



PEDECIBA – Biología  
Sub-área Biología Celular y Molecular



# Caracterización de los efectos anti-inflamatorios y/o anti-tumorales de un nuevo péptido anti-cáncer (CIGB-552)

Tesis para la obtención del título de Magíster en Ciencias Biológicas

**B.C Hellen Daghero Villanueva**

**Orientadora:** Dra. Mariela Bollati Fogolín

**Co-orientadora:** Dra. Maribel Guerra-Vallespí

**Tribunal de tesis:**

Dra Ana María Ferreira

Dr. Juan Andrés Abín

Dr. Mauricio Cabrera

Montevideo, Uruguay

Noviembre, 2018





## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi orientadora, Mariela Bollati-Fogolín y a mi co-tutora Maribel Guerra-Vallespí, por su confianza y apoyo a lo largo de la realización de mi tesis. Especialmente a Mariela que me dio la posibilidad de dedicarme a la investigación en un momento en que necesitaba un cambio en mi carrera y me permitió formar parte de la UBC. Y gracias Maribel por tu ayuda y todo el Ron!

Tuve la suerte de contar con becas para la realización de este trabajo. Por eso, agradezco a la ANII por la beca de maestría nacional y a la Comisión Académica de Posgrado de UdelaR por la beca de finalización de posgrado.

Quisiera agradecer a mis compañeras de laboratorio que me acompañan y ayudan día a día: Romina, Karen, Vanesa, Tatiana, Paula, Belén, Sabina y Soledad. Aprendo mucho con ellas, compartimos momentos muy lindos tanto dentro y fuera del laboratorio y además siempre me hacen reír. Romi particularmente fue quien me ayudó en todos los ensayos in vivo con muchísima paciencia, y además siempre estuvo para discutir resultados y el diseño experimental. Sabi fue quien hizo la magia en el sorter para que yo pueda obtener mis preciados clones. Karen, la *cell police*, también me ayudó mucho en análisis de datos de citometría, con la creación de mis bancos celulares e incluso cuidó mis células algún fin de semana. Gracias a todas las *UBC girls*!

Asimismo me gustaría agradecer a todo el Instituto Pasteur, al personal científico, administrativo, de mantenimiento y a la cantina. Siempre es bueno contar con gente que nos facilite el trabajo diario y lo haga de excelente manera.

Por último, agradezco a quienes me apoyan fuera del instituto y me impulsan a ser mejor persona. Mamá, Papá e Ian que siempre siguen y me acompañan en todos mis logros. A Tito, quien me convenció de hacer lo que me gusta; mi compañero y fan número uno. A mis abuelos, un agradecimiento y dedicatoria muy especial, Maruja y Negro: los voy a extrañar, y abuela Elida: gracias por cuidarme siempre. Y obviamente gracias a mis entrañables amigas de la vida por las risas, los brindis y los abrazos.

Parte de los resultados de este trabajo fueron presentados en las siguientes instancias:

Congreso Nacional de Biociencias. Mayo 2017, Montevideo, Uruguay. Sociedad Uruguaya de Biociencias. Poster: "Un nuevo péptido que inhibe la vía de NF- $\kappa$ B: hacia la comprensión de los mecanismos que determinan su actividad anti-inflamatoria." Daghero H., Pagotto R., Arévalo A., Guerra-Vallespí M., Bollati-Fogolín M.

Ciclo de seminarios del Institut Pasteur de Montevideo. 7 de junio 2018, Montevideo, Uruguay "CIGB-552: un nuevo péptido anti-cáncer. Hacia la comprensión de los mecanismos que determinan su actividad antitumoral".

8vo Simposio Latinoamericano de Tecnologías de cultivos de células animales (SLATCC). 21-24 de octubre de 2018, Río de Janeiro, Brasil. "Generation of stable reporter breast and lung cancer cell lines for NF- $\kappa$ B activation studies". Daghero H., Pagotto R., Guerra-Vallespí M., Bollati-Fogolín M.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
1.1 Cáncer .....	8
1.2 Péptidos bioactivos: potenciales agentes con capacidad anti-cáncer .....	10
1.3 CIGB-552: un nuevo péptido anti cáncer .....	12
1.4 Hacia la comprensión del mecanismo de acción de CIGB-552.....	17
1.5 NF- $\kappa$ B: Inflamación y cáncer .....	22
1.6 Generación de modelos reporteros de inflamación .....	22
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
2.1 Objetivo general.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Reactivos generales.....	25
3.2 Síntesis de Péptidos .....	25
3.3 Líneas celulares .....	26
3.4 Criopreservación y revitalización de líneas celulares .....	26
3.5 Ensayos de citotoxicidad: WST-1 .....	27
3.6 Generación de las líneas celulares reporteras .....	27
3.7 Caracterización de líneas reporteras .....	29
3.7.1 Cinética de activación .....	29
3.7.2 Activación de NF- $\kappa$ B con distintos estímulos pro-inflamatorios .....	29
3.7.3 Estabilidad de las líneas reporteras .....	30
3.8 Análisis de activación de la vía del factor NF- $\kappa$ B por citometría de flujo .....	30
3.9 Determinación de IL-8 en sobrenadantes de HT-29-NF- $\kappa$ B-GFP .....	31

3.10	Animales .....	32
3.11	Ensayos de inflamación aguda inducida por LPS. Análisis de la activación de NF-κB por bioluminiscencia .....	32
3.12	Análisis de imagen.....	33
3.13	Determinación de actividad luciferasa en lisados de órganos.....	33
3.14	Determinación de citoquinas por citometría de flujo .....	34
3.15	Análisis de activación de la vía del factor inducible por hipoxia HIF-1 .....	34
3.16	Análisis estadístico .....	36
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.2	Generación de las líneas celulares reporteras .....	37
4.3	Caracterización de las líneas celulares reporteras .....	39
4.3.1	Cinética de activación .....	40
4.3.2	Activación de NF-κB frente a distintos estímulos pro-inflamatorios .....	41
4.3.3	Estabilidad de las líneas reporteras .....	42
4.4	Evaluación de los efectos del péptido CIGB-552 y sus metabolitos en las líneas celulares reporteras para NF-κB.....	44
4.4.1	Determinación de IL-8 en sobrenadantes de cultivo de células HT-29-NF-κB-hrGFP.....	45
4.5	Evaluación de los efectos del péptido CIGB-552 en la vía de HIF-1 .....	47
4.6	Evaluación de los efectos del péptido CIGB-552 en el modelo reportero de ratones transgénicos NF-κB-RE-luc .....	49
4.6.1	Análisis del efecto del CIGB-552 sobre la activación de NF-κB <i>in vivo</i> .....	49
4.6.2	Evaluación del efecto del péptido CIGB-552 sobre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias	
	52	
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
5.1	Generación de líneas celulares reporteras para NF-κB .....	54
5.2	Caracterización de las líneas celulares reporteras .....	55
5.3	Efecto del péptido CIGB-552 y sus metabolitos en la activación de NF-κB <i>in vitro</i> .....	57
5.4	Efecto del péptido CIGB-552 en la activación de HIF-1 <i>in vitro</i> .....	58
5.5	Efecto del péptido CIGB-552 en la activación de NF-κB <i>in vivo</i> .....	59
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>61</b>

<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>62</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>63</b>

## RESUMEN

El cangrejo herradura (*Limulus* sp) produce un péptido antimicrobiano LALF (*Limulus* anti-LPS factor), el cual se une al Lipopolisacárido (LPS) de la pared bacteriana. A partir de un barrido de alanina de la región 32-51 de dicho péptido se desarrolló un péptido sintético de 20 aminoácidos denominado L2. Este péptido no es capaz de unir LPS y demostró capacidad de penetrar en las células, toxicidad selectiva en líneas celulares tumorales y aumentó la supervivencia de animales portadores de tumores. Con el objeto de producir una molécula más estable, se modificó la estructura primaria del L2 (se bloqueó el N-terminal por acilación y se reemplazaron dos aminoácidos por D-aminoácidos) obteniéndose un nuevo péptido sintético denominado: CIGB-552. Las propiedades biológicas descritas para el L2 fueron retenidas por el CIGB-552.

Este péptido de segunda generación penetra en las células y provoca un efecto pro-apoptótico a través de su mediador principal, la proteína COMMD1. Dicha proteína fue identificada como posible blanco de acción mediante ensayos de doble híbrido en levadura e inmunoprecipitación, y se validó como molécula mediadora de la acción anti-cáncer del péptido por experimentos de silenciamiento con shRNAi. El mecanismo de acción propuesto para el CIGB-552 implica el aumento de los niveles de la proteína COMMD1, la cual inhibe la vía del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, factor que promueve la expresión de genes implicados en la supervivencia celular, inflamación y oncogénesis.

Bajo la hipótesis que el CIGB-552 actúa sobre COMMD1 inhibiendo la vía del factor NF- $\kappa$ B para provocar la apoptosis de la célula tumoral, y dada la asociación entre cáncer e inflamación, en este trabajo nos propusimos estudiar si el péptido presenta efectos anti-inflamatorios en modelos celulares (*in vitro*) y animales (*in vivo*), a fin de comprender su rol en la biología tumoral. Para el abordaje *in vitro* generamos líneas celulares tumorales humanas (H460, HT-29 y T-47D) reporteras de la activación de NF- $\kappa$ B. Las células transfectadas establemente con el plásmido pNF- $\kappa$ B-hrGFP, que contiene el gen de la *green fluorescent protein*: GFP, permitieron evaluar por citometría de flujo la capacidad del péptido de modular la vía NF- $\kappa$ B frente a estímulos inflamatorios. Para los estudios *in vivo* seleccionamos el ratón transgénico NF- $\kappa$ B-RE-luc, modelo de inflamación sistémica donde se observa la activación de este factor tras un estímulo inflamatorio a través de la medida de luminiscencia del organismo vivo o *ex-vivo*. Nuestros resultados revelan que en modelos *in vitro* el CIGB-552 es capaz de modular la activación de NF- $\kappa$ B mediada por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Asimismo, en el modelo murino de inflamación aguda, el tratamiento con CIGB-552 logra disminuir la activación de NF- $\kappa$ B inducida por LPS con la concomitante reducción de la producción de citoquinas pro-inflamatorias IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y MCP-1.



Por último, considerando que COMMD1 también regula negativamente el factor HIF-1, se intentó profundizar en el posible papel del CIGB-552 sobre esta vía de señalización, la cual está involucrada en la eritropoyesis y angiogénesis, procesos claves en el desarrollo tumoral.

Nuestros resultados confirman el rol del CIGB-552 en la inhibición de la vía de señalización del factor HIF-1, y sobre la vía del factor NF- $\kappa$ B, así como también su efecto anti-inflamatorio.

## **ABREVIATURAS**

ACPs: del inglés, Anti-cancer Peptides

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AMPs: del inglés, Antimicrobial Peptides

ANOVA: del inglés, Analysis of Variance

APC: del inglés, Allophycocyanin

ARN: Ácido Ribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

CEUA: Comisión Ética para el Uso de Animales

CPPs: del inglés Cell Penetrating Peptides

CE50: Concentración Efectiva 50

CI50: Concentración Inhibitoria 50

COMMD: del inglés, Copper Metabolism MURR-1 Domain

DFX: Deferoxamina

DEX: Dexametasona

DMEM: del inglés, Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: ácido Etilendiamino Tetraacético

ELISA: del inglés, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMSA: del inglés, Electrophoretic Mobility Shift Assay

*et al.*: y colaboradores

EUA: Estados Unidos de América

FSC: del inglés, Forward-Scatter

GFP: del inglés, Green Fluorescent Protein

HIF-1: del inglés, Hypoxia Induced Factor - 1

HPLC: del inglés, High Performance Liquid Chromatography

hrGFP: del inglés, humanized recombinant Green Fluorescent Protein

IKK: del inglés, I $\kappa$ B Kinase

IFN $\gamma$ : Interferón –  $\gamma$

IL-1 $\beta$ : Interleuquina – 1 $\beta$

IL-6: Interleuquina – 6

IL-8: Interleuquina – 8

LALF: del inglés, Limulus Anti-LPS Factor

LDL: del inglés, Low-Density Lipoprotein

LPS: Lipopolisacárido

MCP-1: del inglés, Monocyte Chemoattractant Protein 1

NF- $\kappa$ B: del inglés, Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

OMS: Organización Mundial de la Salud

P/E: Penicilina/Estreptomicina

PBS: del inglés, Phosphate-Buffered Saline

PBMC: del inglés, Peripheral Blood Mononuclear Cells

PE: del inglés, Phycoerithrin

PI: del inglés, Propidium Iodide

RHD: del inglés, Rel Homology Domain

RPMI: del inglés, Roswell Park Memorial Institut

SD: del inglés, Standard Deviation

SFB: Suero Fetal Bovino

shRNAi: del inglés, short hairpin Ribonucleic Acid

SPF: del inglés, Specific Pathogen Free

SSC: del inglés, Side-Scattered light

TLR: del inglés, Toll Like Receptor

TNF- $\alpha$ : del inglés, Tumor Necrosis Factor –  $\alpha$

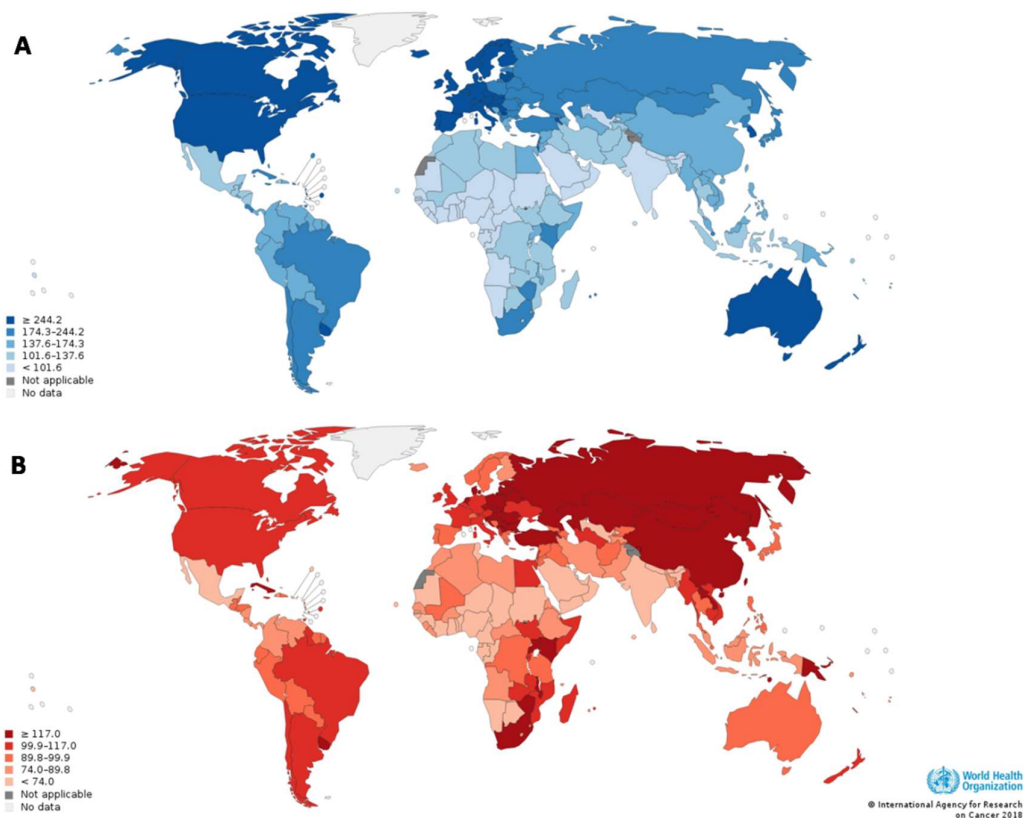
URL: Unidades Relativas de Luminiscencia

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cáncer

De acuerdo a los datos aportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) 8.8 millones de personas fallecieron a causa de cáncer en el mundo en el año 2015. Pese al desarrollo de nuevos tratamientos y capacidades diagnósticas, el cáncer continúa siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial.

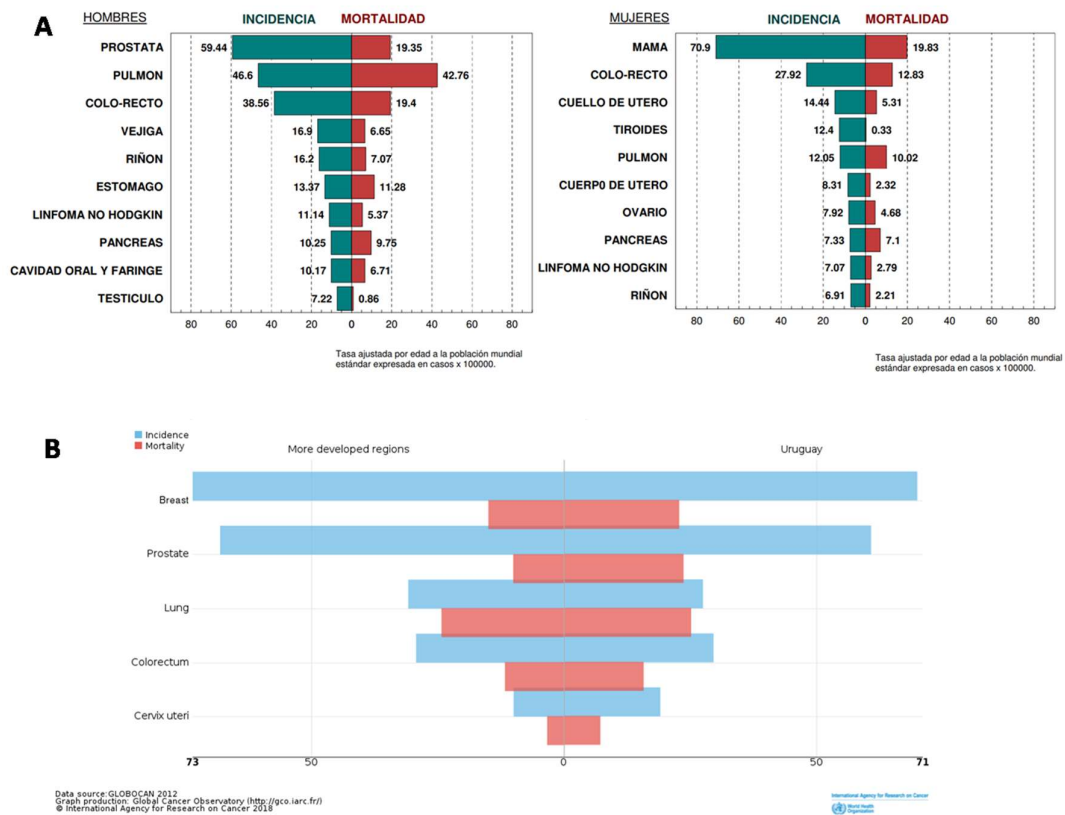
En Uruguay, la situación es similar a la observada en los países desarrollados. Tal como se observa en la Figura 1, nuestro país se ubica en el quintil superior de las tasas de incidencia y mortalidad lo que indica la relevancia del cáncer como desafío sanitario nacional [1], [2].



**Figura 1.** Estimación de las tasas de incidencia **(A)** y mortalidad **(B)** estandarizadas por edad para todos los sitios de cáncer reunidos (con excepción del cáncer de piel no melanoma) correspondientes a cada país para el año 2012.

Si bien estos datos son del 2012, esta situación se confirma con los datos proporcionados por el Registro Nacional de cáncer de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer correspondiente al período 2010-2014. Como se aprecia en la Figura 2, el perfil de incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer es similar al reportado para los países desarrollados.

En el caso del sexo masculino, los tipos de cáncer con mayor mortalidad en Uruguay son el de pulmón, el colorrectal y el de próstata, mientras que para el sexo femenino los que presentan mayor mortalidad son el de mama y el colorrectal.



**Figura 2.** Incidencia y tasas de mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes en Uruguay para el período 2010-2014 distinguiendo entre sexos (A). Estas tasas se expresan en casos por 100.000 (hombres o mujeres expuestos a riesgo) y se refieren a una población mundial de configuración demográfica estándar. (B) Comparación de la incidencia y tasa de mortalidad de distintos tipos de cáncer entre Uruguay y los países desarrollados con datos de 2012.

Siendo una enfermedad tan prevalente y asociada a altas tasas de mortalidad, es fundamental la búsqueda de nuevos tratamientos que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer. A los tratamientos convencionales como son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, se le han sumado últimamente otras terapias como la inmunoterapia y la terapia dirigida (“targeted therapies”). Sin embargo, estos tratamientos más recientes no están exentos de las dificultades que presentan las terapias convencionales tales como la capacidad de ocasionar numerosos efectos adversos y el desarrollo de resistencia al tratamiento [3]–[5].

Con el fin de avanzar en el desarrollo de nuevos tratamientos, se necesita de nuevas drogas anti-cáncer que carezcan de la toxicidad que conllevan las quimioterapias convencionales y que no se vean afectadas por los mecanismos clásicos de quimio-resistencia [6]. En este sentido, los péptidos bioactivos se presentan como agentes novedosos. En general, el interés de los péptidos como compuestos anti-tumorales se basa en que son moléculas pequeñas, presentan buena difusión y permeabilidad celular, pueden afectar varias vías relacionadas a la carcinogénesis y usualmente no son genotóxicos [7].

Los mecanismos por los que los péptidos bioactivos ejercen su acción anti-tumoral son variados: inducción de apoptosis, citotoxicidad, inhibición de la proliferación, inhibición de angiogénesis y actividad anti-oxidante [7], [8]. Sin embargo, pese a la cantidad de reportes de péptidos con actividad anti-tumoral *in vivo* y a los ensayos clínicos en curso, estos tratamientos aún no están aprobados en el mercado [9]. La principal desventaja que tienen los agentes terapéuticos de naturaleza peptídica es la baja biodisponibilidad oral además de la poca estabilidad en suero debido a la acción de proteasas o a la inactivación por LDL [8]–[10].

Para mejorar la estabilidad y la biodisponibilidad oral de los péptidos bioactivos, varias estrategias de síntesis se han adoptado, como ser incorporación de acilaciones N-terminales [11], amidación C-terminal o ciclación de péptidos [12], o sustitución por D-aminoácidos,  $\beta$ -aminoácidos o aminoácidos no naturales [7].

