 °C y luego se lavaron 4 veces. Las curvas de concentración de los metabolitos se prepararon realizando diluciones seriadas (1:2) en un rango de 10 μ M a 0,005 μ M y se agregaron a las placas ELISA recubiertas con COMMD1 recombinante junto con el CIGB-552 biotinilado a 0,021 μ M. Las placas se incubaron 1 h a 37 °C y se lavaron 5 veces. Se usó anticuerpo antibiotina-peroxidasa (Sigma A4541), a una dilución de 1:5000, para detectar el CIGB-552 biotinilado unido a COMMD1. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de microplacas (SUMA).

Procedimiento experimental de resonancia de plasmón superficial

La interacción entre la proteína de fusión His6-COMMD1 y los péptidos fue monitoreada por SPR usando un BIACORE X (GE Healthcare) a 25 °C en un modo multiciclo. La proteína His6-COMMD1 se inmovilizó en un chip biosensor NTA (GE

Health care). La respuesta en tiempo real se registró por duplicado en un rango de concentración de 15 nM a 2000 nM, a un caudal de 10 μ L/min durante 120 s, mientras que la disociación se produjo durante otros 120 s. El tampón de ejecución fue PBS (pH = 7,2). Después de cada ciclo, el chip se regeneró utilizando un tampón de glicina de pH = 2,0. La constante de disociación de equilibrio (afinidad de unión, KD) se estimó con el *software* BIAe Evaluation® (GE Healthcare) utilizando el modelo de interacción Langmuir 1:1. Se tomaron en cuenta al menos 5 curvas para los cálculos de cinética.

Ensayo de internalización y localización mediante microscopía confocal

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos (1 x 105 células/pocillo) y se cultivaron en DMEM o RPMI suplementado con Glutamax, FBS al 10 % (v/v), a 37 °C durante 24 h. Para aquellas muestras en las que se analizó la internalización mediante microscopía, se colocaron cubreobjetos redondos en los pocillos antes de la siembra celular. Para la tinción del endosoma temprano, se usó CellLight® Early Endosomes-RFP BacMam 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) a una concentración de 20 partículas por célula y se incubó durante la noche. Posteriormente, se añadió FITC-CIGB-552 a las células hasta una concentración final de 5 μ M o 50 μ M y se incubó durante 1 h a 4 °C o 37 °C. Todas las imágenes se tomaron con el microscopio confocal láser Leica TCS SP5 equipado con un objetivo de inmersión en aceite 63X NA 1.42 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). En la evaluación de la intensidad de la fluorescencia tanto en el citoplasma como en los núcleos, se tomaron imágenes en condiciones idénticas (potencia del láser, voltaje del fotomultiplicador, promedio de línea y cuadro y zoom) para todas las líneas celulares y se usaron 10 secciones ópticas individuales en el análisis. Para los ensayos de microscopía, las células se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4 % (p/v) durante 15 min, se permeabilizaron con una solución de Tween (20 % al 0,2 %) v/v en PBS, los núcleos se tiñeron con TOPRO-3 (1 μ M, Life Technologies) y el marcador de membrana CellMask™ (1:2000, Life Technologies). Para la inmunodetección de COMMD1 se añadió el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-COMMD1 (1:550, H00150684-M01, Abnova, Taipei, Taiwán) y se incubó durante la noche a 4 °C. Se realizaron 3 pasos de lavado usando 0,2 % (v/v) Solución de Tween 20 en solución de PBS, se agregó anticuerpo secundario Goatanti-Mouse IgG (H+L), Alexa 488 conjugado (Life Technologies) diluido 1:1000 en BSA-PBS y se incubó por 1:30 h, finalmente los núcleos se tiñeron con Hoescht 33342.

Ensayo de internalización mediante citometría de flujo

Para la lectura de citometría de flujo se eliminó el medio de cultivo, las células se lavaron con solución salina tamporada con fosfato (PBS) y el péptido FITC unido a la superficie se inactivó con una solución de azul tripán al 0,4 % (p/v). Las células se tripsinizaron y las muestras se adquirieron usando un citómetro de flujo Cyan ADP equipado con un láser de 488 nm y un filtro de emisión FL1 (530/40 nm). Para la adquisición y el análisis de datos se utilizaron los *softwares* Summit v4.3 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.) y FlowJo v.7.6.5 (BD, Ashland, OR, EE.UU.).

Eliminación de COMMD1 en células H460 mediante CRISPR-Cas9

El sistema de inactivación genómica (KO, *del inglés knock-out*) CRISPR COMMD1 se adquirió de OriGene (Rockville, MD, EE. UU.), que contiene 2 plásmidos pCas9 (secuencia objetivo de gRNA1 CGCATTCAGCAGCCCGCTCA y gRNA2 CGGGTACCCCGGCATCACAG, respectivamente), un plásmido pCas9 con una secuencia codificada como control y un ADN donante de reparación plásmido que contiene brazos homólogos izquierdo y derecho de COMMD1 y cassette funcional GFP-puro. Las células H460 se cotransfectaron con Turbofectin (OriGene, Rockville, MD, EE.UU.). Después de 72 h, el medio de transfección se reemplazó con 1 μ g/mL de medio que contenía puromicina para la selección de células transfectadas de forma estable.

El método de dilución de matriz se utilizó después de 6 días de selección para obtener clones de células individuales para la caracterización genotípica y fenotípica. Se analizaron al menos 20 clones de 2 experimentos de transfecciones independientes. Para el análisis de genotipado, se obtuvo ADN de clones individuales utilizando los Mini Kits QIAamp de QIAGEN (Germantown, MD, EE.UU.). Se utilizó la mezcla maestra de Promega (Madison, WI, EE. UU.) para las reacciones de PCR. Se realizó la secuenciación del ADN de los clones seleccionados utilizando los cebadores CF (TAAGCTGCCAACTCTGACCCC) y CR (AAGCCTTTCGGCTTGTGAGGA) utilizando el método de Sanger. De los clones que se confirmaron que eran KO, se seleccionaron 2 para la caracterización fenotípica mediante transferencia Western como se describió anteriormente. ⁽⁶⁾

Estudios de activación de HIF-1 y NF- κ B en células WT y COMMD1-KO H460

Las líneas celulares NCI-H460 parental (WT) y NCI-H460 KO para COMMD1 se sembraron en placas de 24 pocillos múltiples y se cultivaron durante 24 h. La transfección transitoria se realizó con plásmidos pNF- κ B-luc o pEPO-luc utilizando

Lipofectamine2000 (Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A las 5 h después de la transfección y para la actividad transcripcional de HIF-1, las células se preincubaron con CIGB-552 antes de agregar el agente hipoxia-mimético (Deferoxamina, 150 μ M), mientras que para las células transfectadas con pNF- κ B-luc, se añadieron simultáneamente los péptidos y el estímulo proinflamatorio (TNF- α , 30 ng/mL). Después de 24 h, las células se lisaron y la actividad de la luciferasa se midió en un luminómetro (Lumistar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) y se normalizó de acuerdo con el contenido de proteína total determinado por el método del ácido bicinonínico utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media desviación estándar de triplicados de un experimento representativo, se ejecutaron 3 experimentos independientes. Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el *software* Statistica (STATSOFT, Hamburgo, Alemania).

RESULTADOS

Propiedades físicoquímicas de los péptidos y sus metabolitos

Los metabolitos son producto de deleciones de aminoácidos consecutivos en los extremos N y C terminal del péptido CIGB-552 debido a las proteasas séricas. Las secuencias de los péptidos estudiados junto a las principales características físicoquímicas de los mismos se describen por Astrada y col. ⁽¹⁶⁾ Los péptidos muestran puntos isoeléctricos e hidropaticidad muy semejantes. La carga neta de los péptidos CIGB-550 y CIGB-552 es similar, mientras que disminuye en los metabolitos como consecuencia de la disminución del número de aminoácidos cargados positivamente.

Afinidad de los principales metabolitos del péptido CIGB-552 por COMMD1 *in vitro*

Los metabolitos de un fármaco pueden tener importantes consecuencias sobre su efecto terapéutico o sobre su toxicidad. Hasta el momento no se había estudiado la capacidad de los principales metabolitos derivados del CIGB-552 para interactuar con la proteína blanco COMMD1. Por lo tanto, evaluamos la capacidad de los metabolitos para unirse a COMMD1 a través de un ensayo de ELISA competitivo y de la resonancia de plasmón superficial. En este ensayo además se evaluó la capacidad de unión del péptido CIGB-550 teniendo en cuenta que es el péptido original no optimizado. En el ensayo de ELI-

SA competitivo los resultados representan el desplazamiento de la unión de CIGB-552 biotinilado-COMMD1 producido por una concentración específica de péptido. Tanto el CIGB-550, el CIGB-552 y el metabolito de 17aa compiten con el CIGB-552 biotinilado para unirse a COMMD1, siendo el péptido de mayor afinidad el CIGB-550. Por otro lado, no se observó competencia por los productos de la degradación de 14aa y 10aa, lo que indica una afinidad disminuida de estos metabolitos por COMMD1. También se calcularon las concentraciones de competidor requeridas para la inhibición de la mitad de la unión específica (CC50). En el ensayo de resonancia de plasmón superficial las constantes de disociación obtenidas son consistentes con los resultados del ELISA competitivo excepto para el péptido de 17aa donde no se puede calcular la constante de disociación indicando la ausencia de unión específica en este ensayo (tabla 1).

Capacidad de penetración celular y de inducción de apoptosis de los principales metabolitos del péptido CIGB-552

Para cuantificar la capacidad de penetración celular del CIGB-552 y sus metabolitos derivados, se realizaron ensayos de citometría de flujo incubando células MCF-7 con péptidos conjugados con FITC. Los valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) correspondientes a los metabolitos 14aa y 10aa mostraron diferencias significativas entre CIGB-552 y el metabolito 17aa (figura 1A). El efecto citotóxico y la capacidad proapoptótica de los principales metabolitos derivados del CIGB-552 se evaluaron mediante el uso del ensayo SRB. Para este ensayo los metabolitos se sintetizaron conservando los D aminoácidos presentes en el péptido CIGB-552 y fueron además acetilados en el extremo N-terminal para mantener las propiedades de una menor degradación proteolítica. Las curvas de dosis-respuesta de inhibición obtenidas en estos ensayos mostraron una capacidad reducida de los metabolitos para inhibir la proliferación celular (figura 1B).

Para evaluar la apoptosis se utilizaron los métodos de tinción con anexina V y activación de caspasa. La caspasa 3 está ausente en la línea celular MCF-7 debido a una eliminación funcional del gen de la CASP-3, por lo que se evaluó la activación de caspasa 7. ⁽¹⁹⁾ No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con los metabolitos y las células de control ni en el ensayo de activación de caspasa 7 ni en la tinción con anexina V, lo que demuestra que en estas condiciones los metabolitos no pudieron provocar un efecto proapoptótico en la línea celular MCF-7 (figura 1B y 1C). El CIGB-552 confirmó su capacidad para inducir la apoptosis como se ha informado previamente para otras líneas celulares tumorales. ⁽⁶⁾

Tabla 1. Afinidad de los péptidos por COMMD1 determinada mediante Elisa de competencia y resonancia de plasmón superficial (SPR)

Péptido	Secuencia	Elisa de Competencia		SPR
		CC50 (μM)	R ²	Kd
CIGB-550	HYRIKPTFRRLKWYKGF	0,107 \pm 0,025	0,98	2 x 10 ⁻¹²
CIGB-552	Ac-HARIKPTFRRLKWYKGF	0,4 \pm 0,046	0,99	9,97 x 10 ⁻¹¹
17aa	Ac-IKPTFRRLKWYKGF	1,4 \pm 0,26	0,98	NA
14aa	Ac-IKPTFRRLKWYK	NA	NA	NA
10aa	Ac-IKPTFRRLKW	NA	NA	NA

Nota: CC50 (μM): concentración del competidor requerida para desplazar la mitad de la unión específica; R²: coeficiente de regresión al cuadrado; Kd: constante de disociación; NA: no afinidad

Capacidad de penetración celular y mecanismos de internalización del CIGB-552

Los patrones de internalización de 3 líneas celulares que difieren en su origen y que presentan diferentes sensibilidades al tratamiento con el péptido CIGB-552 se evaluaron mediante microscopía confocal y citometría de flujo utilizando el CIGB-552 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). En este trabajo evaluamos la penetrabilidad en las líneas H460 (IC₅₀ = 23 \pm 82 μM) que tiene una alta sensibilidad al CIGB-552, la línea HT-29 (IC₅₀ = 42 \pm 3 μM) de sensibilidad media y la línea celular MCF-7 (IC₅₀ = 379,1 \pm 8,6 μM) con baja sensibilidad al péptido. Observamos que el CIGB-552 es capaz de penetrar en las 3 líneas celulares ensayadas mostrando 2 patrones de internalización diferentes, células completamente cargadas y un patrón puntuado, lo que demuestra la ocurrencia de diferentes mecanismos de internalización.

Para evaluar cuantitativamente la capacidad de penetración celular del CIGB-552 se utilizó el método de citometría de flujo. Las células se incubaron con 2 concentraciones de péptidos diferentes, 5 μM y 50 μM , durante 1 hora a 37 °C, y luego se evaluaron los valores de intensidad de fluorescencia media. Aunque se observaron claras diferencias en todas las líneas celulares entre las células tratadas (CIGB-552) y las no tratadas (control), la capacidad de penetración celular difirió entre ellas. La línea celular H460 tuvo los niveles de internalización más altos tanto en concentraciones de 5 μM como de 50 μM , mientras que HT-29 y MCF-7 mostraron niveles menores de internalización.

Mediante la realización de ensayos de internalización a 37 °C y 4 °C se evaluó la contribución de la endocitosis y la transducción en cada línea celular. Teniendo en cuenta que la endocitosis y la transducción pueden ocurrir simultáneamente a 37 °C, asumimos que los valores obtenidos en esta condición representan la cantidad total de internalización del CIGB-552. Por tanto, estimamos la contribución de cada mecanismo en porcentaje al referir los valores obtenidos a 4 °C a los observados a 37 °C. En la línea celular MCF-7, la contribución del mecanismo de transducción es claramente superior, mientras que para HT-29 y H460 la contribución del mecanismo de transducción representa menos del 50 %. En particular, para las células HT-29 y H460 hay una notable reducción en los procesos de transducción a la concentración de 50 μM . Mientras tanto los niveles de transducción en MCF-7 parecen ser independientes de la concentración de péptido utilizada.