### **1.2 Péptidos bioactivos: potenciales agentes con capacidad anti-cáncer**

Los péptidos anti-microbianos (AMPs por sus siglas en inglés, *Anti-Microbial Peptides*) constituyen un mecanismo de defensa primitivo de la respuesta inmune innata. Estos péptidos genéticamente codificados, se movilizan rápidamente tras una infección microbiana y actúan rápidamente neutralizando un amplio rango de microorganismos [13]. Se han encontrado AMPs en casi todos los organismos testeados, desde bacterias, hongos, plantas hasta animales [6]. Si bien la estructura primaria y secundaria de los AMPs es muy heterogénea [6], la mayoría de los péptidos antimicrobianos son péptidos cortos (entre 5 y 40 aminoácidos), catiónicos y anfipáticos [6], [12]. Originariamente, la actividad antimicrobiana directa se consideró la función primaria de estos péptidos [14], actuando no solo frente a bacterias, sino también contra hongos, protozoarios y virus [15]. Pese a que el mecanismo exacto por el cual los AMPs ejercen su función aún no está completamente establecido, existe consenso en que estos péptidos desestabilizan selectivamente las membranas celulares y llevan a la lisis celular, para lo cual su carácter anfipático juega un rol importante [13]. Dado que las membranas bacterianas presentan lípidos cargados negativamente como fosfatidilglicerol, cardiolipina o fosfatidilserina,

los AMPs pueden desorganizar fácilmente estas membranas sin alterar las células de mamífero, ya que en éstas los lípidos presentes en la membrana no tienen carga (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomielina) [6]. Por este motivo los AMPs son selectivos para las membranas bacterianas. En el año 1991, se publicó que las magininas (unos AMPs naturales derivados de *Xenopus laevis*) y algunos de sus análogos sintéticos presentaban actividad citotóxica selectiva frente a líneas celulares tumorales [16]. A partir de dicho trabajo, numerosos estudios han analizado la capacidad anti cáncer de los AMPs, generando una nueva categoría de péptidos bioactivos: péptidos anti cáncer (ACPs, del inglés *Anti-Cancer Peptides*) [6], [10], [17].

En el caso de los ACPs, la selectividad en el mecanismo de disrupción de membrana se explica por las diferencias entre la composición lipídica y fluidez de las membranas celulares de células tumorales y no-tumorales. Las células de cáncer contrarrestan la asimetría de los lípidos de la membrana lipídica; éstas presentan mayor cantidad de fosfatidilserina (lípidos cargados negativamente) en la parte externa de la bicapa lipídica, mientras que en las células no-tumorales se encuentra en la capa interna de la membrana [6], [9]. Este efecto se corroboró con células de varios tipos de cáncer, tanto líneas celulares como cultivos primarios de células tumorales [9], [18]. Otras moléculas que están más representadas en las células tumorales y que aportan a la carga negativa de las membranas celulares son el heparán sulfato, el enriquecimiento de los residuos de ácido siálico y las mucinas O-glicosiladas [6], [17]. Además, existen otros factores que influyen en la selectividad de los ACPs frente a las membranas de células tumorales como ser la fluidez de la membrana, que es mayor en muchos tipos de cáncer debido a un menor contenido de colesterol, y la presencia de mayor número de microvellosidades respecto a las células no transformadas. Sin embargo, estas características no son exactamente iguales en todos los tipos de tumores. Por ejemplo, se ha reportado que existen líneas celulares derivadas de cánceres de próstata y de mama que presentan un mayor contenido de balsas lipídicas ricas en colesterol (lo que las hace menos fluidas y menos sensibles a la lisis por ACPs), mientras que para gran número de líneas celulares se ha reportado lo contrario [9], [17]. Colectivamente, la carga neta negativa, la composición lipídica y la mayor superficie de las células neoplásicas contribuyen a la capacidad de ciertos ACPs de generar efectos líticos sin afectar las células normales [10].

Asimismo, además de los mecanismos de acción membranolíticos, tanto los AMPs como los ACPs son capaces de ingresar a las células e interactuar con blancos moleculares directamente. Los péptidos que pueden atravesar las membranas, llamados péptidos con capacidad de penetración celular (CPPs, del inglés *Cell penetrating peptides*); una vez dentro del citoplasma también son capaces de alterar la membrana mitocondrial induciendo la apoptosis

de la célula tumoral [12], [15]. La inducción de apoptosis también puede ser independiente de la vía mitocondrial, mediante interacción con receptores de muerte celular (vía extrínseca) [8], [19].

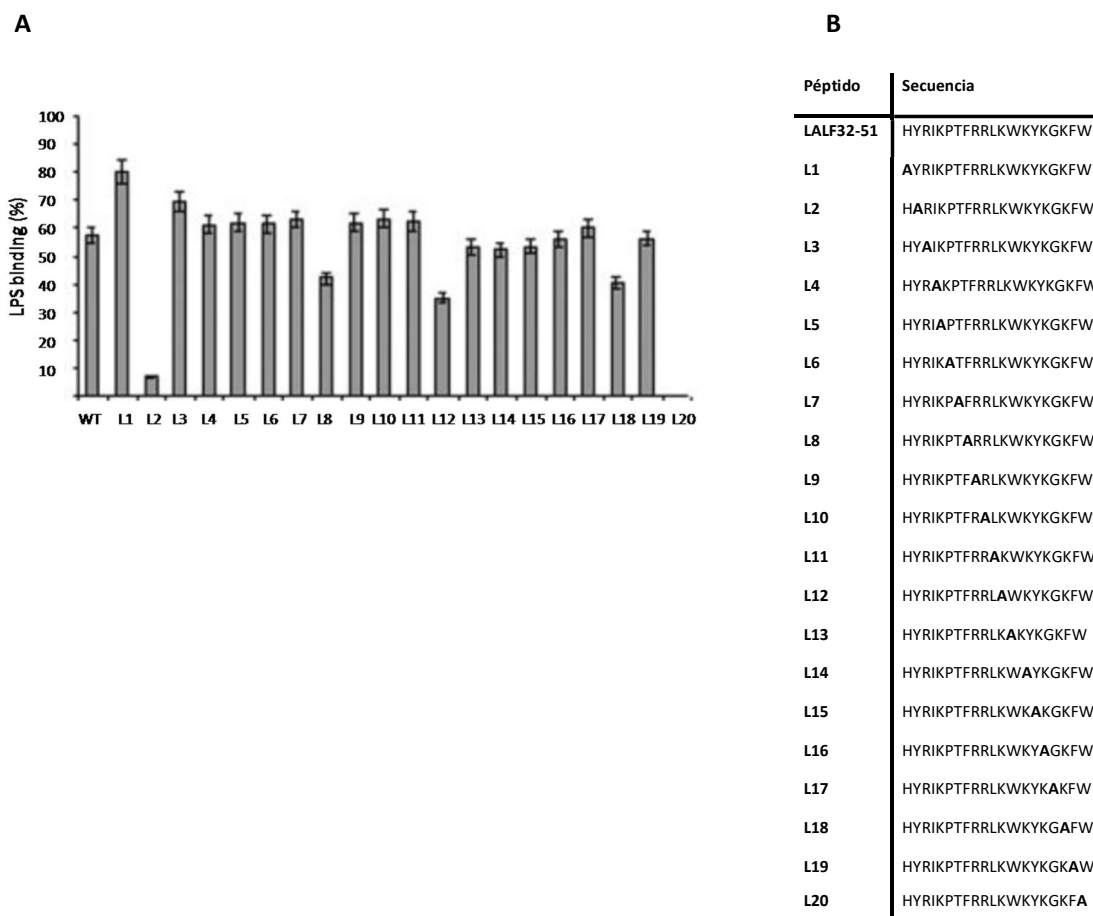
Entre otros de los mecanismos de acción que no involucran lisis de membrana se incluye la actividad anti-angiogénica, dado que estos péptidos pueden bloquear la función de los receptores de células endoteliales [10], [17], [20]. Por otro lado, se ha reportado que los ACPs son capaces de modular la respuesta inmune. Por ejemplo, los aloferones son ACPs derivados de los AMPs encontrados en insectos, para los cuales se comprobó que son capaces de estimular la actividad de las células NK *in vitro* e inducen la producción de interferón tanto *in vitro* como *in vivo* [21]. Si bien no se conoce el mecanismo molecular que explique la capacidad anti cáncer de la mayoría de los ACPs, se han reportado varios efectos producidos por el tratamiento con péptidos que se explican por una interacción con vías de transducción de señales [9].

### **1.3 CIGB-552: un nuevo péptido anti cáncer**

El artrópodo *Limulus polyphemus*, también conocido como cangrejo herradura, presenta un sistema circulatorio sencillo conformado por una hemolinfa compuesta por un único tipo de célula [22]. Frente a la presencia de endotoxinas, estas células liberan el contenido de sus gránulos, generando una cascada de coagulación que se cree es un mecanismo de defensa ante patógenos [23]. Este sistema presenta una serie de proteínas, incluida una que es inhibidora de la cascada de coagulación: el factor anti-LPS [24]. Esta proteína denominada LALF por sus siglas en inglés (*Limulus* Anti-LPS Factor) es una proteína básica de tamaño pequeño (101 aminoácidos) [25] que es capaz de unirse al LPS y ejercer una acción antimicrobiana principalmente frente a bacterias Gram negativas [24], [26]. Partiendo del motivo de unión a LPS de la proteína LALF [22] se deriva el péptido lineal LALF<sub>32-51</sub>, un pequeño péptido catiónico anfipático, que no sólo une LPS sino que es capaz de modular la respuesta inmune tanto *in vitro* como *in vivo* [27]–[29].

Como estrategia para la búsqueda de nuevos agentes con propiedades innovadoras se tomó de base el péptido LALF<sub>32-51</sub>, y se realizó un barrido de Alanina. Los péptidos análogos así generados fueron inicialmente evaluados en relación a la capacidad de unión a LPS y actividad anti-tumoral [30] (Ver Figura 3).

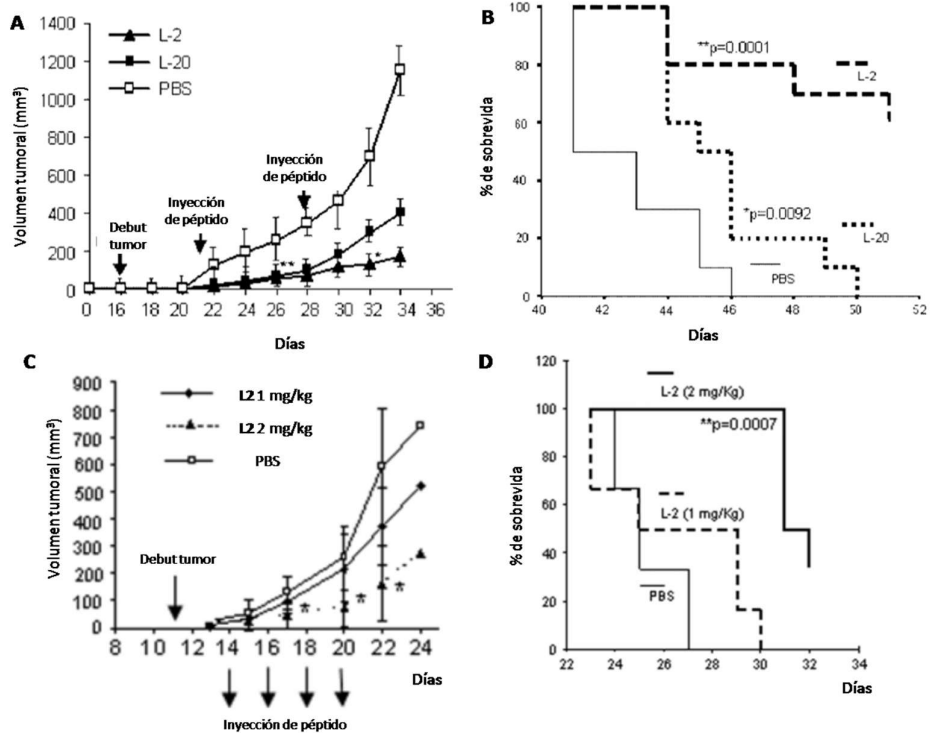




**Figura 3.** Péptidos análogos a LALF<sub>32-51</sub> generados por barrido de Alanina. Los ensayos de unión a LPS (**A**) se realizaron mediante ELISA de competencia. En **B** se muestran las secuencias del péptido LALF<sub>32-51</sub> y los péptidos análogos. Modificado de Vallespi *et al.*, 2010 [30].

Como se observa en la Figura 3, los péptidos L2 y L20 carecen de la capacidad de unir LPS. En estos péptidos se evaluó la capacidad de penetración celular, la actividad anti-proliferativa *in vitro* y la capacidad anti-tumoral *in vivo*. Se determinó que el péptido L2 presenta capacidad de penetración celular, citotoxicidad diferencial hacia líneas celulares de origen tumoral y que su administración en ratones portadores de tumores murinos reduce el crecimiento tumoral y aumenta la supervivencia respecto a los ratones tratados con PBS o con el péptido L20 [30]. El tratamiento con el péptido L2 también logró aumentar la supervivencia y reducir el crecimiento tumoral en ratones desnudos (*nude mice*) portadores de un tumor colorrectal derivado de la línea tumoral humana LS 174T (Figura 4) [30].

Por último, se analizaron cortes histológicos de los tumores murinos y se observó un aumento en la fracción de células apoptóticas en los tumores de los ratones tratados con el péptido L2, respecto a los tumores de ratones control (tratados con PBS) [30].



**Figura 4.** Péptidos L2 y L20 fueron probados en un modelo de carcinoma pulmonar murino en ratones inmunocompetentes C57/BL6 (A, B). El péptido L2, que presentó mayor actividad anti-tumoral, se evaluó en un modelo de cáncer colorrectal humano implantando células LS 174T en ratones *nude* (nu/nu) (C, D). Modificado de Vallespí *et al.*, 2010 [30].

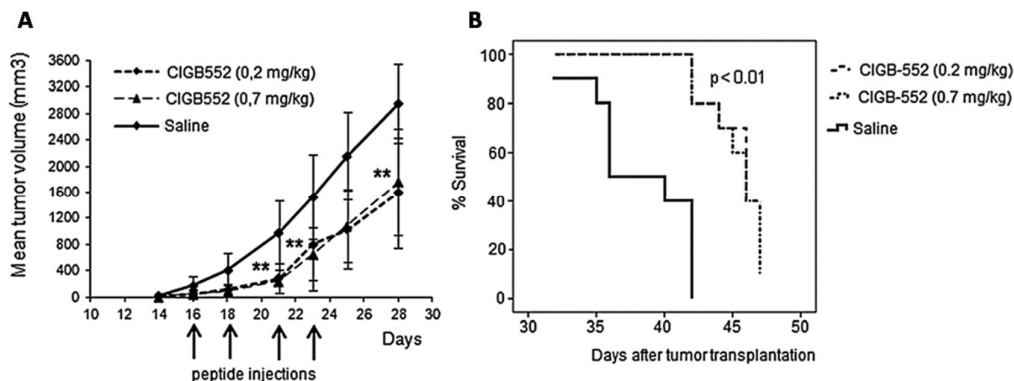
Tomando el péptido L2 de base, se le introdujeron ciertas modificaciones a la estructura primaria con el fin de mejorar su estabilidad en sangre, su actividad biológica y especificidad [31]. Las modificaciones consistieron en la incorporación de dos D-aminoácidos (Prolina 6 y Leucina 11) y la acilación de la porción N-terminal, y a este nuevo péptido de segunda generación se le llamó CIGB-552. Tal como se observa en la Tabla 1, este nuevo péptido mostró una mayor citotoxicidad en las líneas derivadas de tumores humanos respecto al péptido parental L2 [31].

**Tabla 1.** Citotoxicidad de los Péptidos L2 y CIGB-552 en distintas líneas celulares humanas.

Línea Celular	Origen	CI50 ( $\mu$ M) L2	CI50 ( $\mu$ M) CIGB-552
H460	Carcinoma de pulmón a células no pequeñas	57 $\pm$ 6	23 $\pm$ 8
H-125	Carcinoma de pulmón a células no pequeñas	75 $\pm$ 9	42 $\pm$ 6
H-82	Carcinoma de pulmón a células pequeñas	50 $\pm$ 6	15 $\pm$ 3
LS174T	Adenocarcinoma de colon	56 $\pm$ 3	22 $\pm$ 4
MDA-231	Adenocarcinoma de mama	125 $\pm$ 3	40 $\pm$ 9
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica	234 $\pm$ 9	249 $\pm$ 6

Adaptado de Fernández-Massó *et al.*, 2013 [31].

Al igual que para el péptido L2, se evaluó el efecto del nuevo péptido CIGB-552 en modelos murinos de cáncer en ratones inmunocompetentes inyectados con células CT-26 y en ratones desnudos inyectados con células de cáncer de colon humano HT-29. En ambos modelos se demostró una mayor sobrevida y un enlentecimiento del crecimiento tumoral para los ratones que recibieron el péptido vía subcutánea respecto a los tratados con el vehículo (Figura 5).

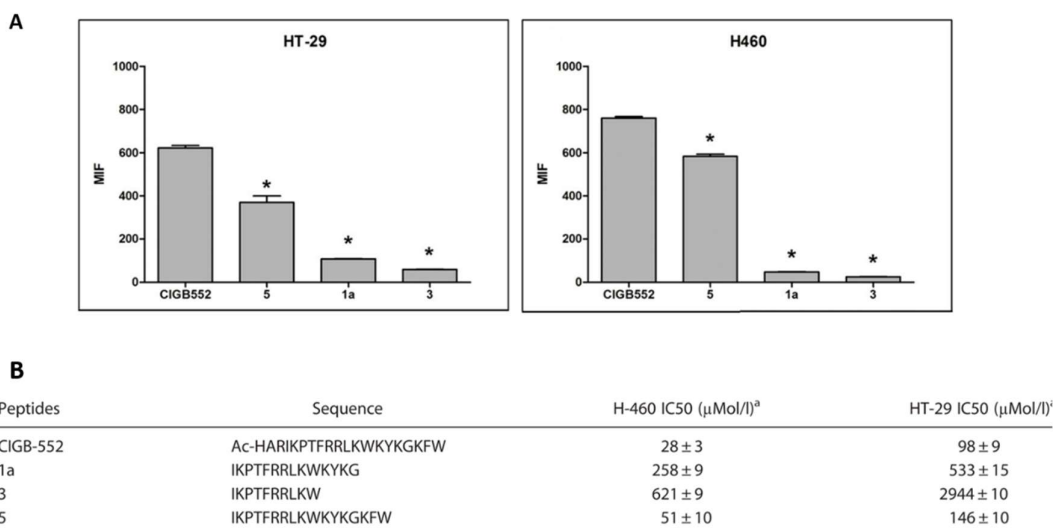


**Figura 5.** Efecto anti-cáncer del CIGB-552 en ratones BALB/c con tumores murinos. Los ratones tratados con el péptido mostraron un menor crecimiento tumoral (A) y una mayor sobrevida (B) que los ratones tratados con PBS. Modificado de Vallespi *et al.*, 2014 [32].

El tipo de muerte celular en los tumores de estos modelos se evaluó mediante el análisis de fragmentación *in situ* del ADN. Este ensayo reveló resultados similares a los del péptido parental L2: una mayor fracción de células apoptóticas en los cortes de tumores provenientes de ratones tratados con el péptido CIGB-552, mientras que para el grupo no tratado los tumores no mostraron células apoptóticas [32]. Estos resultados indican que las modificaciones introducidas al L2 no alteraron la actividad biológica del péptido. Por otro lado, se demostró que el

tratamiento con el péptido también es capaz de disminuir el tamaño y el número de los vasos sanguíneos presentes en los tumores de células HT-29 (evaluado por inmunomarcación de CD31), comparado con los vasos de los tumores control [32]. Los estudios farmacocinéticos y de biodistribución del péptido luego de su administración por vía subcutánea revelaron un perfil correspondiente a un modelo monocompartmental, con un pico de concentración en plasma a los 20 minutos y una vida media de 8.1 horas [32]. Si bien el péptido se acumula en riñones e hígado transitoriamente, no se evidenció ninguna alteración en la histología de estos órganos. Asimismo, el péptido CIGB-552 no sólo llegó rápidamente al sitio del tumor (20 minutos) sino que tras 24 horas se mantuvo mayormente en el tumor, comparado con otros órganos [32].

Por último, se realizó un estudio de estabilidad en suero, en el que se expuso el suero de ratones BALB/c al péptido a distintos tiempos y se analizó el perfil de degradación por UV RP-HPLC y se caracterizaron los metabolitos por espectrometría de masas [32]. De los metabolitos detectados se seleccionaron tres: 1a, 3 y 5, se sintetizaron y se evaluó el efecto citotóxico y su capacidad de penetración en líneas celulares humanas tumorales. De ellos, sólo el metabolito de mayor tamaño presentó efectos similares a los del CIGB-552 pero sin ser igual de efectivo (Figura 6). Además, ninguno de estos tres metabolitos presentan la capacidad de inducir apoptosis en líneas celulares tumorales como el CIGB-552 [33].



**Figura 6.** Los metabolitos 1a, 3 y 5 presentan menor capacidad de penetración celular (A) y efecto citotóxico (B) que el péptido CIGB-552. Modificado de Vallespi *et al.*, 2014 [32].

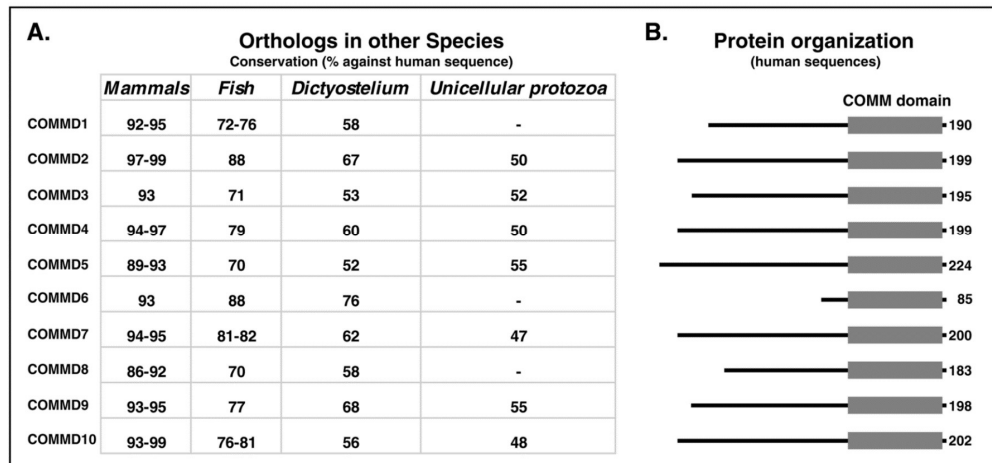
#### 1.4 Hacia la comprensión del mecanismo de acción de CIGB-552

A pesar de la cantidad de evidencia sobre el efecto anti-cáncer del péptido CIGB-552, aún resta estudiar el mecanismo de acción a nivel molecular. Con el fin de encontrar los posibles blancos de acción del CIGB-552 se utilizó como estrategia dos ensayos complementarios: un ensayo de doble híbrido en levadura para identificar las moléculas que interactúan específicamente con el péptido (en este caso el péptido L2, dado que al contener D-aminoácidos el CIGB-552 no puede ser traducido *in vivo*) y un ensayo de inmunoprecipitación (*pull-down*) para validar estas interacciones [31].

De esta forma, se identificó la proteína COMMD1 como posible blanco de acción del péptido CIGB-552. El tratamiento con el péptido genera una acumulación de COMMD1 endógena (tanto en el núcleo como en el citoplasma) que no se ve acompañada por un aumento de su ARN mensajero, sugiriendo una estabilización post-traducciona [31]. Asimismo, el silenciamiento de COMMD1 en células H460 mediante ARN de interferencia evidenció que los efectos citotóxicos del péptido CIGB-552 dependen de la presencia de COMMD1 [31].

El gen de la proteína COMMD1 fue inicialmente descubierto en los perros Bedlington Terrier, debido a que una mutación en dicho gen generaba una toxicosis por cobre severa [34]. Posteriormente, Burstein y colaboradores descubrieron que las proteínas con dominio COMM pertenecían a una nueva familia de proteínas denominada COMM (del inglés *Copper Metabolism MURR-1 Domain-containing*) [35]. Esta familia de proteínas, está compuesta por 10 miembros altamente conservados en distintas especies de organismos multicelulares y en algunos protozoarios (Figura 7A) [36]. En todos los miembros de la familia, si bien la región N-terminal es única y variable, el dominio COMM ubicado en el extremo C-terminal se encuentra altamente conservado (Figura 7B). Además de definir la presencia a esta familia de proteínas, el dominio COMM permite la interacción entre COMMD1 y las demás proteínas de la familia (incluso consigo misma), con la subsiguiente formación de multímeros [35].

La estructura terciaria de la proteína no se ha resuelto, principalmente porque la proteína es propensa a la formación de agregados [37]. Dado que las interacciones proteína-proteína están mediadas por el dominio COMM, el dominio C-terminal probablemente genere agregados a las concentraciones necesarias para la determinación de su estructura [37]. Los algoritmos de predicción de estructura secundaria indican la presencia de una hoja beta conservada y una alfa hélice terminal [36]. Por otra parte la estructura del extremo N-terminal sí fue analizada y demuestra una secuencia de cinco hélices alfa altamente empaquetadas [37].



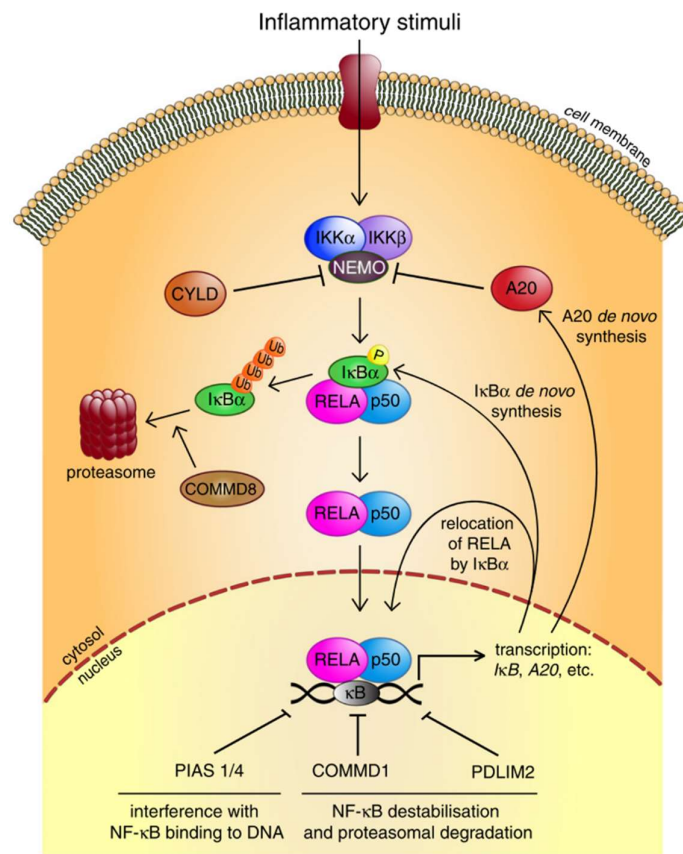
**Figura 7.** Identificación de genes ortólogos en otras especies (A). Se encontraron ortólogos de los distintos genes COMMD humanos en mamíferos, peces y amebas (*Dictyostelium discoideum*). También en protozoarios unicelulares como *Trichomonas vaginalis*. Los números indican el porcentaje de conservación con la secuencia humana. En B se muestra el dominio COMM en gris, y la extensión de la secuencia aminoacídica de los miembros de la familia COMMD humanos. Tomado de Maine y Burstein, 2007 [36].

Aunque mayormente se expresa en el citosol, también se han detectado bajos niveles de COMMD1 en el núcleo. Dado que COMMD1 es una proteína pequeña (21kDa) y no presenta señal de localización nuclear, se estima que entra al núcleo por difusión pasiva [38], [39]. Por otro lado, se observó que la expresión de las proteínas COMMD se da en una gran cantidad de tejidos, pero la abundancia relativa de los ARN mensajeros de los distintos miembros de la familia varía en los distintos tejidos [35].

Como se mencionó anteriormente, una de las funciones de las proteínas COMMD es la regulación de la homeostasis del cobre. Sin embargo, se conocen otras funciones de esta familia como la capacidad de regular el transporte de iones [40] y la respuesta a hipoxia [39], [41]. Una de las funciones más relevantes es la inhibición de la vía del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (del inglés, *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), que activa la transcripción de numerosos genes relacionados con la supervivencia celular, inflamación y oncogénesis [36]. Hasta el momento, todos los miembros de la familia de proteínas COMMD son capaces de inhibir NF- $\kappa$ B.

Este factor de transcripción está conformado por dímeros de proteínas muy conservadas que comparten un dominio llamado RHD (del inglés *Rel Homology Domain*). En mamíferos existen cinco genes que codifican para dichas proteínas RELA (p65), RELB (RelB), REL (c-Rel), NFKB1 (p50/p105) y NFKB2 (p52/p100). Normalmente los dímeros se encuentran secuestrados en el

citósol por unión a proteínas inhibitorias del NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ Bs: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  and I $\kappa$ B $\epsilon$ ), las cuales enmascaran la señal de exportación nuclear de los dímeros [42]. Dependiendo del estímulo, el factor NF- $\kappa$ B puede activarse por la vía clásica (también conocida como canónica), la vía alternativa (o no canónica) o la vía de activación atípica [43]. Varios estímulos son responsables de la activación de la vía canónica, incluyendo citoquinas pro-inflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés), interleuquina 1 (IL-1) y lipopolisacárido (LPS). Tanto en la vía clásica como en la alternativa, la activación de NF- $\kappa$ B se da por activación de la quinasa de I $\kappa$ Bs (IKK), que induce la fosforilación y posterior ubiquitinación y degradación proteosomal de la proteína inhibitoria I $\kappa$ B [42]. De esta manera se expone la señal de exportación nuclear de los dímeros de NF- $\kappa$ B, los cuales una vez traslocados al núcleo se unen a secuencias específicas de ADN y promueven la expresión de diversos genes. Dichos genes corresponden a quimioquinas, receptores inmunes, moléculas de adhesión, genes de respuesta a estrés, reguladores de apoptosis, factores de crecimiento, otros factores de transcripción, enzimas, y reguladores del ciclo celular [43].



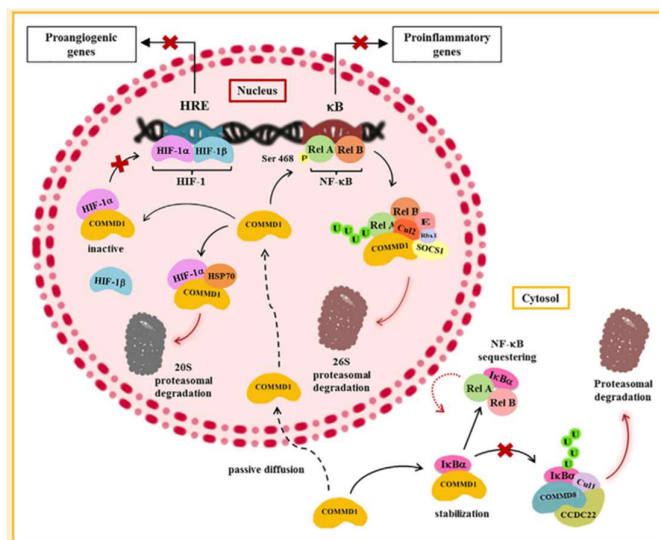
**Figura 8.** Activación de la vía clásica del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, mecanismos de regulación negativa y función de la proteína COMMD1 en el mismo. Tomado de Bartuzi *et al.*, 2013 [38].

Se ha reportado que COMMD1 es capaz de regular la terminación de la respuesta de NF- $\kappa$ B en el núcleo, ya que promueve la ubiquitinación de la subunidad RelA y por tanto, su degradación proteosomal [44]. El hecho que el tratamiento con el péptido CIGB-552 en células H460 genere no sólo un aumento de la concentración de proteína COMMD1 sino que además se evidencia un aumento de proteína RelA ubiquitinada, sugiere que el mecanismo de acción anti-tumoral estaría mediado por la terminación de la respuesta de NF- $\kappa$ B [31].

Por otra parte, se han buscado otros blancos moleculares posibles del péptido CIGB-552 mediante técnicas proteómicas en células Hep2 y HT-29. Las proteínas identificadas corresponden a proteínas involucradas en la señalización de NF- $\kappa$ B, la modulación de apoptosis y del ciclo celular, la respuesta a hipoxia y vías de reparación del ADN [45], [46]. Respecto a la respuesta a hipoxia, la proteína COMMD1 también tiene un papel regulador en la vía del factor de transcripción HIF-1 (*Hypoxia Induced Factor 1*) [41], [47]. El factor HIF-1 es un heterodímero compuesto por una subunidad constitutivamente expresada, HIF-1 $\beta$ , y una unidad regulada por la presencia de oxígeno (HIF-1 $\alpha$  o HIF-2 $\alpha$ ), cuyos niveles son muy bajos en normoxia debido a la degradación por acción de prolin hidroxilasas. Bajo condiciones de hipoxia, la actividad de las prolin hidroxilasas se ve reducida y la acumulación de HIF-1 $\alpha$  permite la dimerización con la subunidad HIF-1 $\beta$ . Los genes blanco del factor HIF-1 están involucrados en el metabolismo celular, remodelación de la matriz extracelular, supervivencia celular, eritropoyesis, tono vascular y angiogénesis [41], [48]. Debido a la importancia de la hipoxia en la biología tumoral y los eventos regulados por el factor HIF-1 que son críticos para la supervivencia celular, este factor se ha convertido en un potencial target anti-cáncer [48], [49].

La proteína COMMD1 interviene en la vía del factor HIF-1 promoviendo la degradación proteosomal de la subunidad HIF-1 $\alpha$  [50] y también inhibiendo la dimerización de las subunidades HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$  [41] (ver Figura 9). Por lo tanto, la proteína COMMD1 es un regulador negativo de esta vía de señalización. Considerando los resultados del potencial efecto anti-angiogénico del péptido CIGB-552 en ratones *nude* portadores de tumores humanos [32], la estabilización de COMMD1 por parte del péptido CIGB-552 podría tener un rol en la disminución de la angiogénesis.





**Figura 9.** Rol de la proteína COMMD1 en las vías de señalización de los factores de transcripción NF-κB y HIF-1. Tomado de M. Riera-Romo, 2013 [47].

En la tabla 2 se observan las características evaluadas para el péptido CIGB-552 y sus metabolitos. Hasta el momento, la capacidad de inhibir NF-κB no se ha estudiado para sus metabolitos de degradación ni para el péptido parental LALF<sub>32-51</sub>. En el caso del CIGB-552 sólo se evaluó la actividad anti NF-κB en la línea HT-29-NF-κB-hrGFP [45]. Por otro lado, aún no se ha evaluado el efecto del péptido CIGB-552 o sus metabolitos en la actividad del factor HIF-1.

**Tabla 2.** Resumen de las propiedades del CIGB-552 y sus metabolitos.

Péptido	Secuencia	Efecto pro-apoptótico	Interacción con COMMD1	Capacidad de penetración celular
CIGB-552	HARIKpTFRR/KWKYKGKFW	+++	+++	+++
5 (17 aa)	IKpTFRR/KWKYKGKFW	-	++	+
1a (14 aa)	IKpTFRR/KWKYKG	-	-	-
3 (10 aa)	IKpTFRR/KW	-	-	-

Adaptado de Astrada *et al.*, 2016 [33].

### 1.5 NF-κB: Inflamación y cáncer

Cuando Hanahan y Weinberg actualizaron su prestigiosa revisión “The hallmarks of cancer” en 2011, incorporaron como un nuevo hito del cáncer a la inflamación como promotora de tumores [51]. Hasta este momento, está aceptado que la inflamación ejerce un rol no sólo en la iniciación tumoral, sino que puede contribuir a la progresión tumoral influyendo en la angiogénesis y en la expansión metastásica [52]–[54].

Debido a la relevancia de la vía del factor de transcripción NF-κB en la iniciación y mantenimiento de los procesos inflamatorios, se ha asociado la actividad de esta vía con la actividad promotora de tumores [55]. El rol de NF-κB en la tumorigénesis estaría dado por la señalización relacionada a la estimulación de la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis, la estimulación de la angiogénesis y la remodelación del microambiente tumoral, facilitando la invasión tumoral a distintos tejidos [55], [56].

Por este motivo, es necesario contar con herramientas que nos permitan estudiar el rol de esta vía de señalización en una enfermedad tan compleja como el cáncer. A su vez, el desarrollo de nuevas moléculas con capacidad de inhibir la activación de NF-κB requiere de sistemas apropiados y confiables para el tamizaje de un número elevado de compuestos.

### 1.6 Generación de modelos reporteros de inflamación

Dado el rol que cumple la señalización de NF-κB en la inflamación crónica y en cáncer [56]–[58], donde la vía incluso puede estar constitutivamente activada [59], es de interés identificar inhibidores efectivos para la intervención farmacológica.

Las técnicas tradicionales para determinar la activación o inhibición de NF-κB se basan en la medición de la localización y cuantificación de NF-κB ya sea por western blot, EMSA (del inglés *Electrophoretic Mobility Shift Assay*), o microscopía de células inmunomarcadas. Todas estas técnicas requieren protocolos laboriosos y por lo tanto, no presentan buena reproducibilidad y no son aptas para ensayos de alto rendimiento (*high throughput*) o de alto contenido (*high content*).

La generación de modelos reporteros se presenta como una alternativa rápida, reproducible y menos laboriosa para la evaluación de compuestos que actúen sobre la vía de señalización de NF-κB. En cuanto a los ensayos *in vitro*, existen numerosas líneas celulares reporteras disponibles comercialmente. Sin embargo, la mayoría de estas líneas utilizan como reporteros a la proteína luciferasa o la fosfatasa alcalina [60], [61]. Estos sistemas reporteros presentan ciertas desventajas. Debido a que no son reporteros *per se*, requieren de un sustrato exógeno

para desarrollar la actividad reportera. Por otra parte, requieren la lisis de las células para su medición y debido a esto no es posible obtener datos de cada célula [62].

Nuestro grupo ya generó dos líneas celulares reporteras para NF- $\kappa$ B derivadas de líneas humanas de cáncer colorrectal utilizando la proteína fluorescente verde o GFP (del inglés *Green Fluorescent Protein*): Caco-2-NF- $\kappa$ B-GFP y HT-29-NF- $\kappa$ B-GFP [63]. La utilización de GFP como reportero tiene ciertas ventajas: permite obtener datos de célula única ya sea por microscopía o por citometría de flujo, y permite la detección de la señal sin necesidad de agregar un sustrato exógeno o de lisar las células.

Asimismo, existen reporteros de la vía de NF- $\kappa$ B para utilizar modelos *in vivo*. Carlsen y colaboradores generaron y caracterizaron un ratón transgénico con fondo BALB/c, para evaluar la activación de NF- $\kappa$ B. Este modelo presenta como gen reportero el gen de la luciferasa [64] y permite monitorear la actividad del factor de transcripción en el animal entero por imagenología de bioluminiscencia *in vivo*.

A diferencia de otros modelos *in vivo* que utilizan líneas celulares reporteras inyectadas en ratones nude [61], el ratón transgénico NF- $\kappa$ B-RE-*Luc* permite la medición de la actividad de NF- $\kappa$ B en un animal inmunocompetente. Por lo tanto, es posible medir otros parámetros de la respuesta inflamatoria determinando citoquinas en sangre.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Bajo la hipótesis de que el CIGB-552 actúa sobre la proteína COMMD1, la cual inhibiría la vía de activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, induciendo un efecto anti-inflamatorio y antitumoral, se intentará profundizar en el conocimiento de los efectos producidos por el CIGB-552 y sus metabolitos derivados (10, 14 y 17 aminoácidos) en esta vía de señalización, mediante la utilización de sistemas biológicos reporteros.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Generación y caracterización de líneas celulares reporteras de la activación de NF- $\kappa$ B derivadas de líneas celulares humanas de cáncer: H460 y T-47D.
- Estudiar el efecto del péptido CIGB-552 y sus metabolitos derivados sobre la activación de la vía NF- $\kappa$ B en líneas celulares de cáncer humanas.
- Evaluar el efecto del péptido CIGB-522 sobre la activación del factor de transcripción HIF-1 en la línea celular derivada de carcinoma de pulmón H460
- Estudiar el efecto del péptido CIGB-552 sobre la activación de la vía NF- $\kappa$ B en un modelo murino reportero de inflamación sistémica.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Reactivos generales

Las sales utilizadas para la preparación de soluciones fueron obtenidas de Sigma (EUA), al igual que los siguientes reactivos: LPS de *E. coli* (serotipos O55:B5 y O26:B6), higromicina B, Penicilina y Estreptomicina (P/E), Factor de Necrosis Tumoral alfa recombinante humano (TNF- $\alpha$ ), inhibidor BAY 11-7082, Dexametasona, Dimetilsulfóxido (DMSO), Ioduro de propidio (IP) y el Kit *Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination* BCA1.

La interleuquina – 1 beta (IL-1 $\beta$ ) humana proviene de Abcam (EUA).

Los medios de cultivo para células DMEM, RPMI 1640 y OptiMEM™, y el suero fetal bovino (SFB) provienen de Life Technologies (EUA). Además se obtuvieron de Life Technologies: Tripsina-EDTA 0.05%, Geneticina (G418) y el reactivo transfectante Lipofectamina 2000®

El plásmido pNF $\kappa$ B-hrGFP se obtuvo de Stratagene (EUA). El plásmido reportero HRE-EPO-luc fue proporcionado por la Dra. Maribel Guerra-Vallespí.

El sustrato bioluminiscente para los ensayos *in vivo* *XenoLight D-Luciferin - Potassium Salt* se adquirió de PerkinElmer (EUA).

#### 3.2 Síntesis de Péptidos

Los péptidos utilizados en este estudio fueron proporcionados por la Dra. Maribel Vallespí, Departamento Farmacéuticos, CIGB, La Habana, Cuba. Brevemente, los péptidos fueron sintetizados en fase sólida, se determinó su pureza (mayor a 95%) por HPLC de fase reversa con un gradiente acetonitrilo/H<sub>2</sub>O – ácido tricloroacético y se confirmaron sus masas moleculares por espectrometría de masa ion-spray [30]. Los péptidos liofilizados se reconstituyeron en PBS estéril y mantuvieron a 4° C por dos meses. Para los ensayos *in vitro* las diluciones de péptidos se realizaron en RPMI.

**Tabla 3.** Secuencia aminoacídica del péptido CIGB-552, el péptido parental (LALF<sub>32-51</sub>) y sus metabolitos derivados.

<i>Péptido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Peso Molecular (g/mol)</i>
CIGB-552	Ac-HARIK $\rho$ TFRR/KWKYKGF	2686.49
LALF <sub>32-51</sub>	HYRIKPTFRR/LKWKYKGF	2736.57
5 (17aa)	IK $\rho$ TFRR/KWKYKGF	2283.06
1a (14 aa)	IK $\rho$ TFRR/KWKYK	1820.17
3 (10 aa)	IK $\rho$ TFRR/KW	1344.81

### 3.3 Líneas celulares

Las líneas celulares tumorales de origen humano son de tipo epitelial y se adquirieron de ATCC (ver Tabla 4)

**Tabla 4.** Líneas celulares utilizadas

<i>Nombre</i>	<i>Código ATCC</i>	<i>Origen</i>
NCI-H460 [H460]	HTB-177™	Carcinoma de pulmón
T-47D	HTB-133™	Carcinoma ductal de mama
HT-29	HTB-38™	Carcinoma colorrectal
HDFn	PCS-201-010™	Fibroblastos dérmicos neonatales

Todas las líneas celulares fueron cultivadas a 37° C en atmósfera húmeda controlada con 5% de CO<sub>2</sub>. Se empleó el medio RPMI 1640 GlutaMAX™ suplementado con 10% de SFB, salvo para las HDFn que se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de SFB.

Estas células crecen en adherencia, y para su mantenimiento en cultivo se utilizaron botellas de tipo T de 25, 75 y 150 cm<sup>2</sup>; se realizaron pasajes de las mismas cuando alcanzaban un 80 % de confluencia utilizando tripsina-EDTA para su disgregación.

### 3.4 Criopreservación y revitalización de líneas celulares

Una vez que las células llegaron a la fase de crecimiento exponencial, se tripsinizaron y se procedió al recuento en cámara de Neubauer. Posteriormente se centrifugaron a 250 *g* por 5 min, se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en el medio de congelación (10 % DMSO y 90 % SFB) alcanzando una concentración entre 1,5x10<sup>6</sup> y 3x10<sup>6</sup> células por mL. Los criotubos fueron almacenados a -80°C utilizando una cámara de enfriamiento progresivo de 1°C por minuto (Nalgene) y a las 24 – 48 h se transfirieron a nitrógeno líquido.

Para el descongelado de cada lote de células se retiró un criotubo del tanque de nitrógeno líquido y se lo llevó a un baño a 37 °C durante aproximadamente 2 min. Posteriormente, la suspensión celular se transfirió a un tubo cónico de 15 mL conteniendo 5 mL de medio de cultivo sin complementar previamente termostatzado a 37 °C y se centrifugó a 250 *g* por 5 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo, se realizó el recuento y se determinó la viabilidad de las células recuperadas mediante el método de exclusión con Azul de Tripán [65]. Finalmente las células fueron sembradas en los frascos de cultivos de acuerdo al número de células revitalizadas.