Niveles de expresión de COMMD1

Los niveles de expresión de la proteína COMMD1 *in situ* pueden explicar las diferencias de sensibilidad observadas entre las líneas celulares. Los niveles de expresión en las líneas celulares se analizaron tanto en el citoplasma como en el núcleo mediante el uso de la inmunodetección *in situ* de COMMD1. El análisis cuantitativo de la expresión de COMMD1 en el citoplasma mostró que la intensidad de fluorescencia máxima (M x FI) fue más alta en MCF-7, seguida de la línea celular H460, mientras que HT-29 mostró los valores

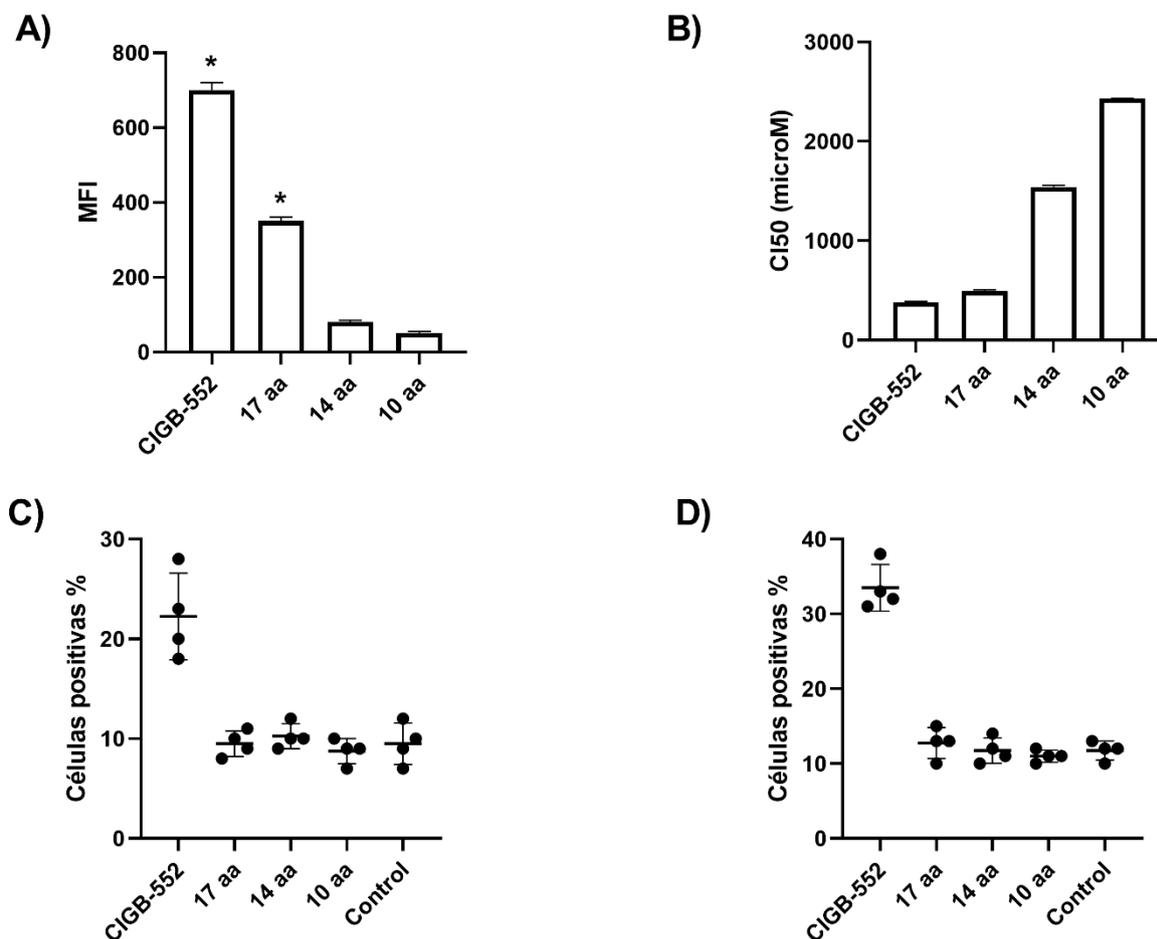


Fig. 1. A) La capacidad de penetración celular de CIGB-552 y sus metabolitos se analizó utilizando péptidos marcados con FITC y se evaluó mediante citometría de flujo. Se muestran los resultados obtenidos de un ensayo representativo. Los valores de MFI obtenidos de los histogramas que se muestran en A confirman los niveles de internalización más altos para CIGB-552 y 17 aa que los observados para los péptidos de 14 aa y 10 aa (* $p < 0,05$ prueba U de Mann-Whitney); B) Citotoxicidad del CIGB-552 y sus metabolitos derivados mediante el ensayo SRB en la línea celular MCF-7; C) La evaluación de la apoptosis mediante el ensayo de actividad de caspasa 7 y B) la tinción de anexina V. El CIGB-552 produce un aumento tanto en la actividad de caspasa 7 como en la tinción de anexina V en comparación con sus metabolitos (* $p < 0,05$ prueba U de Mann-Whitney)

de intensidad más bajos. En general, estos resultados indican que la expresión de COMMD1 es mayor en MCF-7 y H460.

Actividad de NF- κ B en las líneas celulares reporteras HT-29 y H460

La modulación de la respuesta inflamatoria ha sido reportada para los péptidos CIGB-552 y CIGB-550. (20,21,22) Sin embargo, no está bien establecido cómo este efecto puede tener un impacto directo en las propiedades anticancerígenas. Dado que la citotoxicidad del CIGB-552 se ha caracterizado en varias líneas celulares de cáncer, primero decidimos determinar la citotoxicidad del CIGB-550 para las líneas celulares de cáncer de colon y pulmón utilizadas en estos ensayos. (5,6,17) El CIGB-552 mostró un mayor efecto citotóxico en

ambas líneas celulares estudiadas siendo de $23 \mu\text{M} \pm 82 \mu\text{M}$ en H460 μM y $166 \mu\text{M} \pm 66,2 \mu\text{M}$ para HT-29 versus 460 ± 25 (H460) y 549 ± 25 (HT-29) en el caso del péptido CIGB-550.

Para comprender mejor la selección del CIGB-552 como un nuevo péptido anticancerígeno, se evaluó el efecto sobre la transcripción mediada por NF- κ B de ambos péptidos en 2 líneas celulares reporteras derivadas de las células H460 y HT-29. Como se muestra en las figuras 2A y 2B, el CIGB-552 fue capaz de inhibir la respuesta de NF- κ B inducida por TNF- α en ambas líneas celulares. Además, el alcance de esta modulación en cada línea celular confirma la mayor sensibilidad de la línea celular H460 respecto a las células HT-29 al tratamiento con el CIGB-552. Por otro lado, CIGB-550 solo mostró un

ligero efecto sobre la inactivación de NF- κ B en la línea celular HT-29-NF- κ B-hrGFP, pero ninguna actividad sobre H460-NF- κ B-hrGFP, lo que demuestra que en la misma concentración utilizada para el CIGB-552, el péptido parental es menos eficiente en la modulación de la vía de señalización de NF- κ B.

Dado que ambos péptidos tienen propiedades de penetración celular y ninguno de ellos se estudió previamente en sistemas *in vitro* más complejos, se realizó el ensayo en un sistema de cultivo 2D y se comparó con un sistema de cultivo 3D mediante el uso de esferoides para imitar la situación *in vivo*. En el modelo 3D de esferoides solo el CIGB-552 fue capaz de inhibir la actividad NF- κ B inducida por TNF- α y se detectaron diferencias no significativas entre la modulación obtenida usando cultivos 2D y 3D (figura 2B y 2C). Estos resultados destacan la selección precisa y adecuada del CIGB-552 como un nuevo péptido de penetración en células anticancerígenas.