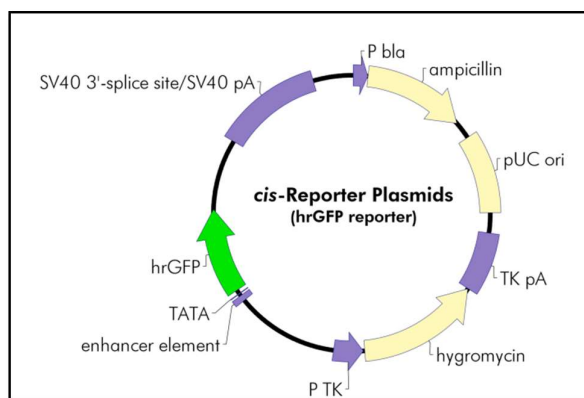
### 3.5 Ensayos de citotoxicidad: WST-1

Con el fin de evaluar la citotoxicidad del péptido CIGB-552 y el péptido parental LALF<sub>32-51</sub> se utilizó el método de sales solubles de tetrazolio (WST-1, Roche). Estas sales son reducidas por las células viables en presencia de un intermediario aceptor de electrones generando productos de formazán solubles coloreados [66]. De esta forma, se puede medir indirectamente la actividad metabólica celular determinando la absorbancia a 450 nm.

La citotoxicidad selectiva hacia líneas tumorales que presenta el péptido CIGB-552 fue demostrada previamente [31]. Para corroborar esto y compararlo con su péptido parental LALF<sub>32-51</sub> se utilizaron las líneas parentales tumorales T-47D, HT-29 y H460; y los fibroblastos dérmicos humanos neonatales (HDFn) como ejemplo de línea cuyo origen es no tumoral. Las células fueron sembradas en placa de 96 pozos ( $3 \times 10^4$  células por pozo para T-47D y HT-29,  $2 \times 10^4$  células por pozo en el caso de H460 y HDFn) y cultivadas durante 24 h a 37 °C. Posteriormente se agregaron distintas concentraciones de péptido CIGB-552 o LALF<sub>32-51</sub> en un volumen de 200 µL y tras 48 h se adicionaron 20 µL del reactivo WST-1. Se agitó la placa durante 30 segundos, se incubó entre 2 a 4 h y se midió la absorbancia a 450 nm y 650 nm (máximo de absorbancia del WST-1 y fondo de placa, respectivamente). Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill y se calculó la CI50 con el software GraphPad Prism 5.

### 3.6 Generación de las líneas celulares reporteras

Para la generación de las líneas celulares reporteras H460-NF-κB-hrGFP y T-47D-NF-κB-hrGFP se utilizó el plásmido reportero pNF-κB-hrGFP (Figura 10). Este plásmido contiene un promotor con múltiples sitios de unión al factor de transcripción NF-κB, por lo tanto la expresión del gen reportero se induce al activarse dicha vía transcripcional. La proteína hrGFP (del inglés *humanized recombinant GFP*) presenta una secuencia optimizada en el uso de codones para mejorar su expresión en células humanas. Como se observa en la Figura 10, el gen reportero se encuentra precedido por un promotor sintético, el cual contiene una secuencia de caja TATA y el sitio potenciador (*enhancer*) inducible en *cis*. Es en este sitio donde se unen los activadores *trans* (en este caso, los dímeros de NF-κB) para permitir la transcripción del gen reportero. La secuencia terminadora está dada por una señal de *splice* y de poliadenilación del virus SV40. Para la amplificación del plásmido en células bacterianas se tiene un origen de replicación bacteriano (pUC ori) y el gen de resistencia a ampicilina para su selección. Además, el plásmido presenta el gen de higromicina para su selección en células de mamífero.



**Figura 10.** Mapa del plásmido pNF- $\kappa$ B-hrGFP. Tomado de Agilent Technologies.

Se sembraron células H460 y T-47D en botellas de 25 cm<sup>2</sup> a una densidad de 5x10<sup>5</sup> y 1x10<sup>6</sup> células, respectivamente, de modo que a las 24 h alcanzaran una confluencia entre el 70 y 85 %. El reactivo Lipofectamine2000® fue utilizado para la transfección de 10 µg de ADN plasmídico. El ADN y el reactivo transfectante se diluyeron en medio OptiMEM® *Reduced Serum Medium*, se mezclaron (en una relación 1:2) e incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se renovó el medio al cultivo de células y se adicionó la mezcla ADN-lípido. Las células se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y el medio se renovó 6 h post-transfección. El proceso de selección con higromicina se inició a las 48 h luego de la transfección, renovando el medio con antibiótico tres veces por semana. Las células H460 fueron seleccionadas con 100 µg/mL de higromicina, mientras que las T-47D con 75 µg/mL. Las concentraciones de higromicina utilizadas corresponden a la concentración determinada en la línea parental en la cual el antibiótico produce la muerte de la totalidad de las células en un tiempo entre 7 y 10 días.

Las células continuaron el proceso de selección durante dos meses y posteriormente se procedió a la generación de clones. Para ello se estimularon las células resistentes con una mezcla pro-inflamatoria con 50 ng/mL de TNF- $\alpha$ , 25 ng/mL de IL-1 $\beta$  y 1 µg/mL de LPS. Tras 48 h de estimulación se tripsinizaron las células, se resuspendieron en medio de cultivo completo ajustando la concentración a 8x10<sup>6</sup> células/mL y se filtraron en tubos con tapa con filtro de nylon de 70 µm para excluir agregados celulares. Se evaluó el porcentaje de células GFP positivas y a partir de éstas se realizó un clonado por separación celular utilizando el separador de alta performance BD FACSAria™ Fusion en modo "Single Cell Deposition". Debido a la dificultad de crecimiento a partir de una única célula, consideramos necesario enriquecer el medio de cultivo en el que fueron cosechadas las células, ya que los factores de crecimiento y nutrientes aportados por las células vecinas no estarían presentes. Estas deficiencias nutricionales fueron



subsanadas suplementando el medio de cultivo con 20% de SFB y enriqueciendo el medio base con medio condicionado obtenido a partir del crecimiento de las líneas celulares *wild type* correspondientes. De esta manera, las células se colocaron individualmente en cada pozo de una placa multi-well de 96 pocillos, conteniendo 100  $\mu$ L de medio RPMI fresco:condicionado (en relación 50:50) y suplementado con 20% de SFB y 1% Penicilina/Estreptomina. Al día siguiente se adicionaron otros 100  $\mu$ L de medio por pozo y se adicionó el antibiótico de selección.

Conforme los clones crecieron se amplificaron gradualmente y posteriormente se caracterizó de forma preliminar cada uno de ellos por citometría de flujo (ver sección siguiente). Aquellos que presentaron el mayor porcentaje de células GFP positivas con el estímulo pro-inflamatorio se amplificaron y criopreservaron para una caracterización profunda.

### **3.7 Caracterización de líneas reporteras**

#### **3.7.1 Cinética de activación**

Los clones de H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP y T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP se sembraron en placas de 48 o 96 pozos, respectivamente. Luego de 24 h se renovó el medio por uno conteniendo 50 ng/mL de TNF- $\alpha$ . Las células se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> por 24, 48 y 72 h. Luego, las células se tripsinizaron y se evaluó la expresión de GFP por citometría de flujo. Para cada tiempo se comparó el porcentaje de células GFP positivas de las células estimuladas respecto a un control de células sin estimular.

#### **3.7.2 Activación de NF- $\kappa$ B con distintos estímulos pro-inflamatorios**

Los clones de H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP y T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP se sembraron en placas de 48 o 96 pozos, respectivamente. Tras 24 h se renovó el medio, se agregaron distintos estímulos pro-inflamatorios: TNF- $\alpha$  (50 ng/mL), IL-1 $\beta$  (25 ng/mL) o LPS (1  $\mu$ g/mL) y se incubaron las células a 37°C, en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. Cada condición se ensayó por triplicado. Luego de 48 h se levantaron las células con tripsina y se analizaron por citometría de flujo. Para obtener curvas de concentración-respuesta las células se estimularon con TNF- $\alpha$  en un rango de concentración de (200 - 0.024) ng/mL para los clones derivados de H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP o TNF- $\alpha$  (100 - 0.0098) ng/mL para el clon 2G4, o TNF- $\alpha$  (100 - 0.78) ng/mL para el clon 1D8. Se evaluó el porcentaje de células GFP positivas luego de 48 h de estimulación. Para graficar se consideró la media de los triplicados con la desviación estándar. Se ajustaron las curvas de acuerdo a un modelo de regresión no lineal de 3 parámetros usando el programa GraphPad Prism versión 5 (GraphPad Software, Inc., EUA). El límite de detección se calculó considerando la señal promedio correspondiente al control sin estimular más tres desvíos estándar.

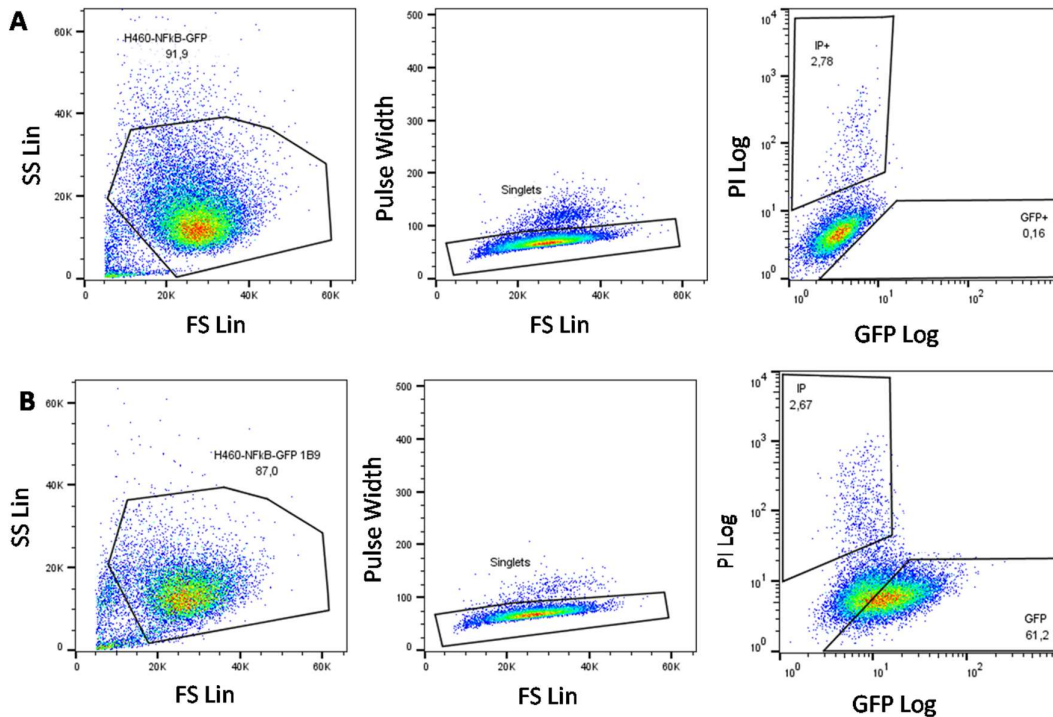
### **3.7.3 Estabilidad de las líneas reporteras**

Se verificó la estabilidad de los clones derivados de cada línea reportera con los diferentes pasajes. Los clones correspondientes al pasaje 0 (células recién descongeladas) se compararon con las células que tuvieron un repique por semana por uno o dos meses (pasaje 4 y 8, respectivamente). Las células correspondiendo a los distintos pasajes (0, 4, y 8) se sembraron en placas de 96 pocillos y se cultivaron por 16 h. El clon de H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP se estimuló con TNF- $\alpha$  (200–0.02 ng/mL) y los clones de T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP se estimularon con TNF- $\alpha$  (100–0.09 ng/mL). Finalmente, las células se analizaron por citometría de flujo luego de 48 h de estimulación. Los datos se normalizaron y se calculó la Concentración Efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de acuerdo al modelo de regresión no lineal de tres parámetros (GraphPad Prism Versión 5).

### **3.8 Análisis de activación de la vía del factor NF- $\kappa$ B por citometría de flujo**

Para los clones obtenidos de la línea H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP los ensayos se realizaron en placas de 48 pocillos sembrando  $1 \times 10^5$  células por pozo. En el caso de los clones de la línea T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP se sembraron  $4 \times 10^4$  células por pozo en placas de 96 pocillos. En los dos casos, luego de 24 h se adicionó el estímulo pro-inflamatorio junto con el tratamiento correspondiente (péptido CIGB-552 o metabolitos) y se incubaron durante 48 h a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. Como control se utilizaron células sin estímulo inflamatorio, además de los controles de cada tratamiento sin el estímulo inflamatorio. Luego se tripsinizaron y se resuspendieron en medio de cultivo para su análisis por citometría de flujo. Simultáneamente a la determinación del porcentaje de células GFP positivas, se utilizó la marcación con yoduro de propidio (IP) para determinar viabilidad celular (Figura 11). Por este motivo, se incluyeron controles de simple tinción de IP y GFP para la compensación de las señales. En todos los casos, se excitaron las muestras con el laser 488 nm y la señal de GFP e IP se detectó utilizando el filtro correspondiente.

Las adquisiciones fueron realizadas en los citómetros analíticos CyAn™ ADP (Beckman Coulter, EUA) y BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, EUA). Ambos equipos tienen dos lasers: 488 nm (azul) y 640 nm (rojo). En el CyAn™ ADP se utilizó el filtro 530/30 nm para la detección de GFP y el de 613/20 nm para detectar la señal de IP. En el caso del citómetro Accuri™ C6, se empleó el filtro 533/30 nm para la detección de GFP y el 585/40 nm para el IP. El análisis de datos se realizó en el software FlowJo Versión 10 (FlowJo, LLC, EUA).



**Figura 11.** Estrategia de secuencia de *Gating* para los ensayos reporteros de la activación de NF-κB por citometría de flujo. Se muestra un ejemplo de análisis en células H460-NF-κB-GFP 2G6 sin estimular (A) y la misma línea celular estimulada con 50 ng/mL de TNF-α (B). En el *dot plot* de Side Scatter (SS) y Forward Side (FS) se seleccionaron las células excluyendo restos celulares. Se aplicó dicha región y en el *dot plot* de FS y ancho de pulso (en inglés, *Pulse width*) se excluyeron los agregados celulares seleccionando sólo las células individuales. Por último, se analizó el porcentaje de células GFP positivas considerando únicamente las células vivas (IP negativas).

### 3.9 Determinación de IL-8 en sobrenadantes de HT-29-NF-κB-GFP

Los niveles de la interleuquina 8 (IL-8) se midieron en sobrenadantes de las células HT-29-NF-κB-GFP mediante un kit de ELISA (BioLegend's ELISA MAX™ Deluxe Set). Se trata de un ELISA (del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) tipo sandwich. Para este ensayo se procedió a realizar el mismo procedimiento que para el análisis de activación de NF-κB por citometría de flujo (sección 3.8), pero al momento de tripsinizar las células, se tomó el medio de cultivo y se alicuotó para la determinación de IL-8. Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Se tomaron sobrenadantes de dos ensayos independientes y se analizaron los niveles de IL-8 siguiendo las instrucciones del fabricante. Inicialmente se sensibilizó la placa de 96 pozos con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-8 humana incubándose a 2 – 8 °C en cámara húmeda por 16 h. Luego de esta incubación, se procedió a lavar la placa cuatro veces con buffer de

lavado y se adicionó buffer diluyente para bloquear las interacciones inespecíficas. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente con agitación en *shaker* a 200 rpm. Se volvió a lavar la placa cuatro veces con solución de lavado y se agregaron las soluciones de estándar o las muestras de sobrenadantes en los pocillos correspondientes y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con agitación. Cada muestra se analizó por triplicado y en dos diluciones distintas. Se volvió a lavar la placa, se adicionó el anticuerpo de captura: un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-8 humana biotinilado y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente se lavó la placa, se adicionó la solución de avidina-peroxidasa por 30 minutos y luego de los lavados se agregó la solución sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Se incubó durante 15 minutos en la oscuridad y luego se agregó la solución *Stop*. Finalmente, se midió la absorbancia a 450 nm en el lector de placas Multiskan EX (Thermo Scientific, USA).

Los datos de absorbancia de la curva estándar se ajustaron usando un modelo de regresión no lineal de 5 parámetros utilizando el software GraphPad Prism versión 5.

### **3.10 Animales**

El modelo utilizado para evaluar el efecto anti-inflamatorio del péptido CIGB-552 *in vivo* involucra los ratones transgénicos BALB/c-NF- $\kappa$ B-RE-luc (Taconic, USA) los cuales están disponibles en el bioterio SPF (*Specific Pathogen Free*) del Institut Pasteur Montevideo. Para los ensayos se utilizaron ratones machos y hembras de 6 a 8 semanas de edad, los cuales fueron alojados en cajas con hasta 5 animales mantenidas en racks ventilados con temperatura controlada y un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Los animales fueron marcados, pesados y rasurados en el abdomen 24 h previas al ensayo. De acuerdo a las edades y pesos, los animales se dividieron de forma aleatoria en tres grupos experimentales: Vehículo, CIGB-552 y LALF, n= (4 – 8). El protocolo utilizado (Nro. 021-14) fue aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Instituto Pasteur Montevideo de acuerdo a la normativa vigente (Ley 18611).

### **3.11 Ensayos de inflamación aguda inducida por LPS. Análisis de la activación de NF- $\kappa$ B por bioluminiscencia**

Los animales transgénicos BALB/c-NF- $\kappa$ B-RE-luc, contienen el gen de la luciferina modificado (de *Photinus pyralis*) optimizado para su expresión en células eucariotas, y que está regulado por repeticiones en tandem de sitios de unión a NF- $\kappa$ B. De esta manera, una vez que se activa la vía del factor NF- $\kappa$ B, se expresa a su vez el gen de la luciferasa permitiendo observar la actividad del factor de transcripción por la señal bioluminiscente resultante.

El péptido CIGB-552 o el péptido parental LALF<sub>32-51</sub>, se administró vía intraperitoneal en una dosis de 1 mg/kg, y al mismo tiempo se administró también por vía intraperitoneal, el estímulo inflamatorio. Se utilizó LPS de la cepa de *E. coli* O55:B5 en una dosis de 1 mg/kg. Como control se utilizó el vehículo del péptido: solución fisiológica estéril. Las inyecciones se realizaron en tandas de 3 o 4 animales respetando el orden en el que serían adquiridas las imágenes, de modo que el tiempo entre las administraciones fue de 20 minutos. Luego de 4 h de la administración de LPS, los animales fueron anestesiados en cámara de isoflurano y se les inyectó el sustrato bioluminiscente D-luciferina por vía intraperitoneal en una dosis de 150 mg/kg. Se colocaron los animales dentro del equipo Xtreme I de Bruker y 10 minutos después de la administración del sustrato bioluminiscente se adquirieron imágenes en modo *time-lapse* con una exposición de 10 segundos cada una (8 imágenes total, a intervalos de 14 segundos). Una vez adquiridas las imágenes, se tomaron muestras de sangre para determinar citoquinas circulantes, las cuales fueron recogidas en tubos con anticoagulante (EDTA tripotásico). Los animales fueron posteriormente eutanasiados por dislocación cervical y se tomaron muestras de hígado y pulmón en tubos con 1 mL de buffer de lisis. Los tejidos se disgregaron con Ultraturrax durante unos segundos, se centrifugaron a 12000g por 5 minutos, se alicuotaron los sobrenadantes y se almacenaron a -80° C hasta su análisis. Las muestras de sangre fueron centrifugadas por 10 minutos a 2300g y se almacenaron a -20° C hasta el análisis de citoquinas.

### **3.12 Análisis de imagen**

Para el análisis de imágenes se utilizó el programa de uso libre Fiji [67]. Se obtuvieron los archivos en formato *TIF* (del inglés, *Tagged Image File*) y se determinó una Región de interés en el área abdominal que fue la misma para todos los animales. Se procedió entonces a medir la media de intensidad de señal en cada región de interés, se dividió por el área de la región de interés y por el tiempo de exposición en segundos. De esta forma los valores se expresan como fotones por unidad de área por segundo (Fotones/mm<sup>2</sup>/s).

### **3.13 Determinación de actividad luciferasa en lisados de órganos**

Además de analizar la actividad luciferasa *in vivo*, se midió la actividad en los lisados de hígado y pulmón utilizando el kit Luciferase Assay Kit. Para ello se colocaron 10 µL de lisado por pozo (en duplicado) en placa de 96 pocillos negra y se agregaron 25 µL del sustrato bioluminiscente. Se midió la señal en el luminómetro LUMIstar® Omega (BMG LabTech, Alemania). Para normalizar los datos se utilizó el contenido proteico determinado por el método del ácido bicinónico (BCA). Los lisados de hígado se diluyeron 1/100 y los de pulmón 1/15 en agua destilada y se determinó la concentración de proteínas totales en los lisados siguiendo las instrucciones del

fabricante. Brevemente, se colocaron 15  $\mu\text{L}$  por pozo de la dilución de lisado o de solución estándar. Como estándar se utilizó una solución de Seroalbúmina bovina diluida en buffer de lisis (a igual proporción que el buffer presente en los lisados) generando una curva con concentración entre 1000 - 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se agregó el ácido bicinónico (120  $\mu\text{L}/\text{pozo}$ ) y se incubó a 37<sup>o</sup> C por 30 minutos. Luego de ese tiempo se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Multiskan EX (Thermo Scientific, USA) y se calculó la concentración de proteína en las muestras interpolando los valores de absorbancia en la curva estándar. Los resultados del luminómetro se obtienen en Unidades Relativas de Luminiscencia (URL), por lo que se expresaron los valores como URLs/ $\mu\text{g}$  de proteínas para cada muestra de lisado.

### **3.14 Determinación de citoquinas por citometría de flujo**

La determinación de citoquinas inflamatorias en plasma se realizó empleando un kit comercial LegendPlex *Mouse Inflammation panel* (Biolegend, USA) en el que se emplean perlas de dos tamaños diferentes. Cada set tiene un tamaño único que se identifica en el citómetro mediante un *dot plot* empleando los parámetros Forward scatter (FSC) y Side scatter (SSC). Dentro de cada set de perlas se distinguen los distintos analitos de acuerdo a la intensidad de fluorescencia interna. Dicha intensidad se detectó midiendo en el canal FL4 (675/25 nm, APC) del citómetro BD Accuri C6. Las perlas más pequeñas (llamadas perlas “A”) están compuestas por 6 poblaciones de perlas según el canal FL4, mientras que las perlas más grandes (perlas “B”) se dividen en 7 poblaciones. Con el conjunto de perlas A y B se logra detectar simultáneamente 13 citoquinas en cada muestra de plasma. Cada analito tiene asignada una población de perlas.