Obtención de líneas celulares H460 deficientes de COMMD1

Para corroborar la relevancia de COMMD1 en el mecanismo de acción de CIGB-552, generamos una línea celular knock-out de COMMD1. Se seleccionó H460 para realizar la desactivación de COMMD1 por CRISPR-Cas9 porque era la línea celular más sensible al efecto del CIGB-552. La ausencia de COMMD1 en los clones generados se evaluó mediante PCR, secuenciación de

ADN y Western Blot. Como se muestra el evento de edición de genomas ocurrió en la región adecuada con la correcta inserción del ADN donante como se demostró por PCR, provocando una delección de 82 pb en el exón 1 de *Commd1* eliminando completamente la expresión de la proteína. Al comparar el efecto citotóxico del CIGB-552 en ambas líneas celulares, las células KO presentaron un valor de IC₅₀ más alto que las células WT.

Efectos del CIGB-552 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B y HIF-1 en las células H460 y H460 COMMD1 KO

Como se mostró anteriormente, parte de los efectos antitumorales del CIGB-552 son promovidos por la inhibición de NF- κ B. Para evaluar la importancia de COMMD1 en este proceso, las líneas celulares H460 WT y COMMD1 KO se transfectaron transitoriamente con un plásmido informador que contenía elementos de respuesta NF- κ B del gen de luciferasa de luciérnaga. A continuación, las células se trataron con diferentes concentraciones del péptido CIGB-552 y TNF- α como inductor de la activación de NF- κ B. Las células se lisaron después de 24 h y se midió la actividad de la luciferasa. En presencia de COMMD1, CIGB-552 fue capaz de inhibir la activación de NF- κ B en todas las concentraciones evaluadas (figura 3A). En la línea celular KO no se encontró modulación de la activación de NF- κ B a las concentraciones del péptido estudiadas.

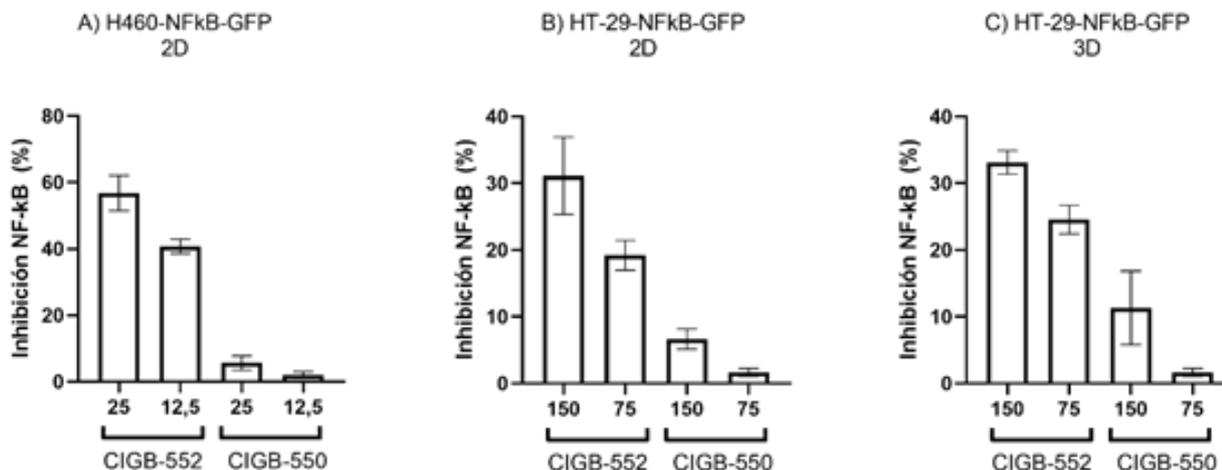


Fig. 2. Evaluación de la activación de NF- κ B inducida por TNF- α en líneas celulares informadoras tratadas con CIGB-552 o CIGB-550. H460-NF- κ B-hrGFP; A) HT-29-NF- κ B-hrGFP; B) se trataron con los péptidos y TNF- α durante 24 h y 48 h, respectivamente; C) evaluación de esferoides HT-29-NF- κ B-hrGFP de transcripción de NF- κ B inducida por TNF- α . Las células se sembraron en superficies adherentes (2D) o no adherentes (3D) y se cultivaron durante 4 días. Las células se trataron con los péptidos y TNF- α durante 24 h. La inhibición de NF- κ B se calculó considerando la expresión de GFP del control estimulado por TNF- α como activación al 100 % y los datos se normalizaron a este control. Datos representados como la SD media de triplicados técnicos de un experimento representativo de 3. Se aplicó el análisis ANOVA de una vía (prueba posterior de Dunnett) para comparar los grupos tratados con la condición de control, * $p < 0,05$

Además de contribuir a la terminación de la respuesta NF- κ B, COMMD1 está implicada en la vía de señalización del factor HIF-1 inducido por hipoxia. HIF-1 también es un factor de transcripción considerado como un objetivo potencial para las terapias contra el cáncer. Mediante el uso de un plásmido informador para evaluar la inhibición de HIF-1 (pHRE-EPO-luc), evaluamos el efecto del CIGB-552 en la ruta de HIF-1 en las líneas celulares WT y COMMD1 KO. Las células se transfectaron transitoriamente con el plásmido informador y se trataron con el péptido 4 h más tarde. Finalmente se añadió un agente mimético de hipoxia (deferoxamina, DFX) para estimular la respuesta mediada por HIF-1. Como se muestra en la figura 3B, solo en presencia de COMMD1 el CIGB-552 logró aumentar la inhibición de HIF-1 inducida por hipoxia de una manera dependiente de la dosis.

DISCUSIÓN

El CIGB-552 es la secuencia activa mínima necesaria para producir los efectos antitumorales

Los péptidos antimicrobianos han surgido como candidatos interesantes porque su estructura anfipática les permite

interactuar directamente con las membranas celulares cargadas negativamente, una característica común que distingue a las células malignas de las no malignas. ^(23,24,25) Estos pequeños péptidos son capaces de afectar eficientemente varias vías celulares sin acumulación de derivados tóxicos. ⁽⁴⁾ En el desarrollo de un agente anticanceroso peptídico, la manipulación de la secuencia de aminoácidos, la carga neta, la estructura secundaria, la capacidad de oligomerización, la anfipaticidad, la hidrofobicidad y la estabilidad del suero son factores clave, así como su capacidad para cruzar la membrana y alcanzar objetivos intracelulares. Los péptidos más cortos pueden no solo implicar una reducción en el costo de producción, sino que también pueden considerarse más eficientes para cruzar la membrana plasmática y ejercer un efecto citotóxico. ^(1,3) Por ejemplo, FK16, un péptido derivado de LL-37, un péptido helicoidal conocido por poseer efectos anticancerígenos sobre el cáncer gástrico y las células leucémicas T, mostró una mayor actividad anticancerígena que el propio péptido completo. ⁽²⁶⁾ Por lo tanto, la identificación de los aminoácidos responsables de la actividad anticancerígena puede facilitar la síntesis, aumentar la eficiencia y el impacto en el costo de