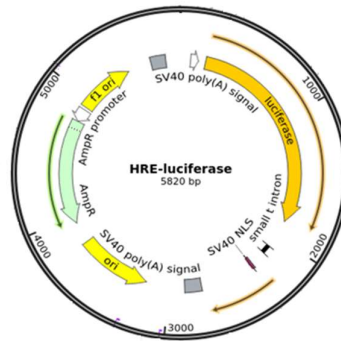
En el ensayo se empleó una placa de 96 pocillos con fondo en V y se siguieron las instrucciones del fabricante. Todas las muestras de plasma se diluyeron al medio en “Assay Buffer” y las siguientes diluciones se hicieron en “Matrix C” tal como lo indican las instrucciones del fabricante. Todas las condiciones, tanto las muestras como los estándares se ensayaron por duplicado. La adquisición de las muestras se realizó en el citómetro BD Accuri C6 colectándose 4000 perlas totales (A + B) por muestra. Se analizaron los datos empleando el software incluido en el kit LEGENDplex™ Data Analysis Software.

Para el análisis de datos, nos focalizamos en las citoquinas de respuesta aguda IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  para evaluar el perfil inflamatorio de los distintos grupos de animales.

### **3.15 Análisis de activación de la vía del factor inducible por hipoxia HIF-1**

Se utilizó un plásmido reportero para evaluar los efectos del péptido CIGB-552 en la vía del factor inducible por hipoxia HIF-1. Este plásmido contiene como reportero al gen de la luciferasa regulado bajo el promotor de la Eritropoyetina (EPO), la cual es transcrita al activarse el factor

HIF-1 bajo condiciones de hipoxia. El antibiótico de selección para células de mamífero es geneticina.



**Figura 12.** Mapa del plásmido HRE-EPO-luc. Tomado de Addgene.

Se plaquearon  $5 \times 10^4$  células H460 por pozo en placa de 24 pocillos y al día siguiente se procedió con la transfección transitoria. Se agregaron 0.5  $\mu\text{g}$  de plásmido y se utilizó el reactivo transfectante Lipofectamina 2000 en una relación 1:2. Las diluciones de plásmido y lipofectamina se hicieron en OptiMEM® *Reduced Serum Medium*, se mezclaron e incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó la mezcla ADN-lípido a todos los pozos y las células se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ . Luego de 5 h se procedió a renovar el medio suplementado con 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de geneticina y se agregaron los tratamientos con el péptido CIGB-552 a concentraciones de 25 y 12.5  $\mu\text{M}$  y se incubó durante 3 h. Se utilizó Deferoxamina (150 $\mu\text{M}$ ) como agente mimético de hipoxia, la cual se adicionó a los pozos (sin renovación de medio) y se incubó por 16 h. Luego se removió el medio, se lavaron los pozos con PBS y se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis a cada pozo. Se incubó la placa en agitación por 15 minutos y los lisados se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

La detección de la señal luminiscente se realizó añadiendo 10  $\mu\text{L}$  de lisado en una placa de 96 pozos negra, y se agregó 25  $\mu\text{L}$  del reactivo de luciferasa del kit Luciferase Assay System. Todas las condiciones se ensayaron por duplicado. Para normalizar los datos, se realizó la determinación de proteínas totales por el método del ácido bicinonínico. Las muestras se diluyeron al 1:2 y se determinó la concentración de proteínas totales en los lisados siguiendo las instrucciones del kit. Brevemente, se colocaron 15  $\mu\text{L}$  por pozo de la dilución de lisado o de solución estándar. Como estándar se utilizó una solución de Seroalbúmina bovina diluida en buffer de lisis, generando una curva con concentración entre 1000-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se agregó el ácido bicinonínico (120  $\mu\text{L}/\text{pozo}$ ) y se incubó a 37° C por 30 minutos. Luego de ese tiempo se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Multiskan EX (Thermo Scientific, USA) y se

calculó la concentración de proteína en las muestras interpolando los valores de absorbancia en la curva estándar. Los resultados del luminómetro se obtienen en Unidades Relativas de Luminiscencia (URL), por lo que se expresaron los valores como URLs/ $\mu$ g de proteínas para cada muestra de lisado.

### **3.16 Análisis estadístico**

Los datos de fluorescencia obtenidos mediante citometría de flujo se expresan como el porcentaje de células GFP positivas, indicando la media  $\pm$  el desvío estándar (SD). En todos los casos se muestra un ensayo representativo el cual fue repetido al menos dos o tres veces de forma independiente. En cada ensayo las diferentes condiciones experimentales fueron realizadas por triplicado, salvo aquellos casos que se especifique de otra forma. Para las comparaciones entre más de dos grupos se utilizó un ANOVA de una vía. En todos los casos se consideró un valor  $p < 0,05$  para determinar diferencias estadísticamente significativas. Se utilizó el software GraphPad Prism versión 5.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Determinación de la CI50 del CIGB-552 y comparación con el péptido parental LALF<sub>32-51</sub>

Con el fin de determinar concentraciones de trabajo para los ensayos reporteros *in vitro*, se procedió a determinar el valor de CI50 del péptido CIGB-552 en la línea T-47D mediante la técnica de WST-1. Los valores de CI50 del CIGB-552 para HT-29 y H460 ya han sido reportados previamente [31], [68]. Para todos los casos se utilizaron curvas con concentraciones crecientes de péptido (6 a 8 puntos). Asimismo, se compararon los valores obtenidos para el CIGB-552 con los del péptido parental LALF<sub>32-51</sub>, el cual es un péptido antimicrobiano no optimizado para un efecto anti-tumoral. Por otro lado, se agregó una línea celular humana no tumoral como control.

Los valores de CI50 para las distintas líneas se muestran en la Tabla 5. La capacidad citotóxica del péptido CIGB-552 es mayor comparada con la del péptido parental en todas las líneas tumorales ensayadas. Por su parte, en la línea HDFn (no tumoral) el valor de CI50 es superior que el reportado para líneas celulares tumorales, lo que demuestra la citotoxicidad selectiva hacia células cancerosas.

**Tabla 5. Citotoxicidad de los Péptidos CIGB-552 y LALF<sub>32-51</sub> en distintas líneas celulares**

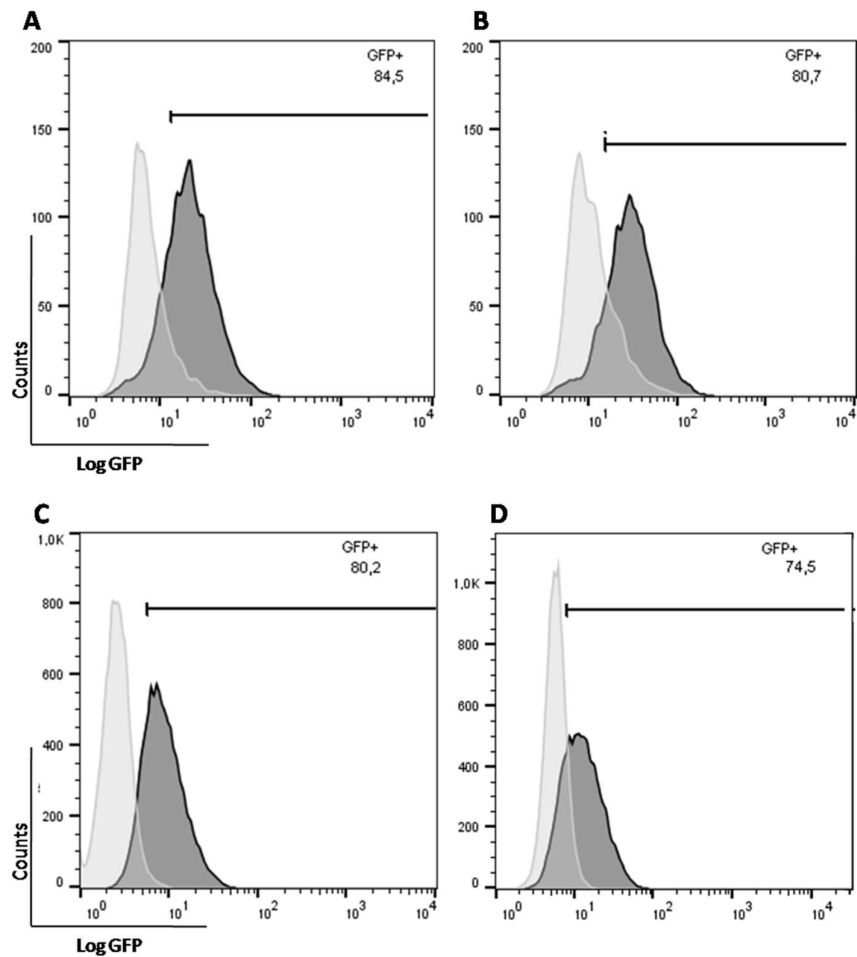
Línea Celular	CI50 (μM) CIGB-552	CI50 (μM) LALF <sub>32-51</sub>
H460	23 ± 8*	460 ± 25
HT-29	166 ± 66*	549 ± 25
T-47D	130 ± 66	>1000
HDFn	1070 ± 257	>1500

Datos expresados como CI50 ± SD. \* Tomado de Fernandez Massó *et al.*, 2013 (reactivo empleado para la determinación de citotoxicidad: Sulforodamina B) y Astrada *et al.*, 2016 respectivamente.

### 4.2 Generación de las líneas celulares reporteras

En nuestro laboratorio se generaron previamente líneas reporteras de NF-κB derivadas de epitelio intestinal [63]. Con el objetivo de generar dos nuevas líneas celulares reporteras para la activación del factor NF-κB de diferente origen tumoral (pulmón y mama), se transfectaron establemente las líneas H460 y T-47D. Para la transfección estable se utilizó el plásmido reportero pNF-κB-hrGFP y el reactivo transfectante Lipofectamine2000®. Luego de la

transfección las células fueron sometidas a un proceso de selección con higromicina B, y una vez finalizado este proceso se estimularon con una mezcla pro-inflamatoria por 48 h. Aquellas células GFP positivas (GFP<sup>+</sup>) que se obtuvieron fueron aisladas por un Separador Celular FACS Aria™ Fusion y se generaron clones por deposición de una única célula por pocillo en placa de 96. Los clones aislados se amplificaron, y se evaluó su capacidad de respuesta frente a una estimulación con TNF- $\alpha$ . Aquellos clones que luego del estímulo presentaron la mayor activación (evaluado como mayor porcentaje de células GFP<sup>+</sup>) y la menor señal en condiciones basales (sin TNF- $\alpha$ ) fueron seleccionados para una caracterización más exhaustiva. Para la línea celular H460 se eligieron los clones H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G6 y 1B9 y para la línea T-47D se obtuvieron dos clones con buena respuesta: T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 1D8 y 2G6. En la Figura 13 se observa el histograma correspondiente cada uno de los clones seleccionados.



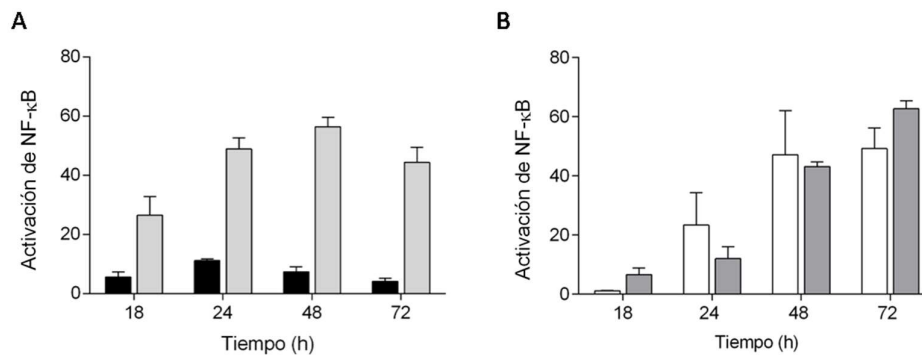
**Figura 13.** Estimulación de los clones T-47D-NF-κB-hrGFP 1D8 (A), T-47D-NF-κB-hrGFP 2G4 (B), H460-NF-κB-hrGFP 2G6 (C) y H460-NF-κB-hrGFP 1B9 (D) con TNF-α. Se evaluó la expresión de la proteína GFP en células estimuladas con 50 ng/mL de TNF-α por 48 h. Se identificó la población de células en un *dot plot* de FSC vs SSC y se representó como histograma de GFP. En cada gráfico se muestra la superposición de la población de células no estimuladas (gris claro) con la población de células estimuladas (gris oscuro) para una muestra representativa de cada clon. La barra indica el porcentaje de células GFP positivas.

### 4.3 Caracterización de las líneas celulares reporteras

Una vez elegidos los mejores clones, se procedió a caracterizar su respuesta de acuerdo a la cinética de activación, la capacidad de activarse con distintos estímulos pro-inflamatorios y la estabilidad de la respuesta a lo largo de los diferentes pasajes en cultivo.

### 4.3.1 Cinética de activación

Se evaluó la respuesta de los clones reporteros estimulándolos con 50 ng/mL de TNF- $\alpha$  a diferentes tiempos (de 24 a 96 h). Para todos los clones, excepto el H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 1B9 se observa un aumento del porcentaje de células GFP<sup>+</sup> con el tiempo (Figura 14). A su vez, el clon H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G6 presentó una rápida activación de NF- $\kappa$ B, haciendo posible la detección de GFP tras 24 h de estimulación. Comparando los valores de activación del clon 2G6 a distintos tiempos, no existen diferencias significativas (ANOVA de una vía,  $p < 0.05$ ) entre el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> obtenido luego de 24, 48 y 72 h de estimulación, por lo que el máximo de activación se obtiene a las 24 h y se mantiene hasta las 72 h. Por el contrario, el clon 1B9 perdió su capacidad de activación con los pasajes, por lo que se decidió proseguir la caracterización con el clon H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G6 que mantuvo su respuesta. Para los clones derivados de la línea T-47D se obtuvo una cinética más lenta que la del H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G6. Se observó un máximo de activación a las 48 h para el clon T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 1D8 que se mantuvo hasta las 72 h, mientras que para el clon T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G4 el máximo de activación se dio a las 72 h (ANOVA de una vía,  $p < 0.05$ ).

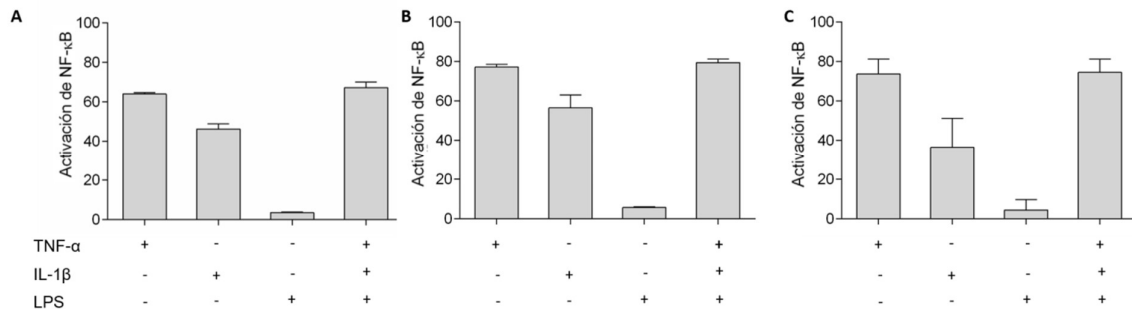


**Figura 14.** Cinética de activación de NF- $\kappa$ B para los distintos clones. Los clones (A) H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 1B9 (en negro) y 2G6 (en gris claro), y (B) T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 1D8 (en blanco) y 2G4 (en gris oscuro) fueron estimulados con 50 ng/mL de TNF- $\alpha$ . Se evaluó el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> (activación de NF- $\kappa$ B) por citometría de flujo a distintos tiempos. Para cada tiempo se calculó el porcentaje de activación como el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> de los pozos estimulados menos el valor de GFP<sup>+</sup> de los controles sin estimular. Se muestran los datos de un experimento representativo, y se expresan como la Media  $\pm$  SD de los triplicados.

### 4.3.2 Activación de NF- $\kappa$ B frente a distintos estímulos pro-inflamatorios

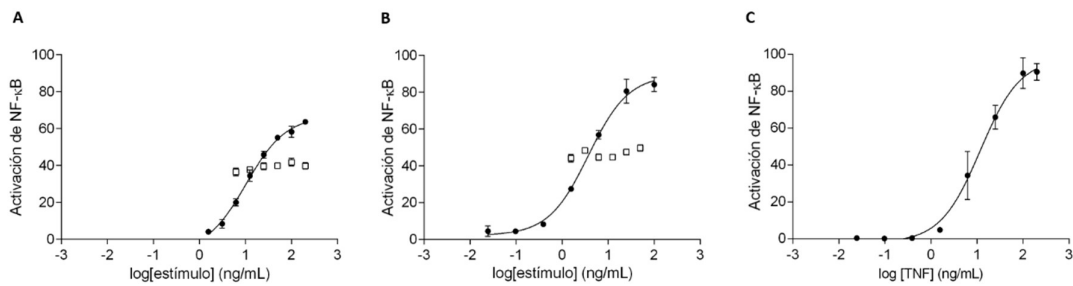
Una vez determinado el tiempo para realizar el ensayo de activación, se prosiguió con la caracterización de la respuesta de las líneas reporteras frente a distintos estímulos capaces de activar el factor NF- $\kappa$ B: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y LPS.

Para los clones derivados de la línea T-47D tanto TNF- $\alpha$  como IL-1 $\beta$  lograron activar NF- $\kappa$ B con buenos niveles de expresión del gen reportero (Figura 15). En el caso del clon H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G6 se obtuvo la mayor expresión de GFP con el estímulo TNF- $\alpha$ . También presentó activación con el estímulo de IL-1 $\beta$ , aunque la activación fue menor que la obtenida con los clones T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP. Por su parte el tratamiento con LPS no fue capaz de inducir la expresión de GFP en ninguno de los clones evaluados.



**Figura 15.** Activación de los clones T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 1D8 (A), T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G4 (B) y H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G6 (C) con distintos estímulos. Los clones fueron estimulados con 50 ng/mL de TNF- $\alpha$ , 25 ng/mL de IL-1 $\beta$  y/o 1  $\mu$ g/mL de LPS por 48 h. La expresión de GFP se midió por citometría de flujo. Se representan los datos como la Media  $\pm$  SD de los triplicados de un experimento representativo.

Por otra parte, se decidió estudiar si la respuesta de las líneas reporteras era concentración dependiente. Para ello, se realizaron curvas de concentración respuesta para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Como se observa en la Figura 16, todos los clones mostraron una respuesta dependiente de la concentración cuando fueron estimulados con TNF- $\alpha$ : de 100 – 0.02 ng/mL para los clones T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G4 y H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G6, y de 100 – 0.78 ng/mL para el clon T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 1D8. El clon H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP, si bien inicialmente respondió a IL-1 $\beta$ , fue perdiendo su capacidad de respuesta con los sucesivos pasajes (datos no mostrados). Para los clones derivados de la línea T-47D el tratamiento con IL-1 $\beta$  (1.5 – 50 ng/mL) generó una respuesta constante e independiente de la concentración utilizada.



**Figura 16.** Curvas concentración-respuesta de los clones T-47D-NF-κB-hrGFP 1D8 (A), y T-47D-NF-κB-hrGFP 2G4 (B) y H460-NF-κB-hrGFP 2G6 (C). Las células fueron estimuladas durante 48 h con distintas concentraciones de TNF-α (●) o IL-1β (□) y se evaluó el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> por citometría de flujo. Se graficaron las medias ± SD de los triplicados de un ensayo representativo.

Dado que el perfil de la respuesta de los clones T-47D-NF-κB-hrGFP 2G4 y 1D8 estimulados con IL-1β es independiente de la concentración, no fue posible calcular parámetros de concentración efectiva 50 ni rango lineal. Para la estimulación con TNF-α, que produce una respuesta concentración-dependiente, se calcularon los valores de CE50, límite de detección y rango lineal (ver Tabla 6). Se utilizó un modelo de regresión no lineal de tres parámetros para el ajuste de los datos, para el cálculo de los valores de CE50 y rango lineal.

**Tabla 6.** CE50, límite de detección y rango lineal calculado para las tres líneas reporteras.

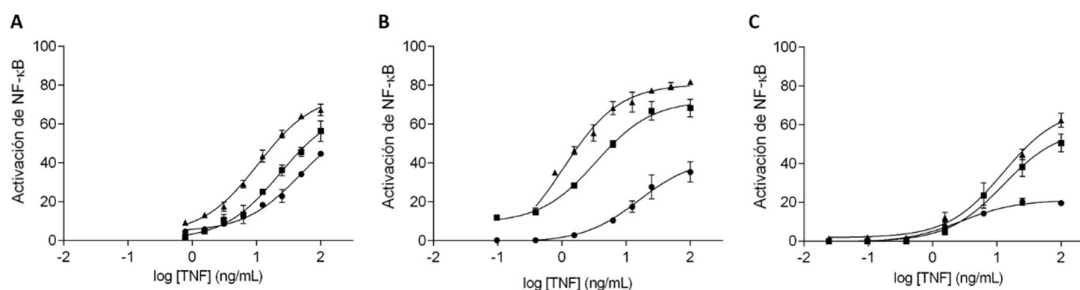
	<i>T-47D-NFκB-hrGFP</i>		<i>H460-NFκB-hrGFP</i>
	Clon 1D8	Clon 2G4	Clon 2G6
CE50 (ng/mL)	10.25 (8.34 - 12.61)	3.75 (3.02 - 4.66)	17.43 (9.17 - 33.25)
Límite de detección (ng/mL)	1.58	2.74	1.20
Rango Lineal (ng/mL)	1.83 - 59.70	0.28 - 75.86	0.87 - 134.59

Los clones fueron sembrados en placas *multiwell* y estimulados con distintas concentraciones de TNF-α por 48 h. Se midió la expresión de GFP por citometría de flujo. Entre paréntesis se reportan los intervalos de confianza del 95% para el CE50.

#### 4.3.3 Estabilidad de las líneas reporteras

El trabajo con líneas celulares reporteras establemente transfectadas requiere que se determine el número de pasajes en los cuales la respuesta es estable. Para evaluar la respuesta de los clones en el tiempo se realizaron curvas concentración-respuesta de TNF-α para los tres clones a

distintos pasajes (Figura 17). Se consideraron tres números de pasaje: células recién descongeladas (pasaje 0), células con un pasaje semanal durante cuatro semanas (pasaje 4) y células que tuvieron un pasaje semanal durante 8 semanas (pasaje 8). Se incubaron los clones correspondientes a cada número de pasaje con distintas concentraciones de TNF- $\alpha$  por 48 h y una vez obtenidas las curvas concentración-respuesta se calcularon los valores de CE50 (Tabla 7).



**Figura 17.** Estabilidad de las líneas reporteras T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 1D8 (A), y T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G4 (B) y H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G6 (C) con el número de pasaje. Células correspondientes al pasaje 0 (▲), 4 (■) y 8 (●) fueron estimuladas durante 48 h con distintas concentraciones de TNF- $\alpha$  y se evaluó la activación de NF- $\kappa$ B por citometría de flujo. Se grafican las medias  $\pm$  SD de los triplicados de un experimento representativo. Se utilizó un ajuste según un modelo regresión no lineal de tres parámetros con el software GraphPad Prism.