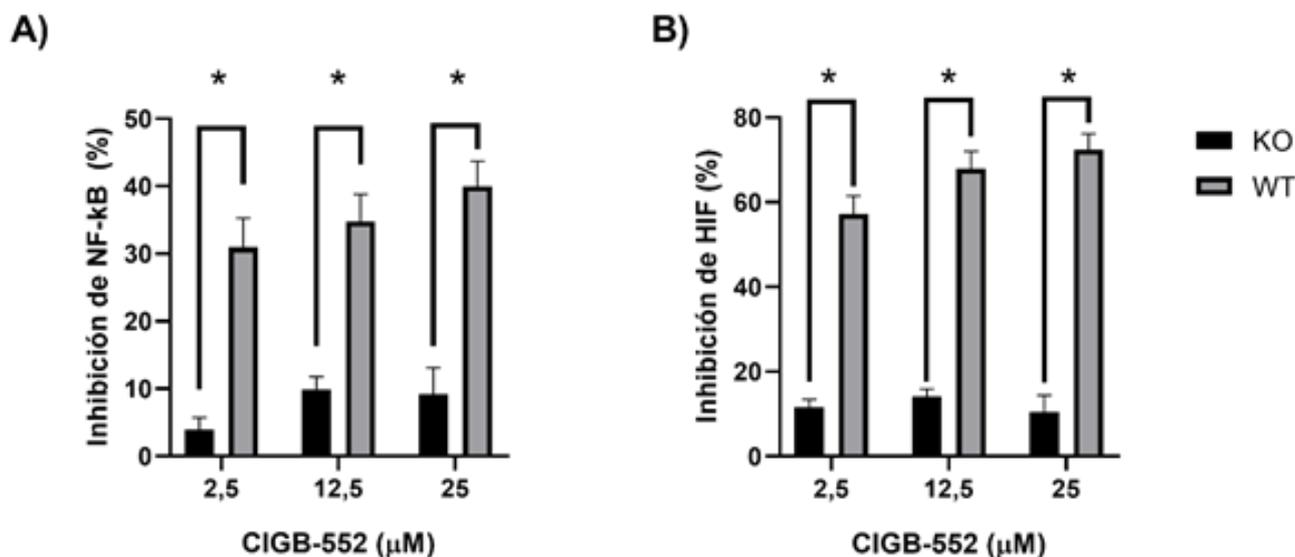


Fig. 3. A) Evaluación de la inhibición de NF- κ B inducida por TNF- α en líneas celulares H460 WT y COMMD1 KO. Las células se transfectaron con un plásmido pNF- κ B-luc y después de 24 h se trataron con 40 ng/mL de TNF- α y diferentes concentraciones de CIGB-552. Después de 24 h se evaluó la actividad de la luciferasa normalizada por contenido de proteína. La inhibición de NF- κ B se calculó considerando el control estimulado por TNF- α como una activación del 100 % y los datos se normalizaron para este control; B) CIGB-552 modula la activación de HIF-1 inducida por DFX solo en células H460 WT. Las células H460 WT y COMMD1 KO se transfectaron con un plásmido pHRE-EPO-luc y se trataron con diferentes concentraciones de CIGB-552 y 150 μ M DFX durante 24 h. La actividad de la luciferasa se evaluó en lisados celulares, normalizados por el contenido de proteínas. La inhibición de HIF-1 se calculó considerando el control estimulado con DFX al 100 % y los datos se normalizaron para este control. Los datos se presentan como la media \pm SD de un experimento representativo de triplicados técnicos. Se aplicó el análisis ANOVA de una vía (prueba posterior de Dunnett) para comparar los grupos tratados con el control DFX, * $p < 0,05$

producción al permitir la síntesis de péptidos más cortos que conservan la actividad biológica completa.

Los metabolitos derivados de CIGB-552, aunque caracterizados preliminarmente en cuanto a su citotoxicidad y capacidad de penetración celular, no se sometieron a una caracterización adecuada para determinar sus similitudes y diferencias con el CIGB-552. ⁽⁷⁾ En primer lugar, se analizaron la probabilidad de penetración celular, las propiedades fisicoquímicas y las predicciones estructurales utilizando un enfoque teórico. Nuestros primeros resultados mostraron que, a pesar de que se encuentran diferencias de secuencia entre el CIGB-552 y sus metabolitos derivados, todos conservan la misma probabilidad de ser considerados péptidos de penetración celular. Solo la carga neta se redujo notablemente en los metabolitos, y esta propiedad juega un papel importante cuando las interacciones péptido-lípido se basan en interacciones electrostáticas. ^(12,14,23,27) A pesar de la reducción de carga, no se encontraron otras diferencias significativas entre el CIGB-552 y los metabolitos (ver tabla 1). ⁽¹⁶⁾

Cuando analizamos sus capacidades citotóxicas, encontramos que los metabolitos presentaban valores IC50 más altos que el CIGB-552. Además, en condiciones en las que el CIGB-552 (300 µM) confirmó sus propiedades proapoptóticas, los metabolitos no lograron provocar la apoptosis en la línea celular MCF-7 (ver figura 1). ⁽¹⁶⁾ Un hallazgo relevante lo constituye la pérdida de afinidad de los metabolitos por el blanco molecular COMMD1, lo que confirma la importancia de esta interacción para la actividad citotóxica del CIGB-552. ⁽¹⁶⁾ Adicionalmente, en los metabolitos principales del CIGB-552 observamos la pérdida de aminoácidos que han sido descritos como importantes en la interacción con la membrana y la capacidad de penetración celular de los CPP: lisina, arginina, y triptófano, lo que explicaría la disminución en su capacidad de internalización. ^(1,11,13)

La sensibilidad hacia el péptido CIGB-552 depende de la interacción entre el mecanismo de internalización y en menor medida, la abundancia de su proteína blanco COMMD1

En este trabajo decidimos caracterizar la capacidad de internalización de diferentes líneas celulares y los mecanismos involucrados para tratar de explicar su sensibilidad al tratamiento con CIGB-552. ⁽¹⁷⁾ Comprender tales propiedades en líneas celulares con antecedentes de tejidos diversos puede ayudar a predecir la eficacia del tratamiento con CIGB-552 en diferentes tipos de tumores.

Los CPP como el CIGB-552 pueden usar 2 mecanismos de internalización diferentes, transducción o endocitosis, que pueden identificarse por el patrón de internalización o por las condiciones requeridas para que ocurra. Ambos difieren no solo en sus requerimientos energéticos y de temperatura sino tam-

bién en sus patrones de internalización celular. La endocitosis muestra un patrón puntuado, mientras que la transducción muestra una distribución homogénea en todo el citoplasma. ^(14,28) Dichos patrones ya se han correlacionado efectivamente con los mecanismos de internalización del CIGB-552. Nuestros resultados muestran que ambos patrones también están presentes en las líneas celulares MCF-7, HT-29 y H460. Adicionalmente, se proporcionó evidencia de endocitosis en las 3 líneas celulares mediante la colocalización parcial del CIGB-552 con un marcador de endosoma temprano, Rab5A. ⁽¹⁷⁾ La capacidad de penetración celular y la contribución de cada mecanismo a la internalización del péptido dependerán no solo de las propiedades fisicoquímicas que le confiere la secuencia de aminoácidos presente en el péptido, sino también de su capacidad para interactuar con los componentes de la membrana celular. ^(29,30)

Para evaluar dicha capacidad y la ocurrencia de cada mecanismo en la internalización de CIGB-552 seleccionamos un enfoque más cuantitativo y funcional que evalúa la incorporación de CIGB-552 conjugado con FITC por citometría de flujo. ⁽¹⁷⁾ Se ha informado que las diferencias en los mecanismos de internalización usados podrían determinarse por la abundancia de péptido en la superficie externa de la célula. A bajas concentraciones se promueve la endocitosis, mientras que altas concentraciones son favorables para que ocurra la transducción, ya que se necesita un umbral de concentración para promover la desestabilización transitoria de la membrana celular. ⁽³¹⁾ Por lo tanto, se seleccionaron 2 concentraciones diferentes (5 µM y 50 µM) para evaluar la incorporación del CIGB-552. La línea celular H460 mostró los niveles de incorporación más altos entre las 3 líneas celulares, teniendo la línea celular MCF-7 los niveles más bajos de incorporación de CIGB-552 en ambas concentraciones probadas. ⁽¹⁷⁾ Además, el aumento de internalización observado según la concentración utilizada mostró un comportamiento lineal en las 3 líneas celulares.