**Tabla 7. Estabilidad de las líneas celulares reporteras con el número de pasaje**

Número de pasaje	<i>T-47D-NFκB-hrGFP</i>		<i>H460-NFκB-hrGFP</i>
	Clon 1D8	Clon 2G4	Clon 2G6
0	10.73 (8.69 – 13.24)	1.07 (0.76 – 1.50)	11.49 (8.16 – 16.20)
4	23.10 (16.68 – 32.00)	3.42 (2.57 – 4.56)	9.25 (4.78 – 13.40)
8	47.84 (34.78 – 65.80)	15.78 (9.76 – 25.50)	2.76 (1.88 – 4.04)

Los clones correspondientes a distintos números de pasaje fueron sembrados en placas y estimulados con distintas concentraciones de TNF- $\alpha$  por 48 h. Se midió la expresión de GFP por citometría de flujo y se calculó el CE50 (ng/mL) para cada tiempo. Entre paréntesis se reportan los intervalos de confianza del 95%.

Las curvas concentración-respuesta no variaron entre el pasaje 0 y el 4 para el clon H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G6 (Figura 17). Si bien el valor de CE50 a pasaje 8 disminuye, la activación de NF- $\kappa$ B fue inferior y no alcanzó los niveles de saturación obtenidos en los pasajes anteriores.

En el caso de los clones derivados de la línea T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP, los valores de CE50 aumentan con el número de pasaje, sin embargo la sensibilidad del clon T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G4 es superior a la del clon 1D8. Aún a pasaje 8 la respuesta de la línea T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G4 es comparable a la respuesta del clon T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 1D8 a pasaje 0.

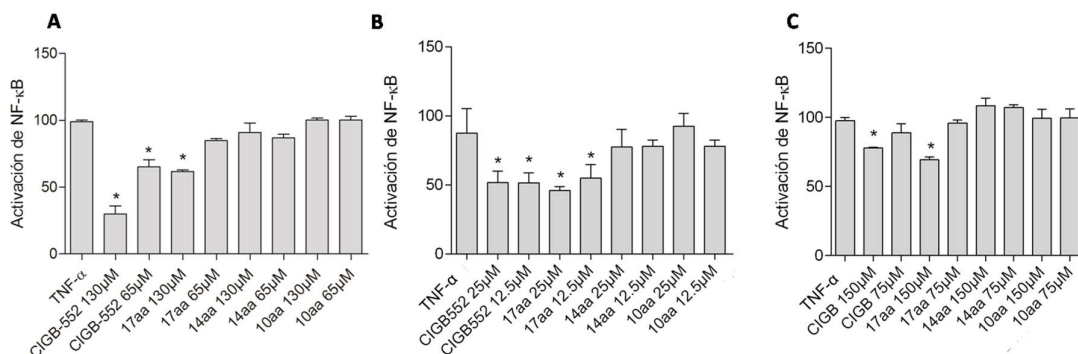
#### **4.4 Evaluación de los efectos del péptido CIGB-552 y sus metabolitos en las líneas celulares reporteras para NF- $\kappa$ B**

Una vez generadas y caracterizadas las líneas celulares reporteras: H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G6, T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 1D8 y 2G4 se procedió a estudiar el efecto del péptido CIGB-552 y sus metabolitos sobre la activación de NF- $\kappa$ B mediada por la citoquina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  en las tres líneas tumorales reporteras de diferente origen (T-47D, H460, HT-29).

Para cada ensayo, se sembraron las células en placas de 48 o 96 pocillos por 16 h y se agregó el tratamiento del péptido o metabolito correspondiente junto con el estímulo pro-inflamatorio. Las concentraciones seleccionadas de péptido corresponden a la CI50 y la mitad de la CI50 del péptido para cada línea parental. Por otro lado, la concentración de estímulo utilizada para cada clon fue el valor de CE50 calculado anteriormente, de acuerdo al pasaje de cada uno (Tabla 7). Luego de 48 h se evaluó la activación de NF- $\kappa$ B por citometría de flujo.

Como se observa en la Figura 18, tanto el tratamiento con el péptido como el metabolito de 17 aminoácidos son capaces de inhibir la activación de NF- $\kappa$ B generada por el tratamiento con TNF- $\alpha$ . Sin embargo, el grado de modulación parece ser dependiente de la línea celular.

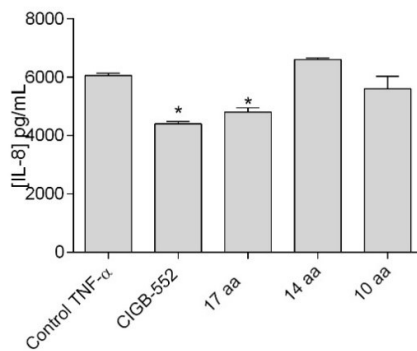




**Figura 18.** Evaluación del efecto del CIGB-552 y sus metabolitos sobre la activación de NF-κB mediada por TNF-α. Las líneas reporteras T-47D-NF-κB-hrGFP 2G4 (A), H460-NF-κB-hrGFP 2G6 (B) y HT-29-NF-κB-hrGFP E5 (C) fueron estimuladas durante 48 h con TNF-α y tratadas con el péptido o sus metabolitos derivados. Se evaluó la activación de NF-κB por citometría de flujo y para cada condición se sustrajo el valor de activación de los controles sin estimular. Se normalizaron los valores de % GFP+ tomando el valor de la activación con TNF-α como 100% de activación. Se grafican las medias ± SD de los triplicados de un experimento representativo. (\*ANOVA de una vía, p<0.05)

#### 4.4.1 Determinación de IL-8 en sobrenadantes de cultivo de células HT-29-NF-κB-hrGFP

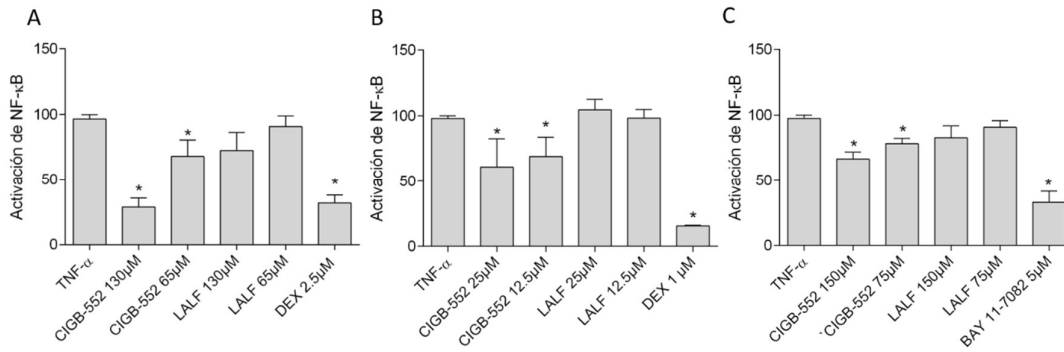
La capacidad del péptido CIGB-552 para disminuir la producción de IL-8 por parte de las células HT-29-NF-κB-hrGFP ya fue reportada [45]. Dado que el metabolito de 17 aminoácidos es capaz de inhibir la respuesta de NF-κB inducida por TNF-α, nos propusimos evaluar si los metabolitos derivados del CIGB-552 también logran atenuar la producción de IL-8 en células HT-29-NF-κB-hrGFP estimuladas con TNF-α.



**Figura 19.** Determinación de la producción de IL-8 inducida por TNF- $\alpha$  en sobrenadantes de HT-29-NF- $\kappa$ B-hrGFP. Las células HT-29-NF- $\kappa$ B-hrGFP E5 fueron tratadas con el péptido o sus metabolitos (150  $\mu$ M) y estimuladas con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$ . Luego de 24 h se recogieron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-8 mediante ELISA específico. Se grafican las medias  $\pm$  SD de los triplicados. (\*ANOVA de una vía,  $p < 0.05$ )

De los metabolitos derivados del péptido CIGB-552, sólo el metabolito de 17 aminoácidos fue capaz de atenuar la producción de IL-8 luego de la estimulación con TNF- $\alpha$ , y en niveles similares a los que produce el péptido completo.

Por otra parte, con el objetivo de evaluar si la inhibición del factor NF- $\kappa$ B podría estar implicada en la actividad citotóxica del péptido CIGB-552 en las líneas celulares estudiadas, se comparó con el efecto producido por el péptido parental LALF<sub>32-51</sub>. Para ello se empleó el mismo ensayo reportero que para la evaluación de los metabolitos. Asimismo, se incorporó un control interno del ensayo reportero agregando un tratamiento con dexametasona. La dexametasona, agonista de los receptores de glucocorticoides, es un potente anti-inflamatorio cuya acción está mediada al menos en parte por la inhibición de la vía del factor NF- $\kappa$ B. De esta forma, se incorpora un control que permite validar la respuesta de las líneas reporteras. Dado que la línea HT-29 es deficiente en receptores de glucocorticoides se incorporó un inhibidor sintético de la vía de NF- $\kappa$ B BAY 11-7082 para tener un control interno en el ensayo efectuado con la línea reportera HT-29-NF- $\kappa$ B-hrGFP E5.



**Figura 20.** Evaluación del efecto de los péptidos CIGB-552 y LALF<sub>32-51</sub> sobre la activación del factor NF-κB. Las líneas reporteras T-47D-NF-κB-hrGFP 2G4 (A), H460-NF-κB-hrGFP 2G6 (B) y HT-29-NF-κB-hrGFP E5 (C) fueron estimuladas durante 48 h con TNF-α y tratadas con el péptido CIGB-552, LALF<sub>32-51</sub> o un inhibidor de la vía de NF-κB. Se evaluó la activación de NF-κB por citometría de flujo y para cada condición se sustrajo el valor de activación de los controles sin estimular. Se normalizaron los valores de % GFP<sup>+</sup> tomando la activación con TNF-α como 100% de activación. Se grafican las medias ± SD de los triplicados de un experimento representativo. (\*ANOVA de una vía, p<0.05)

En todos los casos, el péptido parental LALF<sub>32-51</sub> no fue capaz de inhibir la activación de NF-κB inducida por TNF-α. Los resultados obtenidos en las líneas reporteras evaluadas muestran que el péptido parental LALF<sub>32-51</sub> no es capaz de inhibir la activación del factor NF-κB mediada por TNF-α. Tomando en consideración la CI50 de ambos péptidos en las líneas celulares de cáncer evaluadas (Tabla 5), validamos que el efecto citotóxico del CIGB-552 está mediado, al menos en parte, por el mecanismo de inhibición del factor NF-κB.

Por otro lado, con el uso de los inhibidores de NF-κB: Dexametasona y BAY 11-7082, se observó la disminución significativa del porcentaje de células GFP<sup>+</sup> respecto al control de células estimuladas con TNF-α. De esta forma validamos el ensayo reportero para la evaluación de la modulación del NF-κB con estas líneas de cáncer estimuladas con TNF-α.

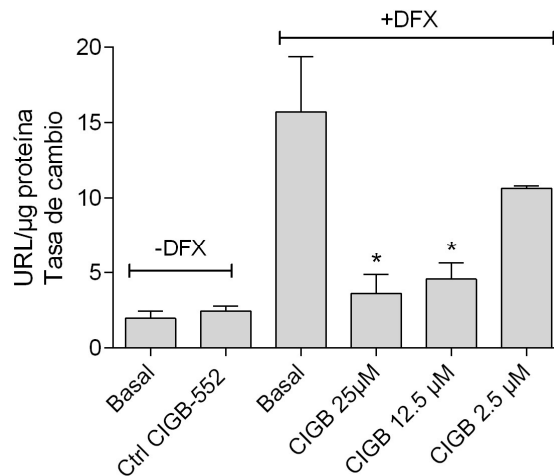
#### 4.5 Evaluación de los efectos del péptido CIGB-552 en la vía de HIF-1

Además de contribuir con la terminación de la respuesta de NF-κB, COMMD1 también está involucrada en la inhibición de la vía del factor inducible por hipoxia HIF-1 [50]. Al igual que ocurre con la vía del factor NF-κB, la vía del factor inducible por hipoxia resulta un blanco molecular interesante para las terapias anti-cáncer [48], [69]. Dentro de los genes cuya expresión se induce por la activación de HIF-1 se encuentran genes relacionados a la

angiogénesis, proliferación celular, metabolismo glucídico, remodelación de la matriz extracelular, entre otros [48].

Utilizando un sistema reportero para la activación del factor HIF-1 denominado EPO-luc, nos propusimos evaluar el efecto del péptido CIGB-552 sobre la vía de HIF-1.

El gen reportero fue, en este caso, el de la luciferasa y en lugar de generar líneas establemente transfectadas se realizaron transfecciones transitorias con el reactivo transfectante Lipofectamina2000®. Para este ensayo se eligió la línea H460 por tratarse de la línea más sensible a la acción del CIGB-552 (CI50 25  $\mu$ M). Tres horas después de comenzado el tratamiento con el péptido, se adicionó el agente mimético de hipoxia deferoxamina (DFX) y se continuó la incubación 16 h. Posteriormente se lisaron las células, se midió la actividad luciferasa con el Luciferase Assay System y se normalizaron los datos de cada lisado de acuerdo a su contenido proteico. Como se observa en la Figura 21, el péptido CIGB-552 logra disminuir la activación de HIF-1 inducida por hipoxia.



**Figura 21.** Evaluación del efecto del péptido CIGB-552 en la activación de HIF-1 inducida por DFX. Las células H460 fueron transfectadas con el plásmido reportero pEPO-luc y tratadas con el péptido CIGB-552 durante 3 h. Las células se incubaron con el agente mimético de hipoxia DFX (150 $\mu$ M) por 16 h y se determinó la actividad de HIF-1 a través de la actividad luciferasa de los lisados celulares en un luminómetro. Los valores se normalizaron por el contenido proteico de los lisados. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SD de los duplicados de un experimento representativo. (\*ANOVA de una vía  $p < 0.05$ )

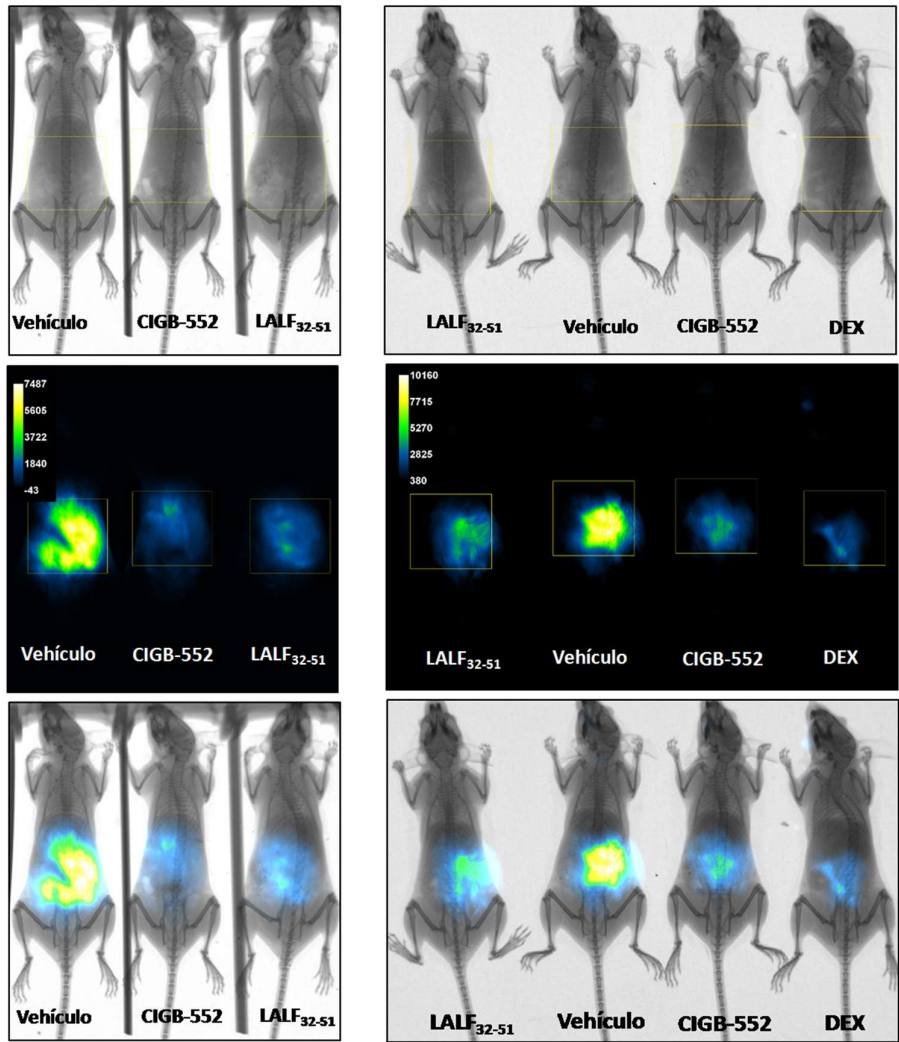
#### **4.6 Evaluación de los efectos del péptido CIGB-552 en el modelo reportero de ratones transgénicos NF-κB-RE-luc**

Una vez que determinamos que el péptido CIGB-552 es capaz de inhibir la respuesta de NF-κB mediada por TNF-α en las líneas tumorales reporteras, nos propusimos estudiar si el péptido CIGB-552 es capaz de inhibir el factor NF-κB y limitar la inflamación en un modelo *in vivo* de inflamación aguda por administración de LPS. Además se comparó el efecto del CIGB-552 con el péptido parental LALF<sub>32-51</sub>.

Para ello se utilizaron ratones BALB/c transgénicos NF-κB-luc. Estos animales presentan el gen de la luciferasa regulado por un promotor con múltiples elementos de respuesta a NF-κB, por lo que la activación de NF-κB puede ser monitoreada en el animal entero mediante el equipo de *In vivo Imaging*. En el modelo de inflamación aguda elegido utilizamos una inyección de 1 mg/kg de LPS de *E.coli* O55:B5 para la generación de la respuesta inflamatoria, la cual se administró de manera concomitante con el tratamiento evaluado: control con vehículo (PBS), CIGB-552 (1 mg/kg) o LALF<sub>32-51</sub> (1 mg/kg).

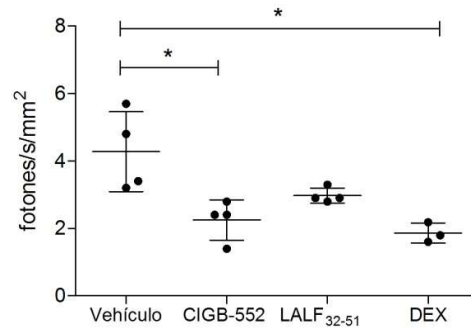
##### **4.6.1 Análisis del efecto del CIGB-552 sobre la activación de NF-κB *in vivo***

Para el análisis de la inhibición del factor NF-κB *in vivo*, se utilizó el equipo de *In vivo Imaging Xtreme* (Bruker, EUA). A las cuatro horas de la inyección del estímulo inflamatorio y el tratamiento con el péptido correspondiente, los animales fueron anestesiados con isoflurano y se les inyectó 150 mg/kg del sustrato D-luciferina por vía intraperitoneal, de modo de inducir el desarrollo de la señal bioluminiscente. Luego de 10 minutos de inyectado el sustrato los animales se dispusieron en el equipo *In vivo Xtreme* y se tomaron imágenes de bioluminiscencia y de rayos X. Dado que el equipo permite tomar imágenes consecutivas cada 14 segundos, se adquirieron 8 imágenes por animal, y se eligió aquella donde la señal fuese máxima.



**Figura 22.** Imagen representativa de las adquisiciones de Rayos X y de la señal bioluminiscente proveniente de los ratones transgénicos NF- $\kappa$ B-RE-luc. Los animales recibieron el tratamiento (CIGB-552 o LALF<sub>32-51</sub>) junto con 1 mg/kg de LPS. Luego de 4 h se inyectó 150 mg/kg de D-luciferina y se adquirieron imágenes de luminiscencia y de Rayos X. Como control interno, un grupo de animales recibió 4 mg/kg de Dexametasona (DEX) una hora previa a la administración de LPS. Se muestran dos imágenes representativas de dos ensayos independientes. En amarillo se observa la Región de Interés consideradas.

Con el fin de cuantificar la señal bioluminiscente adquirida se utilizó el programa Fiji [67]. En cada imagen, se consideró una región de interés en la zona abdominal de cada animal y se cuantificó la intensidad de señal en dichas regiones (ver Figura 22). Para normalizar se dividieron los valores de fotones por segundo por el área de cada región de interés. En la Figura 23 se graficaron los valores de fotones por segundo por área para un ensayo representativo. El tratamiento con el péptido CIGB-552 provocó una menor activación de NF- $\kappa$ B que el control tratado con solución salina (vehículo). El efecto, incluso es comparable con el producido por el anti-inflamatorio Dexametasona. Si bien hay una tendencia a una menor activación de NF- $\kappa$ B en el grupo tratado con LALF<sub>32-51</sub>, no se detectaron diferencias significativas con el grupo control.

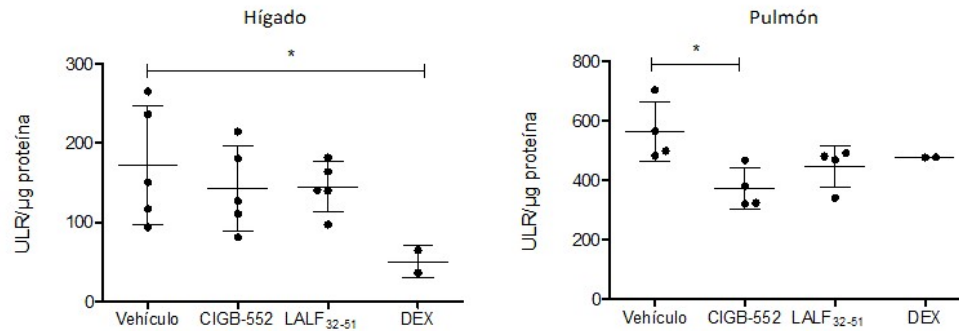


**Figura 23.** Evaluación de los efectos del péptido CIGB-552 sobre el factor NF- $\kappa$ B *in vivo*. Los animales (N=16) recibieron 1 mg/kg de CIGB-552 o LALF<sub>32-51</sub> junto con 1 mg/kg de LPS. Un grupo de animales recibió 4 mg/kg de Dexametasona (DEX) una hora previa al desafío con LPS. Luego de 4 h se inyectó 150 mg/kg de D-luciferina y se midió la señal bioluminiscente por imagenología. Se reporta la cuantificación de la señal bioluminiscente de un experimento representativo como la media  $\pm$  SD (n=4). \*ANOVA de una vía, p<0.05.