Para evaluar la ocurrencia de endocitosis y transducción como mecanismos de internalización, decidimos realizar ensayos de incorporación a diferentes temperaturas. Se descartó el uso de inhibidores de endocitosis ya que la perturbación de la membrana producida por tales moléculas podría aumentar la internalización a través de la transducción como efecto secundario. ⁽³²⁾ Aunque la internalización se redujo en todas las líneas celulares como consecuencia de la reducción de la temperatura, no se eliminó en ninguna de las concentraciones utilizadas. Las líneas celulares H460 y HT-29 mostraron la mayor sensibilidad a la reducción de temperatura, como se observa por la disminución en la internalización de CIGB-552.

Estimamos la contribución de cada mecanismo de internalización y encontramos que el CIGB-552 es más propenso a utilizar la endocitosis como mecanismo de internalización en

las líneas celulares HT-29 y H460, mientras que la transducción parece ser el mecanismo de internalización preferido en MCF-7. Por lo tanto, demostramos que no solo la capacidad de internalización sino también el mecanismo de internalización seleccionado depende de la línea celular (ver figura 2).

El CIGB-552 interactúa con COMMD1 para provocar sus efectos proapoptóticos. Por lo tanto, al explorar la localización y los niveles de expresión de COMMD1 *in situ* en las 3 líneas celulares, nuestro objetivo fue comprender su susceptibilidad a los efectos de CIGB-552. Recientemente se ha informado que COMMD1 participa en el reclutamiento de proteínas en los compartimentos endosómicos.⁽³³⁾ Teniendo en cuenta que la internalización de CIGB-552 tiene lugar en parte, a través de la vía endocítica, la localización tanto del péptido como de su proteína diana puede mejorar los efectos de CIGB-552, lo que explicaría la sensibilidad de la línea celular. Sin embargo, en este trabajo no se observaron diferencias en los niveles de colocalización de COMMD1 y Rab5A entre las líneas celulares.⁽¹⁷⁾ Por otro lado, se observaron diferencias en los niveles de expresión de la proteína COMMD1. Las líneas celulares MCF-7 y H460 mostraron niveles de expresión más altos tanto en el citoplasma como en el núcleo, mientras que HT-29 tuvo los niveles de expresión más bajos según lo evaluado por la intensidad de fluorescencia de las imágenes de microscopía confocal (ver figura 3). Así, la mayor resistencia de la línea celular HT-29 en comparación con la línea celular H460 no solo se debe a los reducidos niveles de internalización, sino que también es consecuencia de una menor expresión de COMMD1.

Hemos demostrado que tanto los mecanismos de transducción como los de endocitosis están involucrados en la internalización del CIGB-552. Sin embargo, la eficacia de ambos mecanismos es diferente, lo que conduce a una sensibilidad diferente a los efectos proapoptóticos del CIGB-552. La alta resistencia observada en la línea celular MCF-7 pudiera ser consecuencia de la internalización de péptidos a través del mecanismo de transducción. Por otro lado, la endocitosis constituye la forma más eficaz de transportar el péptido CIGB-552 al interior de las células, promoviendo así una mayor sensibilidad a los efectos citotóxicos del péptido. En conjunto, nuestros resultados muestran que la alta sensibilidad hacia el CIGB-552 resulta de la interacción entre el mecanismo de internalización involucrado, que determina la eficacia de la entrada de CIGB-552 y, en menor medida, la abundancia de COMMD1.

Las propiedades antiinflamatorias y antiangiogénicas únicas para el péptido CIGB-552 son mediadas a través de COMMD1

Los primeros estudios mostraron que el CIGB-552 induce la ubiquitinación y la degradación proteasomal de RelA, una

subunidad NF- κ B, en células H460.⁽⁶⁾ Además, el tratamiento con CIGB-552 reguló negativamente la activación de NF- κ B y la producción de IL-8 en células HT-29-NF- κ B-hrGFP.⁽²⁰⁾ Adicionalmente, el péptido parental CIGB-550 es un péptido de penetración celular que ha demostrado modular la expresión génica de citoquinas inducida por LPS *in vivo*.⁽²¹⁾ Sin embargo, hasta el presente informe aún se desconocía si los mecanismos de estos efectos pueden estar relacionados con la actividad de NF- κ B o si es una característica obtenida de la selección de CIGB-552 basada en el cribado de la biblioteca de Alanina. Resulta interesante de que el CIGB-550 tiene una mayor afinidad por COMMD1 que el péptido CIGB-552. Sin embargo, la selección del CIGB-552 como péptido anticancerígeno no se basó en la afinidad por su blanco, sino en el menor valor de IC50 respecto al CIGB-550 en las líneas celulares estudiadas. Es de interés desde el punto de vista de estructura-función conocer como la afinidad por COMMD1 pudiera afectar estas propiedades biológicas.

Por lo tanto, se realizó un ensayo informador para comparar el efecto sobre NF- κ B del CIGB-552 y su péptido parental CIGB-550.⁽¹⁸⁾ Nuestros resultados mostraron que CIGB-552 fue capaz de modular la actividad transcripcional de NF- κ B inducida por TNF- α en ambas líneas celulares. Cabe señalar que la medida en que el CIGB-552 aumentó la inhibición de NF- κ B en ambas líneas celulares fue diferente. En la línea celular H460-NF- κ B-hrGFP se logró una mayor inhibición de la activación de la vía de señalización de NF- κ B lo que se corresponde con los resultados obtenidos en la línea parental H460 donde se observó una mayor internalización de los péptidos. El CIGB-550 por su parte solo tuvo un ligero efecto en las células HT-29-NF- κ B-hrGFP, pero solo en la concentración más alta probada.⁽¹⁸⁾

Recientemente se informó que los esferoides de HT-29 mostraron cambios en la proliferación celular y la capacidad metabólica en comparación con los obtenidos en cultivos 2D.⁽³⁴⁾ Los cultivos de células 3D están bien documentados para preservar las características intrínsecas y para imitar mejor la situación *in vivo* que las monocapas de células cultivadas en plástico. En consecuencia, se reconoce cada vez más el potencial de los modelos de cáncer en 3D como más relevantes desde el punto de vista biológico para el desarrollo de fármacos contra el cáncer. En los esferoides HT-29-NF- κ B-hrGFP el CIGB-552 conservó su capacidad para inhibir la actividad transcripcional de NF- κ B, mientras que el CIGB-550 no tuvo efecto en este modelo 3D, validando al péptido CIGB-552 como un mejor candidato terapéutico.⁽¹⁸⁾ En general, nuestros resultados indican que CIGB-552 supera a su péptido parental CIGB-550 en su actividad citotóxica y antiinflamatoria en las líneas celulares H460 y HT-29.

Con anterioridad se había estudiado el efecto de silenciar la expresión de COMMD1 sobre la actividad proapoptótica del CIGB-552, sin embargo, no se exploró como se afectaban las vías de señalización de los factores de transcripción NF- κ B y HIF-1. ⁽⁶⁾ Por este motivo, con el objetivo de dilucidar el papel de COMMD1 en las propiedades anticancerígenas del CIGB-552, se evaluó el efecto de CIGB-552 en las líneas celulares H460WT y COMMD1 KO. ⁽¹⁸⁾ Solo en las células WT H460 tratadas con CIGB-552 disminuyó la activación NF- κ B y HIF-1, lo que enfatiza la importancia de COMMD1 como diana molecular para CIGB-552. ⁽¹⁸⁾ Por primera vez informamos la actividad del CIGB-552 en la transcripción mediada por HIF-1. Dado el papel de este factor de transcripción en la angiogénesis, este resultado puede explicar el efecto antiangiogénico del CIGB-552 informado en un modelo de ratón con xenoinjerto HT-29. ⁽⁷⁾ La presencia de la proteína COMMD1 es crucial para los efectos evaluados en líneas celulares de tumores intestinales y pulmonares, incluida la actividad de modulación de HIF-1 y NF- κ B. Un elemento relevante de estos estudios es que una alta afinidad por COMMD1 no garantiza la inhibición de las vías de señalización mediadas HIF-1 y NF- κ B.

Un resumen de las propiedades evaluadas en este trabajo que permite percibir la relación entre la estructura de los péptidos y sus propiedades biológicas (tabla 2). Aun pequeños cambios de la secuencia implican importantes cambios en las propiedades biológicas de los péptidos que producen efectos biológicos inesperados como puede ser la no correspondencia entre la afinidad por la molécula diana y las propiedades citotóxicas. Estos resultados demuestran que el método de cribado de la actividad biológica es fundamental para lograr la mejor optimización de las funciones deseadas.

Conclusiones

Los metabolitos del péptido CIGB-552 no son activos biológicamente por pérdida de su capacidad de unión al blanco molecular, su capacidad de penetración celular y de la actividad citotóxica, lo que indica que se requiere la secuencia completa del péptido para lograr el máximo de su actividad antitumoral. Adicionalmente, por primera vez se describen los mecanismos moleculares de internalización del péptido y sus derivados. Se demuestra que tanto los mecanismos de transducción como los de endocitosis están involucrados en la internalización del CIGB-552. Sin embargo, la eficacia de ambos mecanismos es diferente, lo que conduce a diferencias en los efectos proapoptóticos del CIGB-552 siendo la endocitosis la forma más eficaz de transportar el péptido CIGB-552 al interior de las células, así como a una mayor actividad biológica del péptido. Por su parte, en estas células no evidenciamos que la abundancia de COMMD1 determine la sensibilidad al CIGB-552. En conjunto, nuestros resultados muestran que la alta sensibilidad hacia el CIGB-552 resulta de la interacción entre el mecanismo de internalización, que determina la eficacia de la entrada de CIGB-552 y, en menor medida, la abundancia de COMMD1. Este resultado tiene relevancia clínica como posible biomarcador de respuesta. Las propiedades antiinflamatorias y antiangiogénicas del péptido CIGB-552 son mediadas a través de la presencia de la proteína COMMD1 en las líneas celulares estudiadas. Un elemento relevante de este estudio es que precisa que una mayor afinidad por el blanco COMMD1 no garantiza la inhibición de las vías de señalización mediadas HIF-1 y NF- κ B. Esta caracterización permite comprender mejor la relación entre la estructura del péptido y su función y sientan las bases para el desarrollo de nuevos péptidos más efectivos para el tratamiento del cáncer dirigidos a COMMD1 como blanco molecular.

Tabla 2. Resumen de las propiedades biológicas de los péptidos y su relación con la estructura

Péptido	Secuencia	Citotoxicidad	Unión a COMMD1	Penetración celular	Regulación negativa de NF- κ B
CIGB-550	HYRIKPTFRRLKWKYKGF	+++	+++++	+++++	+
CIGB-552	Ac-HARIKPTFRRLKWKYKGF	+++++	+++	+++++	+++++
17 aa	IKPTFRRLKWKYKGF	+	-	++	
14 aa	IKPTFRRLKWKYK	-	-	+	
10 aa	IKPTFRRLKW	-	-	+	