Por otro lado, además de la adquisición de imágenes en el animal entero, se extrajeron los órganos hígado y pulmón en tubos conteniendo buffer de lisis. Se disgregaron los tejidos con Ultraturax y se analizó la actividad luciferasa de los lisados empleando el kit *Luciferase Assay System* y posterior medida en luminómetro. Para normalizar los datos de Unidades Relativas de Luminiscencia (URL) se determinó el contenido proteico de los lisados y se expresaron los valores como URL por  $\mu$ g de proteína.

Los resultados obtenidos en los lisados de pulmón se correlacionan con los obtenidos en la cuantificación de la señal bioluminiscente en el animal completo, a pesar de que no fue posible observar la señal producida por el pulmón mediante imagenología. Los pulmones representan

un ambiente desafiante para imagenología óptica, debido a la estructura de los alvéolos y vías aéreas. La presencia de varias interfaces aire/líquido superpuestas y no homogéneas causa un aumento significativo de la dispersión de luz en la zona del pulmón, en comparación con tejido más homogéneo [70], [71]. Asimismo, los lisados de hígado del grupo tratado con el péptido CIGB-552 también presentan menor activación de NF- $\kappa$ B cuando se mide la actividad luciferasa en el luminómetro, pero en este caso no se observaron diferencias significativas con los lisados del grupo control.



**Figura 24.** Determinación de la activación del factor NF- $\kappa$ B *ex vivo*. Luego de la eutanasia se extrajeron hígado y pulmón de cada animal y se disgregaron en buffer de lisis con Ultraturax. Se reporta la cuantificación de la señal bioluminiscente de los lisados de órgano normalizada por el contenido proteico de un experimento representativo. Para cada grupo (n=5 para los grupos Vehículo, CIGB-552 y LALF<sub>32-51</sub>, y n=2 para DEX) se representa la media  $\pm$  SD. (\*ANOVA de una vía, p<0.05)

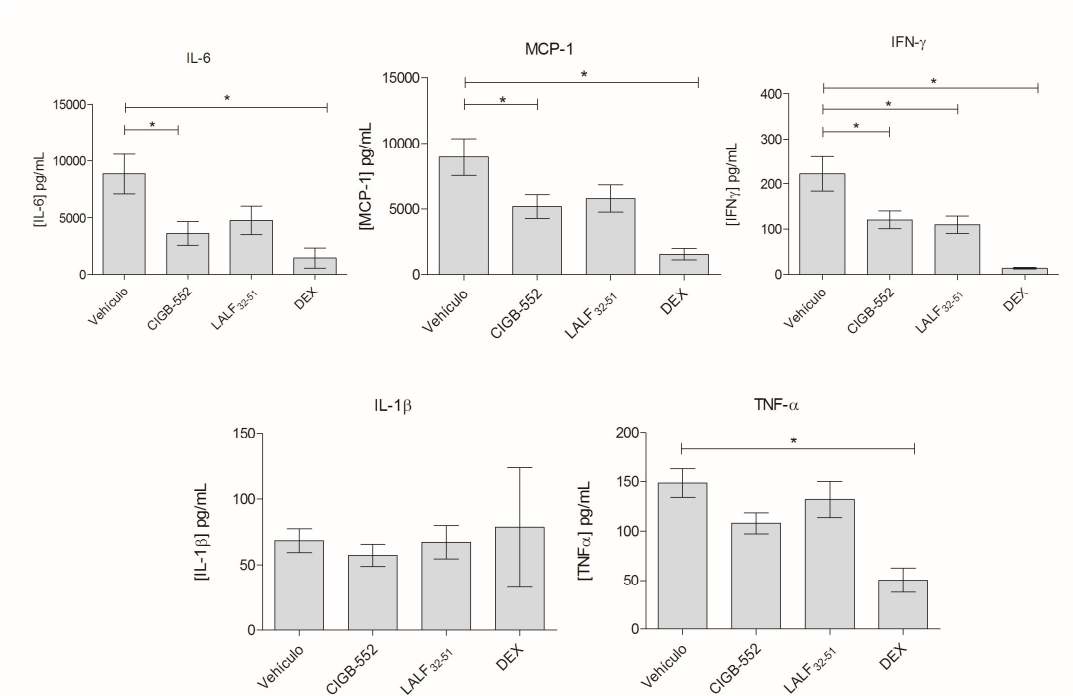
#### 4.6.2 Evaluación del efecto del péptido CIGB-552 sobre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias

Para tener una visión más amplia del efecto del CIGB-552 en la modulación de la inflamación sistémica, se realizó la determinación de citoquinas pro-inflamatorias en sangre por citometría de flujo. Nos centramos en las citoquinas moduladas por NF- $\kappa$ B: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  y MCP-1.

Se observa una disminución significativa en la concentración plasmática de IL-6, MCP-1 e IFN- $\gamma$  en el grupo que fue tratado con el péptido CIGB-552 respecto al control de vehículo (Figura 25). Las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no muestran una disminución significativa, aunque el grupo de animales tratados con el CIGB-552 presenta concentraciones más bajas que el grupo tratado con el LALF. La explicación de este resultado podría estar dada porque son citoquinas de expresión temprana, teniendo un pico de producción anterior a las 4 h. El grupo que recibió el péptido LALF<sub>32-51</sub>, si bien produjo una disminución de la concentración de citoquinas inflamatorias



respecto al control, esta disminución sólo fue significativa para una de las citoquinas analizadas: IFN- $\gamma$ .



**Figura 25.** Citoquinas inflamatorias en plasma determinadas por citometría de flujo. La concentración de citoquinas se midió 4 h luego del desafío con LPS. Se grafican las medias de tres experimentos independientes (n=5, n=5 y n=8 para los grupos experimentales de los ensayos 1, 2 y 3 respectivamente; n=3 para el control DEX en los tres ensayos) y se muestra la media  $\pm$  SEM. (\*ANOVA de una vía, p<0.05)

## 5. DISCUSIÓN

El cáncer continúa siendo una enfermedad ampliamente prevalente y con altas tasas de mortalidad, por lo que existe una constante necesidad de desarrollo de nuevas drogas. Las principales desventajas de las terapias convencionales radican en la poca selectividad hacia células tumorales, la heterogeneidad de las células cancerosas y la generación de resistencia al tratamiento [72]. En este sentido, los nuevos compuestos anti-tumorales de tipo peptídico constituyen una alternativa interesante debido a que presentan alta selectividad frente a células tumorales y presentan pocos eventos adversos. Por otro lado, la capacidad de interactuar selectivamente con las membranas de las células tumorales reduce la posibilidad de generar resistencia como los quimioterápicos convencionales [10].

El péptido CIGB-552 es un nuevo péptido sintético con potencial anti-tumoral, con citotoxicidad selectiva hacia líneas celulares tumorales, y que es capaz de disminuir el crecimiento tumoral y aumentar la supervivencia en modelos animales de cáncer. Su blanco de acción más estudiado es la proteína COMMD1, que juega un rol fundamental en su efecto anti-tumoral [30]–[32]. Esta proteína es un regulador transcripcional que inhibe las vías de señalización de NF- $\kappa$ B y HIF-1 [39].

Desde su descubrimiento hace más de 30 años, se ha conocido no sólo la vía de señalización del factor NF- $\kappa$ B con diferentes inductores, sino también sus propiedades bioquímicas y su rol en condiciones fisiopatológicas. Asimismo, el gran número de genes cuya expresión está regulada por NF- $\kappa$ B y los diversos modos de regulación de los factores de transcripción, sugieren que aún resta mucho por dilucidar [73].

### 5.1 Generación de líneas celulares reporteras para NF- $\kappa$ B

La activación del factor NF- $\kappa$ B constituye una vía de señalización rápida que actúa en respuesta a un amplio rango de estímulos inmunes y pro-inflamatorios. La relevancia de los procesos inflamatorios en la fisiopatología del cáncer implica que evaluar la inhibición de NF- $\kappa$ B sea de gran interés como estrategia de intervención farmacológica. En este sentido, se han desarrollado herramientas para el *screening* directo de compuestos anti NF- $\kappa$ B. Generalmente se utilizan la detección directa de las subunidades de NF- $\kappa$ B en un extracto nuclear o se visualiza la presencia de p65 a nivel nuclear por microscopía. Sin embargo, estas técnicas usualmente reflejan correctamente la activación de NF- $\kappa$ B, pero no necesariamente prueban que haya actividad transcripcional [74].

En este trabajo se generaron dos líneas celulares reporteras T-74D-NF- $\kappa$ B-hrGFP y H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP y se caracterizó su respuesta. Las líneas reporteras fueron transfectadas con el plásmido pNF- $\kappa$ B-hrGFP, el cual posee el gen de la GFP como proteína reportera bajo control de un promotor con múltiples sitios de unión al factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

Como se mencionó anteriormente, el uso de la GFP como reportero presenta varias ventajas. En primer lugar, no es necesario agregar un sustrato exógeno para medir la señal y no requiere lisar las células. Los ensayos basados en células usando este reportero no sólo permiten visualizar la GFP por microscopía sin necesidad de inmunomarcación, sino que además se puede medir su expresión por citometría de flujo. El análisis por citometría de flujo es una técnica adaptable a ensayos de *High-Throughput Screening* ya que se analiza un gran número de células en tiempos cortos de manera reproducible. Igualmente, utilizando citometría de flujo se puede medir simultáneamente la expresión del gen reportero y la viabilidad celular utilizando yoduro de propidio, por lo que en un único ensayo se obtienen ambos datos.

En esta tesis, se presenta un ensayo funcional para evaluar la activación de NF- $\kappa$ B en líneas celulares humanas de cáncer midiendo la expresión de la proteína reportera GFP. Estas nuevas líneas celulares reporteras se suman a las ya generadas en nuestro grupo (Caco-2-NF- $\kappa$ B-hrGFP y HT-29-NF- $\kappa$ B-hrGFP), diversificando los sistemas reporteros disponibles con líneas derivadas de epitelios de distintos tipos de cáncer: colon, mama, pulmón. Este pequeño panel constituye una valiosa herramienta para la búsqueda de compuestos con modulación de la vía NF- $\kappa$ B y con actividad anti-cáncer.

## **5.2 Caracterización de las líneas celulares reporteras**

Para determinar la robustez, sensibilidad y habilidad del ensayo reportero para evaluar la activación del factor NF- $\kappa$ B se estudió el mejor tiempo para la lectura final del ensayo, la capacidad de las líneas para responder a distintos estímulos, la respuesta a diferentes concentraciones de TNF- $\alpha$  y la estabilidad del ensayo reportero con los distintos pasajes celulares.

Dado los resultados de la cinética de activación, se determinó que 48 h de estimulación es el tiempo más adecuado para todos los clones. Sin embargo, el clon H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 1B9 perdió su capacidad de activación, por lo que se descartó y se decidió continuar la caracterización de los clones con respuesta estable. La pérdida de activación de determinados clones, pese a la selección realizada, ha sido reportada y probablemente esté relacionada con eventos de recombinación en los sitios de unión de NF- $\kappa$ B repetidos presentes en el plásmido reportero

[75]. El clon H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G6 presentó una rápida inducción del gen reportero. La baja en la expresión de GFP a las 72 h, aunque no es significativa, podría deberse a que estas células son de crecimiento rápido y posiblemente hayan alcanzado la confluencia. Además no se efectuó renovación del medio de cultivo durante todo el período, lo que justificaría esta observación ya que podría haber acumulación de algún metabolito tóxico (lactato, amonio) o agotamiento de algún nutriente fundamental para el metabolismo celular. Una respuesta similar a esta se reportó para la línea anteriormente generada HT-29-NF- $\kappa$ B-hrGFP F6 [63] y para el clon T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 1D8. Por otro lado, el clon T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G4 presentó una cinética de activación más lenta, comparable a la del clon Caco-2-NF- $\kappa$ B-hrGFP D5. Cabe mencionar que ninguno de los clones mostró saturación de la respuesta aún con 72 h de estimulación.

Una vez seleccionado el tiempo óptimo de estimulación para el ensayo reportero, se evaluó la respuesta de los clones a moduladores conocidos del factor NF- $\kappa$ B: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , y LPS. LPS no fue capaz de activar la expresión de GFP en ninguno de los clones. Se ha reportado que la línea T-47D tiene baja expresión de *Toll like receptor 4* (TLR4) y del co-receptor CD14, necesarios para la activación de NF- $\kappa$ B mediada por LPS [76], por lo que es esperable que LPS no haya activado los clones T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 1D8 y 2G4. De igual manera, LPS pudo activar débilmente al clon HT-29-NF- $\kappa$ B-hrGFP F6, llegando a una expresión máxima de 20% [63]. El clon H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G6 perdió gran parte de la estimulación por IL-1 $\beta$  luego de varios pasajes. Si bien la línea celular H460 expresa adecuadamente TLR4 [77], la baja activación de los clones derivados de esta línea estimulados con LPS o IL-1 $\beta$  podría estudiarse evaluando la expresión de los receptores utilizados por estas moléculas (TLR4 y IL-1R). Como el plásmido reportero se inserta al azar en el genoma de las células, no hay certeza de dónde se encuentra el inserto ni qué procesos podrían estar afectados en la señalización celular como para explicar este resultado.

TNF- $\alpha$  fue el estímulo que mayor expresión de GFP indujo en todos los clones analizados, seguido por IL-1 $\beta$ , pero sólo con TNF- $\alpha$  se obtuvo una respuesta dependiente de la concentración. La expresión de GFP en los clones derivados de la línea T-47D estimulados con IL-1 $\beta$  mostró un patrón de respuesta constante para todas las concentraciones de estímulo evaluadas. Debido a que el nivel de activación inducido por la estimulación con los tres inductores juntos produjo prácticamente la misma respuesta que la generada sólo con TNF- $\alpha$ , se prosiguió la caracterización con dicho estímulo.

Al comparar las curvas de respuesta en función de la concentración de TNF- $\alpha$  se observó que todos los clones llegaron a saturación, pese a que el clon T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP 1D8 obtuvo valores máximos menores que los demás. Los valores de CE50 calculados son superiores a los reportados para los clones derivados de HT-29 y Caco-2 [63], pero son comparables a las

concentraciones de TNF- $\alpha$  reportados para otros ensayos reporteros del factor NF- $\kappa$ B [60], [61], o ensayos de activación de H460 con TNF- $\alpha$  [78], [79]. Para los ensayos reporteros se determinó que la concentración de estímulo utilizada corresponda a los valores de CE50 para cada clon, de modo de obtener una respuesta que permita evaluar compuestos capaces de atenuar o potenciar la activación generada por TNF- $\alpha$ . Los límites de detección fueron similares para los tres clones ensayados, mientras que el rango lineal fue casi el mismo para los clones derivados de T-47D y algo superior para el clon H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP 2G6.

Por último, como parte de la caracterización de las líneas celulares reporteras se verificó la respuesta de las mismas a través de los distintos pasajes. Es vital conocer la estabilidad de la respuesta de estas líneas en el tiempo para una correcta implementación del ensayo reportero. Las células en cultivo pueden adquirir alteraciones luego de numerosos pasajes, lo que puede llevar a un fenotipo celular heterogéneo y una pérdida de la capacidad de estimulación con el tiempo [80]. Para ello, se compararon las curvas concentración-respuesta de los clones correspondientes a distintos pasajes y sus valores de CE50. En todos los casos, las células pierden estabilidad y capacidad de estimulación con el tiempo. Considerando los resultados en los distintos pasajes se recomienda utilizar las células en el menor pasaje posible, preferentemente no mantenerlas más de un mes en cultivo o cuatro pasajes. En comparación con las líneas HT-29 y Caco-2-NF- $\kappa$ B-hrGFP, las líneas derivadas de H460 y T-47D son menos estables, ya que las primeras tienen estabilidad hasta el pasaje 8 [63], aunque ya se ha reportado la pérdida de respuesta entre el pasaje 4 y 7 en otros sistemas [81].

### **5.3 Efecto del péptido CIGB-552 y sus metabolitos en la activación de NF- $\kappa$ B *in vitro***

Una vez generadas las líneas reporteras, se utilizó el ensayo reportero para evaluar si efectivamente el péptido CIGB-552 es capaz de inhibir la respuesta de NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$  en líneas celulares de cáncer. A su vez, se comparó el efecto del péptido CIGB-552 con su péptido parental LALF<sub>32-51</sub> y con sus metabolitos derivados de 17, 14 y 10 aminoácidos. Las concentraciones elegidas para estos ensayos responden a la CI50 y la mitad de la CI50 para cada línea parental. Los valores de citotoxicidad del péptido CIGB-552 para H460 y HT-29 ya habían sido reportados, mientras que no se disponía de datos para T-47D. Tampoco existían datos de citotoxicidad del LALF<sub>32-51</sub> en estas líneas. Al determinar los valores de CI50, se observó que el péptido CIGB-552 efectivamente presenta citotoxicidad selectiva hacia células de cáncer en comparación con fibroblastos humanos y que el péptido LALF<sub>32-51</sub> no comparte la capacidad anti-

cáncer del CIGB-552, puesto que para todas las líneas ensayadas sus valores de CI50 fueron mayores (Tabla 5).

Nuestros resultados demuestran que solamente el péptido CIGB-552 y el metabolito de 17 aminoácidos atenúan la activación de NF- $\kappa$ B producida por el tratamiento con TNF- $\alpha$  en las líneas celulares reporteras, mientras que el péptido LALF<sub>32-51</sub> no presento efecto sobre esta vía de señalización. Este hallazgo valida la selección del CIGB-552 como un nuevo péptido anti cáncer, inhibidor del factor NF- $\kappa$ B, optimizado a partir de un barrido de alanina del péptido LALF<sub>32-51</sub>. Por otra parte, la evaluación de los metabolitos sobre la activación del factor NF- $\kappa$ B y la producción de IL-8, demuestra que el efecto anti-inflamatorio y anti-cáncer del CIGB-552, depende en gran medida de su capacidad para inhibir el factor NF- $\kappa$ B, y que su funcionalidad depende de la integridad en su secuencia primaria.

Cabe mencionar que el grado de modulación de la activación de NF- $\kappa$ B es diferente en las tres líneas celulares estudiadas. Se reportó que la capacidad de penetración celular del CIGB-552 y la cantidad relativa de COMMD1 [68] varían de acuerdo a la línea celular utilizada, siendo la línea de cáncer de pulmón H460 la que presenta mayor expresión de COMMD1 y una mayor internalización del péptido en comparación con la línea de cáncer colorrectal HT-29. Nuestros resultados referidos a la inhibición del factor NF- $\kappa$ B sugieren el mismo patrón. El efecto del péptido CIGB-552 en la línea T-47D muestra una disminución de la activación de NF- $\kappa$ B similar a la observada para H460. Sin embargo no se han reportado las características en cuanto a capacidad de internalización celular ni los niveles de expresión de COMMD1 en T-47D.

#### **5.4 Efecto del péptido CIGB-552 en la activación de HIF-1 *in vitro***

La mayoría de los ACPs han demostrado su actividad anti-tumoral *in vivo* pero sus mecanismos de acción moleculares permanecen desconocidos [7]. En el caso del péptido CIGB-552, COMMD1 ha sido validada como blanco de acción. El péptido CIGB-552 logra estabilizar los niveles de proteína de COMMD1, facilitando la regulación negativa de la vía del factor NF- $\kappa$ B, y con ello la inducción de apoptosis en células tumorales. Asimismo, se reportó que en el modelo de implante de tumores humanos en ratones nude el tratamiento con el péptido CIGB-552 presentaba menor número y tamaño de vasos sanguíneos en el tumor, comparados con los tumores de los ratones no tratados [32]. Esto sugiere que parte del mecanismo anti-tumoral del péptido CIGB-552 podría tener un componente anti-angiogénico.

Como COMMD1 además de estar involucrada en la terminación de la respuesta de NF- $\kappa$ B también regula la actividad del factor HIF-1, nos propusimos evaluar si el tratamiento con el

péptido CIGB-552 tenía un efecto en la activación de esta vía de señalización. En condiciones de normoxia, la subunidad alfa de HIF-1 es degradada por lo que se encuentra habitualmente inactiva en el citosol. Frente a hipoxia, se inhiben una serie de reacciones que aumentan la estabilidad de la HIF-1 $\alpha$ , la cual dimeriza con HIF-1 $\beta$  y activa la expresión de genes relacionados con la angiogénesis, la supervivencia celular, el metabolismo y la eritropoyesis [49]. Debido a esto, y a que la hipoxia tiene un rol fundamental en la biología tumoral, HIF-1 se ha convertido en un atractivo blanco molecular para la terapia anti-cáncer [48].

En el ensayo empleado para evaluar la actividad de HIF-1, se demuestra que el péptido CIGB-552 es capaz de inhibir la activación del factor HIF-1 cuando se induce hipoxia por la acción de Deferoxamina. Por lo tanto, el péptido CIGB-552 se destaca como un péptido optimizado para su acción anti-tumoral, con un marcado efecto anti-inflamatorio y anti-angiogénico. De todas formas, resta estudiar si la inactivación de HIF-1 y de NF- $\kappa$ B por parte del péptido CIGB-552 es dependiente de la proteína COMMD1.

### **5.5 Efecto del péptido CIGB-552 en la activación de NF- $\kappa$ B *in vivo***

El LALF<sub>32-51</sub> es un péptido antimicrobiano que dio origen al nuevo péptido CIGB-552 y para el cual se reportó su efecto inmunomodulador y anti-inflamatorio en modelos de sepsis en ratones tratados de forma preventiva [29], [82]. El nuevo péptido CIGB-552, seleccionado a partir de un barrido de alanina del LALF<sub>32-51</sub>, pierde su capacidad de unión al LPS y se comporta como mejor agente anti cáncer que el péptido parental. Sin embargo, sus propiedades biológicas de modular la activación del factor NF- $\kappa$ B y su efecto anti-inflamatorio *in vivo* no habían sido estudiadas hasta el momento.

El modelo NF- $\kappa$ B-RE-luc utilizado nos permitió estudiar el efecto del péptido CIGB-552 en tiempo real sobre la inhibición de NF- $\kappa$ B en el animal entero. De acuerdo a la bibliografía se seleccionó 4 horas post desafío como el mejor tiempo para medir la señal bioluminiscente y se seleccionaron los órganos hígado y pulmón para determinación de la señal *ex vivo* ya que presentan la máxima respuesta cuando el desafío es LPS [64]. Los resultados muestran que existe inhibición del factor NF- $\kappa$ B en los ratones tratados con el CIGB-552 y desafiados con LPS, evidenciada por las imágenes obtenidas del animal entero y la señal luminiscente derivada de los lisados de órganos.