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lath A, Santal AR, Kaur N, Kumari P, Singh NP. Anti-cancer peptides: their current trends in the development of peptide-based therapy and anti-tumor drugs. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2022;1-40.
- Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(2):357-75.
- Hilchie AL, Hoskin DW, Power Coombs MR. Anticancer Activities of Natural and Synthetic Peptides. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1117:131-47.
- Blanco-Míguez A, Gutierrez-Jacome A, Perez-Perez M, Perez-Rodriguez G, Catalan-Garcia S, Fdez-Riverola F, *et al*. From amino acid sequence to bioactivity: The biomedical potential of antitumor peptides. *Protein Sci*. 2016;25(6):1084-95.
- Vallespi MG, Fernandez JR, Torrens I, Garcia I, Garay H, Mendoza O, *et al*. Identification of a novel antitumor peptide based on the screening of an Ala-library derived from the LALF(32-51) region. *J Pept Sci*. 2010;16(1):40-7.
- Fernandez Masso JR, Oliva Arguelles B, Tejada Y, Astrada S, Garay H, Reyes O, *et al*. The Antitumor Peptide CIGB-552 Increases COMMD1 and Inhibits Growth of Human Lung Cancer Cells. *J Amino Acids*. 2013;2013:251398.
- Vallespi MG, Pimentel G, Cabrales-Rico A, Garza J, Oliva B, Mendoza O, *et al*. Antitumor efficacy, pharmacokinetic and biodistribution studies of the anticancer peptide CIGB-552 in mouse models. *J Pept Sci*. 2014;20(11):850-9.
- Maine GN, Mao X, Komarck CM, Burstein E. COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. *EMBO J*. 2007;26(2):436-47.
- Van de Sluis B, Mao X, Zhai Y, Groot AJ, Vermeulen JF, van der Wall E, *et al*. COMMD1 disrupts HIF-1alpha/beta dimerization and inhibits human tumor cell invasion. *J Clin Invest*. 2010;120(6):2119-30.
- Riera-Romo M. COMMD1: A Multifunctional Regulatory Protein. *J Cell Biochem*. 2018;119(1):34-51.
- Khemaissa S, Warrant A, Sagan S. Tryptophan, more than just an interfacial amino acid in the membrane activity of cationic cell-penetrating and antimicrobial peptides. *Q Rev Biophys*. 2022;55:e10.
- Liu BR, Chiou SH, Huang YW, Lee HJ. Bio-Membrane Internalization Mechanisms of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides in Various Species. *Membranes (Basel)*. 2022;12(1).
- Zhu Y, Akhtar MU, Li B, Chou S, Shao C, Li J, *et al*. The design of cell-selective tryptophan and arginine-rich antimicrobial peptides by introducing hydrophilic uncharged residues. *Acta Biomater*. 2022;153:557-72.
- Ter-Avetisyan G, Tunnemann G, Nowak D, Nitschke M, Herrmann A, Drab M, *et al*. Cell entry of arginine-rich peptides is independent of endocytosis. *J Biol Chem*. 2009;284(6):3370-8.
- Daghero H, Pagotto R, Vallespi MG, Bollati-Fogolin M. Generation of stable reporter breast and lung cancer cell lines for NF-kappaB activation studies. *J Biotechnol*. 2019;301:79-87.
- Astrada S, Gomez Y, Barrera E, Obal G, Pritsch O, Pantano S, *et al*. Comparative analysis reveals amino acids critical for anticancer activity of peptide CIGB-552. *J Pept Sci*. 2016;22(11-12):711-22.
- Astrada S, Fernandez Masso JR, Vallespi MG, Bollati-Fogolin M. Cell Penetrating Capacity and Internalization Mechanisms Used by the Synthetic Peptide CIGB-552 and Its Relationship with Tumor Cell Line Sensitivity. *Molecules*. 2018;23(4).
- Daghero H, Fernandez Masso JR, Astrada S, Guerra Vallespi M, Bollati-Fogolin M. The Anticancer Peptide CIGB-552 Exerts Anti-Inflammatory and Anti-Angiogenic Effects through COMMD1. *Molecules*. 2020;26(1).
- Mc Gee MM, Hyland E, Campiani G, Ramunno A, Nacci V, Zisterer DM. Caspase-3 is not essential for DNA fragmentation in MCF-7 cells during apoptosis induced by the pyrrolo-1,5-benzoxazepine, PBOX-6. *FEBS Lett*. 2002;515(1-3):66-70.
- Nunez de Villavicencio-Diaz T, Ramos Gomez Y, Oliva Arguelles B, Fernandez Masso JR, Rodriguez-Ulloa A, Cruz Garcia Y, *et al*. Comparative proteomics analysis of the antitumor effect of CIGB-552 peptide in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J Proteomics*. 2015;126:163-71.
- Vallespi MG, Alvarez-Obregon JC, Rodriguez-Alonso I, Montero T, Garay H, Reyes O, *et al*. A Limulus anti-LPS factor-derived peptide modulates cytokine gene expression and promotes resolution of bacterial acute infection in mice. *Int Immunopharmacol*. 2003;3(2):247-56.
- Vallespi MG, Glaria LA, Reyes O, Garay HE, Ferrero J, Arana MJ. A Limulus antilipopolysaccharide factor-derived peptide exhibits a new immunological activity with potential applicability in infectious diseases. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7(4):669-75.
- Aguero-Chapin G, Galpert-Canizares D, Dominguez-Perez D, Marrero-Ponce Y, Perez-Machado G, Teixeira M, *et al*. Emerging Computational Approaches for Antimicrobial Peptide Discovery. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(7).
- Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*. 2012;37(2):207-15.
- Silva ARP, Guimaraes MS, Rabelo J, Belen LH, Perecin CJ, Farias JG, *et al*. Recent advances in the design of antimicrobial peptide conjugates. *J Mater Chem B*. 2022;10(19):3587-600.
- Ren SX, Shen J, Cheng AS, Lu L, Chan RL, Li ZJ, *et al*. FK-16 derived from the anticancer peptide LL-37 induces caspase-independent apoptosis and autophagic cell death in colon cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(5):e63641.
- Madani F, Lindberg S, Langel U, Futaki S, Graslund A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys*. 2011;2011:414729.
- Tunnemann G, Ter-Avetisyan G, Martin RM, Stockl M, Herrmann A, Cardoso MC. Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *J Pept Sci*. 2008;14(4):469-76.
- Hao M, Zhang L, Chen P. Membrane Internalization Mechanisms and Design Strategies of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16).
- Jobin ML, Alves ID. On the importance of electrostatic interactions between cell penetrating peptides and membranes: a pathway toward tumor cell selectivity? *Biochimie*. 2014;107 Pt A:154-9.
- Melo MN, Ferre R, Castanho MA. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(3):245-50.
- Vercauteren D, Vandebroucke RE, Jones AT, Rejman J, Demeester J, De Smedt SC, *et al*. The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol Ther*. 2010;18(3):561-9.
- Burkhead JL, Morgan CT, Shinde U, Haddock G, Lutsenko S. COMMD1 forms oligomeric complexes targeted to the endocytic

membranes via specific interactions with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem.* 2009;284(1):696-707.

34. Riedl A, Schleder M, Pudelko K, Stadler M, Walter S, Unterleuthner D, *et al.* Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses. *J Cell Sci.* 2017;130(1):203-18.

Recibido: 16/12/2024
Aprobado: 23/12/2024

Agradecimientos

A Tamara Díaz Argudín y Ana Yansi Etchegoyen Amoros por su apoyo invaluable en el laboratorio.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que la investigación se realizó en ausencia de cualquier relación comercial o financiera que pudiera interpretarse como un potencial conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

- Conceptualización: Julio R. Fernández Massó, Maribel Guerra Vallespi, Mariela Bollati-Fogolín
- Curación de datos: Julio R. Fernández Massó
- Análisis formal: Julio R. Fernández Massó, Maribel Guerra Vallespi, Mariela Bollati-Fogolín, Soledad Astrada Feijer, Hellen Daghero, Brizaida Oliva Argüelles, Gisela García Pérez, Ania Cabrales Rico, Maidel Carpio Alvarez, Nivaldo A. Gómez Hernández, Hilda Garay Pérez, Daniel Palenzuela Gardón, Mario Riera Romo
- Adquisición de fondos: Maribel Guerra Vallespi, Mariela Bollati-Fogolín
- Investigación: Julio R. Fernández Massó, Maribel Guerra Vallespi, Mariela Bollati-Fogolín, Soledad Astrada Feijer, Hellen Daghero, Brizaida Oliva Argüelles, Gisela García Pérez, Ania Cabrales Rico, Maidel Carpio Alvarez, Nivaldo A. Gómez Hernández, Hilda Garay Pérez, Daniel Palenzuela Gardón, Mario Riera Romo
- Metodologías: Julio R. Fernández Massó, Maribel Guerra Va-

llespi, Mariela Bollati-Fogolín, Soledad Astrada Feijer, Hellen Daghero, Ania Cabrales Rico

- Administración de proyecto: Maribel Guerra Vallespi, Mariela Bollati-Fogolín, Julio R. Fernández Massó
- Recursos: Maribel Guerra Vallespi, Mariela Bollati-Fogolín
- Supervisión: Maribel Guerra Vallespi, Mariela Bollati-Fogolín, Julio R. Fernández Massó
- Validación: Julio R. Fernández Massó, Soledad Astrada Feijer, Hellen Daghero
- Visualización: Julio R. Fernández Massó, Soledad Astrada Feijer, Hellen Daghero
- Redacción-borrador original: Julio R. Fernández Massó, Maribel Guerra Vallespi, Mariela Bollati-Fogolín, Soledad Astrada Feijer, Hellen Daghero
- Redacción-revisión y edición: Julio R. Fernández Massó

Financiamientos

Este trabajo fue financiado por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología y el Fondo de Convergencia Estructural del MERCOSUR (COF 03/11) y ANII (EQL_2013_X_1_2).

Cómo citar este artículo

Fernández Massó JR, Bollati-Fogolín M, Soledad Astrada, Daghero H, Oliva Argüelles B, García Pérez G, et al. Nuevos aportes al conocimiento de la relación estructura-función en la actividad antitumoral del péptido CIGB-552. *An Acad Cienc Cuba [internet]* 2024 [citado en día, mes y año];14(2):e2884. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/2884>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2024.