En el mismo modelo evaluamos los niveles de citoquinas en sangre. Los resultados indican que el tratamiento con el péptido CIGB-552 disminuye los niveles de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6, IFN- $\gamma$  y MCP-1 respecto a los niveles de los animales tratados con vehículo. Las

citoquinas como IL-6 están directamente involucradas en la inflamación asociada a cáncer, estando su expresión desregulada en la mayoría de los tipos de cáncer y presente en altas concentraciones en el microambiente tumoral [83]. Por otro lado, tanto MCP-1 como IFN- $\gamma$  tienen roles duales en la progresión tumoral [84]–[86], pero ambos contribuyen a la respuesta inflamatoria asociada a cáncer.

Por otro lado, durante la sepsis, la activación de NF- $\kappa$ B estimula la expresión de las citoquinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . A su vez, hay numerosos reportes del aumento de estas citoquinas en pacientes con distintos tipos de cáncer, por lo que son relevantes no sólo para la inflamación aguda sino también para la respuesta inflamatoria crónica [87], [88]. En el ensayo *in vivo* no se observaron diferencias en la concentración de IL-1 $\beta$  entre los grupos, ni siquiera con el control con Dexametasona. Los niveles de IL-1 $\beta$  detectados podrían estar en sus niveles basales debido a que normalmente se produce un pico de secreción máximo entre 1 y 2 h post-estimulación, para luego disminuir a las 4 y 6 h, lo cual coincide con el tiempo en el cual se tomaron las muestras de sangre. Con respecto al TNF- $\alpha$ , se observó una disminución de su concentración en el plasma de los animales tratados pero no es significativa, probablemente también podría deberse a que el tiempo de toma de muestra no fue el óptimo para poder observar las diferencias.

Estos resultados demuestran, por primera vez, la inhibición de NF- $\kappa$ B por el péptido CIGB-552 en un modelo *in vivo* de inflamación aguda por LPS, confirmando el efecto anti-inflamatorio de este péptido. Su acción inhibitoria sobre el factor NF- $\kappa$ B no se restringe a la célula tumoral, sino que se extiende a órganos y otras células del sistema inmune limitando la inflamación. Si bien este modelo no refleja exactamente la inflamación asociada al desarrollo del cáncer, los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento con el péptido CIGB-552 es capaz de limitar la inflamación a través de la inhibición de NF- $\kappa$ B.



## 6. CONCLUSIONES

Dos nuevas líneas celulares tumorales reporteras de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B fueron generadas y caracterizadas. Estas dos líneas celulares tienen una cinética de activación de 48 h, dependiendo de la línea celular, y responden de manera diferencial frente a TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$ .

En nuestro laboratorio se habían generado dos líneas reporteras derivadas de líneas celulares intestinales, Caco-2-NF- $\kappa$ B-hrGFP y HT-29-NF- $\kappa$ B-hrGFP. En este trabajo se generaron dos nuevas líneas reporteras H460-NF- $\kappa$ B-hrGFP y T-47D-NF- $\kappa$ B-hrGFP. En su conjunto, estas líneas constituyen un pequeño panel con tres de los tipos de cáncer más prevalentes en la población: pulmón, mama y colon. Estas nuevas herramientas resultaron ser sensibles y robustas, brindando resultados reproducibles. Asimismo, constituyen sistemas versátiles que permiten evaluar en simultáneo al gen reportero con otros parámetros celulares, como viabilidad celular o producción de citoquinas, convirtiéndolos en ensayos adaptables a estrategias de High Throughput y High – Content Screening.

Los sistemas reporteros generados fueron utilizados para evaluar el efecto del péptido CIGB-552 y sus metabolitos derivados en relación a la activación del factor NF- $\kappa$ B. El péptido CIGB-552 y el metabolito de 17 aminoácidos inhiben la activación de NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$  en las tres líneas celulares aunque el grado de inhibición es dependiente de la línea celular.

Los resultados obtenidos sobre la inhibición del factor NF- $\kappa$ B y de la actividad citotóxica en las líneas celulares evaluadas validan la selección del CIGB-552 como mejor candidato anti-cáncer respecto al péptido LALF<sub>32-51</sub>.

Se determinó por primera vez que el péptido CIGB-552 es capaz de inhibir la actividad transcripcional del factor HIF-1.

Por último, se observó que el péptido CIGB-552 es capaz de inhibir el factor NF- $\kappa$ B *in vivo* y que modula la respuesta inflamatoria desencadenada por LPS.

## 7. PERSPECTIVAS

La implementación de las líneas celulares reporteras en tecnologías de cultivo en tres dimensiones permitirá contribuir a una mejor comprensión del mecanismo de acción antitumoral del CIGB-552. Para ello se evaluará el ensayo reportero empleando esferoides de las líneas generadas.

Resta determinar si los resultados obtenidos respecto a la inhibición de la vía de HIF-1 se validan en líneas celulares derivadas de cáncer de diferentes orígenes histológicos, así como si el blanco molecular COMMD1 también está involucrado en este efecto. Esto se abordará realizando experimentos de silenciamiento. Asimismo, se analizará si el efecto se repite con el tratamiento con el metabolito de 17 aminoácidos o con el péptido parental LALF<sub>32-51</sub>.

Por último, proponemos estudiar el rol del efecto anti-NF- $\kappa$ B ejercido por el péptido CIGB-552 en la inflamación asociada a cáncer utilizando el ratón reportero en un modelo de inflamación crónica como el de colitis asociada a cáncer.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] F. Bray, J.-S. Ren, E. Masuyer, and J. Ferlay, "Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008," *Int. J. Cancer*, vol. 132, no. 5, pp. 1133–1145, Mar. 2013.
- [2] J. Ferlay *et al.*, "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.," *Int. J. cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359-86, Mar. 2015.
- [3] C. L. Bonifant, H. J. Jackson, R. J. Brentjens, and K. J. Curran, "Toxicity and management in CAR T-cell therapy," *Mol. Ther. - Oncolytics*, vol. 3, Jan. 2016.
- [4] S. Kelderman, T. N. M. Schumacher, and J. B. A. G. Haanen, "Acquired and intrinsic resistance in cancer immunotherapy.," *Mol. Oncol.*, vol. 8, no. 6, pp. 1132–9, Sep. 2014.
- [5] A. Zaman and T. G. Bivona, "Emerging application of genomics-guided therapeutics in personalized lung cancer treatment," *Ann. Transl. Med.*, vol. 6.9, no. 160, 2018.
- [6] D. W. Hoskin and A. Ramamoorthy, "Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1778, no. 2, pp. 357–375, 2008.
- [7] A. Blanco-Miguez *et al.*, "REVIEW From amino acid sequence to bioactivity: The biomedical potential of antitumor peptides," *PROTEIN Sci.*, vol. 25, pp. 1084–1095, 2016.
- [8] N. Papo and Y. Shai, "Host defense peptides as new weapons in cancer treatment.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, no. 7–8, pp. 784–90, 2005.
- [9] S. Riedl, D. Zweytick, and K. Lohner, "Membrane-active host defense peptides--challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs.," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 164, no. 8, pp. 766–81, Nov. 2011.
- [10] J. S. Mader and D. W. Hoskin, "Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment," *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 15, no. 8, pp. 933–946, Aug. 2006.
- [11] P. Dasgupta, A. Singh, and R. Mukherjee, "N-Terminal Acylation of Somatostatin Analog with Long Chain Fatty Acids Enhances Its Stability and Anti-Proliferative Activity in Human Breast Adenocarcinoma Cells," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 25, no. 1, pp. 29–36, 2002.
- [12] B. Deslouches and Y. P. Di, "Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications.," *Oncotarget*, vol. 8, no. 28, pp. 46635–46651, Jul. 2017.
- [13] K. V. R. Reddy, R. D. Yedery, and C. Aranha, "Antimicrobial peptides: premises and promises.," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 24, no. 6, pp. 536–47, Dec. 2004.
- [14] A. L. Hilchie, K. Wuerth, and R. E. W. Hancock, "Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides.," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 9, no. 12, pp. 761–8, Dec. 2013.
- [15] G. Gabernet, A. T. Müller, J. A. Hiss, and G. Schneider, "Membranolytic anticancer peptides," *Med. Chem. Commun.*, vol. 7, no. 12, pp. 2232–2245, 2016.
- [16] R. A. Cruciani, J. L. Barker, M. Zasloff, H. C. Chen, and O. Colamonici, "Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 9, pp. 3792–6, May 1991.

- [17] D. Gaspar, A. Salomé Veiga, and M. A. R. B. Castanho, "From antimicrobial to anticancer peptides. A review," *Front. Microbiol.*, vol. 4, no. OCT, pp. 1–16, 2013.
- [18] T. Iwasaki *et al.*, "Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface," *Peptides*, vol. 30, no. 4, pp. 660–668, Apr. 2009.
- [19] M.-C. Lin, S.-B. Lin, J.-C. Chen, C.-F. Hui, and J.-Y. Chen, "Shrimp anti-lipoplysaccharide factor peptide enhances the antitumor activity of cisplatin in vitro and inhibits HeLa cells growth in nude mice," *Peptides*, vol. 31, no. 6, pp. 1019–1025, Jun. 2010.
- [20] D. Wu, Y. Gao, Y. Qi, L. Chen, Y. Ma, and Y. Li, "Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge," *Cancer Lett.*, vol. 351, no. 1, pp. 13–22, Aug. 2014.
- [21] S. Chernysh *et al.*, "Antiviral and antitumor peptides from insects," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 20, pp. 12628–32, Oct. 2002.
- [22] A. Hoess<sup>3</sup>, S. Watson<sup>1</sup>, G. R. Siber<sup>2</sup>, R. Liddington<sup>4</sup>, and E. Schulz, "Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, Limulus anti-LPS factor, at 1.5 Å resolution Munchen, Germany <sup>4</sup>Corresponding author Communicated by G," 1993.
- [23] T. Nakamura, T. Morita, and S. Iwanaga, "Lipoplysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in Limulus hemocytes. Isolation and characterization," *Eur. J. Biochem.*, vol. 154, no. 3, pp. 511–521, Feb. 1986.
- [24] T. Morita *et al.*, "Isolation and Biological Activities of Limulus Anticoagulant (Anti LPS Factor) which Interacts with Lipopolysaccharide (LPS)<sup>1</sup>," 1985.
- [25] J. Aketagawa *et al.*, "Primary structure of limulus anticoagulant anti-lipoplysaccharide factor," *J. Biol. Chem.*, vol. 261, no. 16, pp. 7357–7365, 1986.
- [26] H. Shaw Warren *et al.*, "Binding and Neutralization of Endotoxin by Limulus Antilipoplysaccharide Factor," 1992.
- [27] M. G. Vallespi *et al.*, "A Limulus anti-LPS factor-derived peptide modulates cytokine gene expression and promotes resolution of bacterial acute infection in mice," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 3, pp. 247–256, 2003.
- [28] M. G. Vallespi, L. A. Glaria, O. Reyes, H. E. Garay, J. Ferrero, and M. J. Araña, "A Limulus antilipoplysaccharide factor-derived peptide exhibits a new immunological activity with potential applicability in infectious diseases.," *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 7, no. 4, pp. 669–75, Jul. 2000.
- [29] M. G. Vallespi, M. Colas, H. Garay, O. Reyes, and M. J. Araña, "Differential regulation of Th1/Th2 in relevant tissues for sepsis pathogenesis with a Limulus anti-LPS factor-derived peptide increases survival in Gram-positive sepsis," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 4, no. 10–11, pp. 1343–1351, 2004.
- [30] M. G. Vallespi *et al.*, "Identification of a novel antitumor peptide based on the screening of an Ala-library derived from the LALF32-51 region," *J. Pept. Sci.*, vol. 16, no. 1, pp. 40–47, 2010.
- [31] J. R. Fernández Massó *et al.*, "The Antitumor Peptide CIGB-552 Increases COMMD1 and Inhibits Growth of Human Lung Cancer Cells.," *J. Amino Acids*, vol. 2013, p. 251398, 2013.

- [32] M. G. Vallespí *et al.*, "Antitumor efficacy, pharmacokinetic and biodistribution studies of the anticancer peptide CIGB-552 in mouse models," *J. Pept. Sci.*, vol. 20, no. 11, pp. 850–859, 2014.
- [33] S. Astrada *et al.*, "Comparative analysis reveals amino acids critical for anticancer activity of peptide CIGB-552," *J. Pept. Sci.*, vol. 22, no. 11–12, pp. 711–722, 2016.
- [34] B. van de Sluis, J. Rothuizen, P. L. Pearson, B. A. van Oost, and C. Wijmenga, "Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 11, no. 2, pp. 165–173, Jan. 2002.
- [35] E. Burstein *et al.*, "COMMD Proteins, a Novel Family of Structural and Functional Homologs of MURR1\* □ S," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, pp. 22222–22232, 2005.
- [36] G. N. Maine and E. Burstein, "COMMD proteins: COMMing to the scene," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 64, no. 15, pp. 1997–2005, 2007.
- [37] M. Sommerhalter, Y. Zhang, and A. C. Rosenzweig, "Solution Structure of the COMMD1 N-terminal Domain," *J. Mol. Biol.*, vol. 365, no. 3, pp. 715–721, 2007.
- [38] P. Bartuzi, M. H. Hofker, and B. van de Sluis, "Tuning NF-κB activity: A touch of COMMD proteins," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1832, no. 12, pp. 2315–2321, 2013.
- [39] P. a. J. Muller *et al.*, "Nuclear-Cytosolic Transport of COMMD1 Regulates NF-κB and HIF-1 Activity," *Traffic*, vol. 10, no. 5, pp. 514–527, May 2009.
- [40] T. Chang, Y. Ke, K. Ly, and F. J. McDonald, "COMMD1 regulates the delta epithelial sodium channel (δENaC) through trafficking and ubiquitination," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 411, no. 3, pp. 506–511, Aug. 2011.
- [41] B. Van De Sluis *et al.*, "COMMD1 disrupts HIF-1α/β dimerization and inhibits human tumor cell invasion," *J. Clin. Invest.*, vol. 120, no. 6, pp. 2119–2130, Jun. 2010.
- [42] T. D. Gilmore, "Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives," *Oncogene*, vol. 25, no. 51, pp. 6680–6684, Oct. 2006.
- [43] V. Tergaonkar, "NFκB pathway: A good signaling paradigm and therapeutic target," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 38, no. 10, pp. 1647–1653, Jan. 2006.
- [44] G. N. Maine, X. Mao, C. M. Komarck, and E. Burstein, "COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase.," *EMBO J.*, vol. 26, no. 2, pp. 436–47, Jan. 2007.
- [45] T. Núñez de Villavicencio-Díaz *et al.*, "Comparative proteomics analysis of the antitumor effect of CIGB-552 peptide in HT-29 colon adenocarcinoma cells," *J. Proteomics*, vol. 126, pp. 163–171, 2015.
- [46] A. Rodríguez-Ulloa *et al.*, "Proteomic study to survey the CIGB-552 antitumor effect," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–46, 2015.
- [47] M. Riera-Romo, "COMMD1: A Multifunctional Regulatory Protein," *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, no. 1, pp. 34–51, 2018.
- [48] G. L. Semenza, "Targeting HIF-1 for cancer therapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 10, pp. 721–732, 2003.

- [49] G. N. Masoud and W. Li, "HIF-1  $\alpha$  pathway : role , regulation and intervention for cancer therapy," vol. 5, no. 5, pp. 378–389, 2015.
- [50] B. Van De Sluis *et al.*, "Increased Activity of Hypoxia-Inducible Factor 1 Is Associated with Early Embryonic Lethality in Commd1 Null Mice," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 11, pp. 4142–4156, 2007.
- [51] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [52] L. M. Coussens and Z. Werb, "Inflammation and cancer," *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 860–867, 2002.
- [53] S. I. Grivennikov, F. R. Greten, and M. Karin, "Immunity, inflammation, and cancer.," *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 883–99, Mar. 2010.
- [54] K. Bhatelia, K. Singh, and R. Singh, "TLRs: Linking inflammation and breast cancer," *Cell. Signal.*, vol. 26, no. 11, pp. 2350–2357, Nov. 2014.
- [55] M. Karin, Y. Cao, F. R. Greten, and Z.-W. Li, "NF- $\kappa$ B in cancer: from innocent bystander to major culprit," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 4, pp. 301–310, Apr. 2002.
- [56] Y. Ben-Neriah and M. Karin, "Inflammation meets cancer, with NF- $\kappa$ B as the matchmaker," *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 8, pp. 715–723, 2011.
- [57] N. D. Perkins, "The diverse and complex roles of NF- $\kappa$ B subunits in cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 12, no. 2, pp. 121–132, 2012.
- [58] E. Pikarsky *et al.*, "NF- $\kappa$ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer," *Nature*, vol. 431, no. 7007, pp. 461–466, Sep. 2004.
- [59] J. Suh *et al.*, "Mechanisms of constitutive NF- $\kappa$ B activation in human prostate cancer cells.," *Prostate*, vol. 52, no. 3, pp. 183–200, 2002.
- [60] O. Lakhdari *et al.*, "Functional Metagenomics: A High Throughput Screening Method to Decipher Microbiota-Driven NF- $\kappa$ B Modulation in the Human Gut," *PLoS One*, vol. 5, no. 9, p. e13092, Sep. 2010.
- [61] C. E. Badr, J. M. Niers, L.-A. Tjon-Kon-Fat, D. P. Noske, T. Wurdinger, and B. a Tannous, "Real-time monitoring of nuclear factor kappaB activity in cultured cells and in animal models.," *Mol. Imaging*, vol. 8, no. 5, pp. 278–90, Jan. 2009.
- [62] S. Kohlmeier, M. Mancuso, R. Tecon, H. Harms, J. R. van der Meer, and M. Wells, "Bioreporters: gfp versus lux revisited and single-cell response," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 8, pp. 1578–1585, Mar. 2007.
- [63] G. Mastropietro, I. Tiscornia, K. Perelmuter, S. Astrada, and M. Bollati-fogolín, "HT-29 and Caco-2 Reporter Cell Lines for Functional Studies of Nuclear Factor Kappa B Activation," vol. 2015, 2015.
- [64] H. Carlsen, J. O. Moskaug, S. H. Fromm, and R. Blomhoff, "In Vivo Imaging of NF- B Activity," *J. Immunol.*, vol. 168, no. 3, pp. 1441–1446, Feb. 2002.
- [65] W. Strober, "Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability," *Curr. Protoc. Immunol.*, pp. 2–3, 2001.

- [66] T. L. Riss *et al.*, "Cell Viability Assays," *Assay Guid. Man. [Internet]*, vol. 114, no. 8, pp. 785–796, 2013.
- [67] J. Schindelin *et al.*, "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis," *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, Jul. 2012.
- [68] S. Astrada, J. R. F. Massó, M. G. Vallespí, and M. Bollati-Fogolín, "Cell penetrating capacity and internalization mechanisms used by the synthetic peptide CIGB-552 and its relationship with tumor cell line sensitivity," *Molecules*, vol. 23, no. 4, pp. 1–13, 2018.
- [69] Y. Hu, J. Liu, and H. Huang, "Recent agents targeting HIF-1 $\alpha$  for cancer therapy," *J. Cell. Biochem.*, vol. 114, no. 3, pp. 498–509, 2013.
- [70] S. T. Gammon *et al.*, "Preclinical anatomical, molecular, and functional imaging of the lung with multiple modalities."
- [71] J. F. P.-J. Abascal *et al.*, "Influence of absorption and scattering on the quantification of fluorescence diffuse optical tomography using normalized data," *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, no. 3, p. 036013, Mar. 2012.
- [72] S. Dissanayake, W. A. Denny, S. Gamage, and V. Sarojini, "Recent developments in anticancer drug delivery using cell penetrating and tumor targeting peptides," *J. Control. Release*, vol. 250, pp. 62–76, 2017.
- [73] Q. Zhang, M. J. Lenardo, and D. Baltimore, "30 Years of NF- $\kappa$ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology.," *Cell*, vol. 168, no. 1–2, pp. 37–57, Jan. 2017.
- [74] A. T. Gewirtz, K. A. Reed, D. Merlin, M. Hobert, A. S. Neish, and J. L. Madara, "21 Modeling microbial-epithelial interactions in the intestine," *Methods Microbiol.*, vol. 31, pp. 377–396, 2002.
- [75] N. El-Guendy and A. P. Sinai, "Potential problems inherent in cell-based stable NF-kappaB-GFP reporter systems.," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 312, no. 1–2, pp. 147–55, May 2008.
- [76] M. Mehmeti *et al.*, "Expression of functional toll like receptor 4 in estrogen receptor/progesterone receptor-negative breast cancer," *Breast Cancer Res.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–13, 2015.
- [77] Z. Zhan *et al.*, "Autophagy facilitates TLR4- and TLR3-triggered migration and invasion of lung cancer cells through the promotion of TRAF6 ubiquitination.," *Autophagy*, vol. 10, no. 2, pp. 257–68, Feb. 2014.
- [78] J. Zhu, Y. Xin, X. Liu, Y. Wang, and Y. Liu, "Nimotuzumab enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to tumor necrosis factor- $\alpha$  by inhibiting the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway.," *Exp. Ther. Med.*, vol. 15, no. 4, pp. 3345–3351, Apr. 2018.
- [79] G. Imre, V. Gekeler, A. Leja, T. Beckers, and M. Boehm, "Histone deacetylase inhibitors suppress the inducibility of nuclear factor- $\kappa$ B by tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor-1 down-regulation," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 10, pp. 5409–5418, 2006.
- [80] J. R. Masters and G. N. Stacey, "Changing medium and passaging cell lines," *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 9, pp. 2276–2284, Sep. 2007.
- [81] O. J. Trask, *Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) Translocation Assay Development and*

*Validation for High Content Screening*. 2004.

- [82] M. G. Vallespi *et al.*, "A Limulus anti-LPS factor-derived peptide modulates cytokine gene expression and promotes resolution of bacterial acute infection in mice," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 3, no. 2, pp. 247–256, Feb. 2003.
- [83] N. Kumari, B. S. Dwarakanath, A. Das, and A. N. Bhatt, "Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance," *Tumor Biol.*, vol. 37, no. 9, pp. 11553–11572, Sep. 2016.
- [84] T. Yoshimura, "The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally?," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 15, no. 4, pp. 335–345, Apr. 2018.
- [85] M. Mojic, K. Takeda, and Y. Hayakawa, "The Dark Side of IFN- $\gamma$ : Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 1, Dec. 2017.
- [86] T. Kuroda *et al.*, "Monocyte Chemoattractant Protein-1 Transfection Induces Angiogenesis and Tumorigenesis of Gastric Carcinoma in Nude Mice via Macrophage Recruitment," 2005.
- [87] X. Wang and Y. Lin, "Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 29, no. 11, pp. 1275–88, Nov. 2008.
- [88] A. M. Lewis, S. Varghese, H. Xu, and H. R. Alexander, "Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment.," *J. Transl. Med.*, vol. 4, p. 48, Nov. 2006.