



## EVALUACIÓN DEL EFECTO BLOQUEADOR DE PÉPTIDOS SOBRE MOLÉCULAS PARTICIPANTES EN EL PROCESO INFLAMATORIO

Torales-Cardena Azael, Briseño-Lugo Paola Edith, Barreda-Arranz Sara María Dolores, Vega-San Martín Adriana, Cancino-Díaz Mario Eugenio, Rodríguez-Martínez Sandra

Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,  
Instituto Politécnico Nacional.

azaeltc@gmail.com, paolaedithb@yahoo.com.mx, sara\_park@hotmail.com, adrianavegasm@hotmail.es, mecancinod@gmail.com, sandrarodm@yahoo.com.mx.

### 1. INTRODUCCIÓN

La inflamación es un mecanismo de defensa inespecífico, generado como respuesta del organismo frente a la agresión física, química o infecciosa, en donde se da un desplazamiento de leucocitos y moléculas plasmáticas hacia regiones de infección o daño tisular con el propósito de reparar el tejido que ha sufrido daño o para eliminar al agente patógeno desencadenante de la infección (1). Para el desarrollo de terapias antiinflamatorias se necesita del conocimiento de la identidad molecular sobre la superficie celular en las enfermedades. El progreso de este tipo de terapias requiere establecer efectivamente la identificación de agentes específicos para marcadores de superficie celular clínicamente relevantes (2). Así, los anticuerpos monoclonales han mostrado un efecto beneficioso muy claro en diferentes modelos animales de estados inflamatorios y autoinmunes. Sin embargo, la administración a largo plazo de este tipo de fármacos terapéuticos podría tener consecuencias inesperadas e incluso indeseadas, por ejemplo, una respuesta inmune ineficiente ante alguna infección (3). Otras limitaciones de estos anticuerpos son: un alto costo debido a dosis repetidas y alto costo de producción, imposibilidad para ser administrados vía oral, limitada penetración de aquellos anticuerpos de mayor tamaño en algunos tejidos como el nervioso y la falta de respuesta de algunos anticuerpos después de cierto tiempo de tratamiento (2). Por tanto se han intentado desarrollar terapias más seguras y eficaces, entre las que se pueden mencionar los péptidos derivados de la tecnología de despliegue en fagos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias (4). La tecnología del despliegue en fagos o "Phage Display" se ha utilizado desde hace algunas décadas. El despliegue de fagos es una técnica en la cual a partir de una biblioteca se selecciona un fago (bacteriófago M13 como vector) que expresa variantes de un péptido sobre su superficie, con lo cual la secuencia de DNA de dicho fago seleccionado tiene perfecta correlación con la secuencia del péptido variante que exprese. Los péptidos capaces de unirse al blanco son seleccionados en un proceso llamado *biopanning* (5). Los péptidos obtenidos a partir de esta tecnología tiene varias ventajas sobre los anticuerpos utilizados como terapia: 1) menores costos de producción, 2) mayor actividad por masa, debido al pequeño tamaño de los péptidos, 3) amplia estabilidad, pudiéndose conservar incluso a temperatura ambiente, 4) baja oportunidad de interactuar con el sistema inmune y 5) mejor penetración (6). Algunos mediadores inflamatorios importantes y blancos terapéuticos son por ejemplo el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) o la interleucina 17 (IL-17), via sus receptores, así mismo como la ectoenzima endotelial VAP; los cuales se reconocen como relevantes en el desarrollo de las enfermedad inflamatorias crónicas como las autoinmunes (7-11). En nuestro grupo de trabajo seleccionamos fagopéptidos, a partir de una biblioteca comercial, con especificidad a moléculas clave en el proceso inflamatorio, como diversas moléculas de adhesión del endotelio y leucocitos (VAP-1), receptores de quimiocinas (CCR2) y de citocinas (TNFR, IL-17R) (12).

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A partir de una biblioteca comercial se enfrentaron fagopéptidos ante anticuerpos anti-TNF $\alpha$ , anti-IL-17 y rhVAP-1 por separado. También se seleccionaron fagopéptidos al enfrentarse con células mononucleares activadas. Los fagopéptidos que se unieron a las moléculas blanco fueron amplificados al infectar cultivos de *E. coli* cepa ER2738. A los fagopéptidos amplificados se les realizaron pruebas de especificidad mediante un ensayo de Dot-ELISA. Se realizó un ensayo de bloqueo de la actividad del TNFR evaluado por adherencia celular entre las líneas celulares HMVEC, luego estimuladas con TNF- $\alpha$ , y THP-1 para probar la clona 1 proveniente del grupo de fagopéptidos específicos TNFR (GPhETNFR). Se aislaron clones de fagopéptidos de GPhETNFR, GPhEIL-17R y GPhEVAP para analizar sus secuencias nucleotídicas y peptídicas, figura 1.

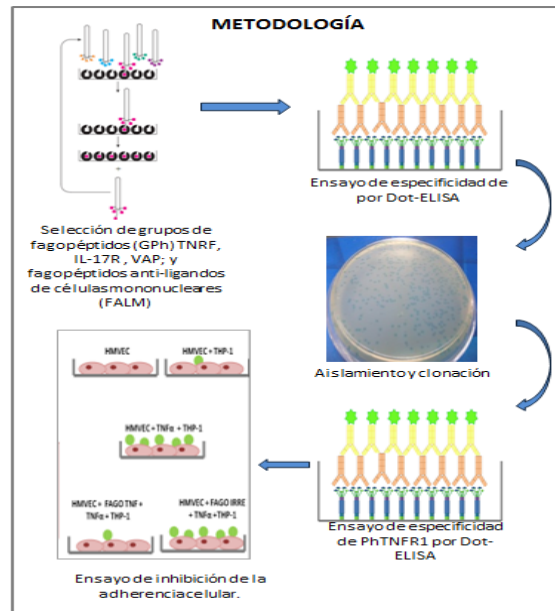
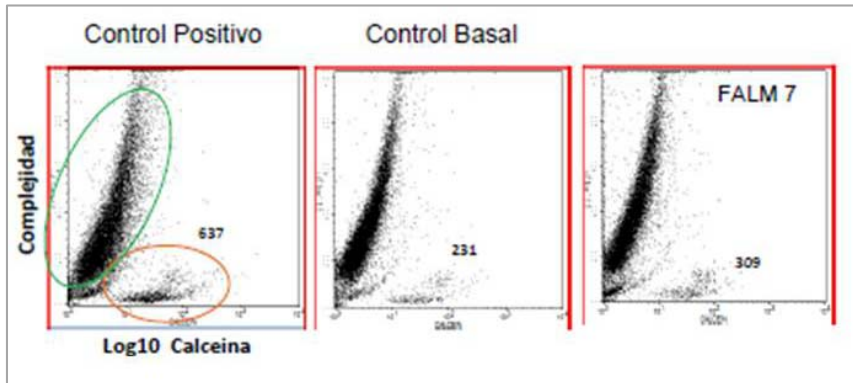


Figura 1. Esquema general de trabajo.

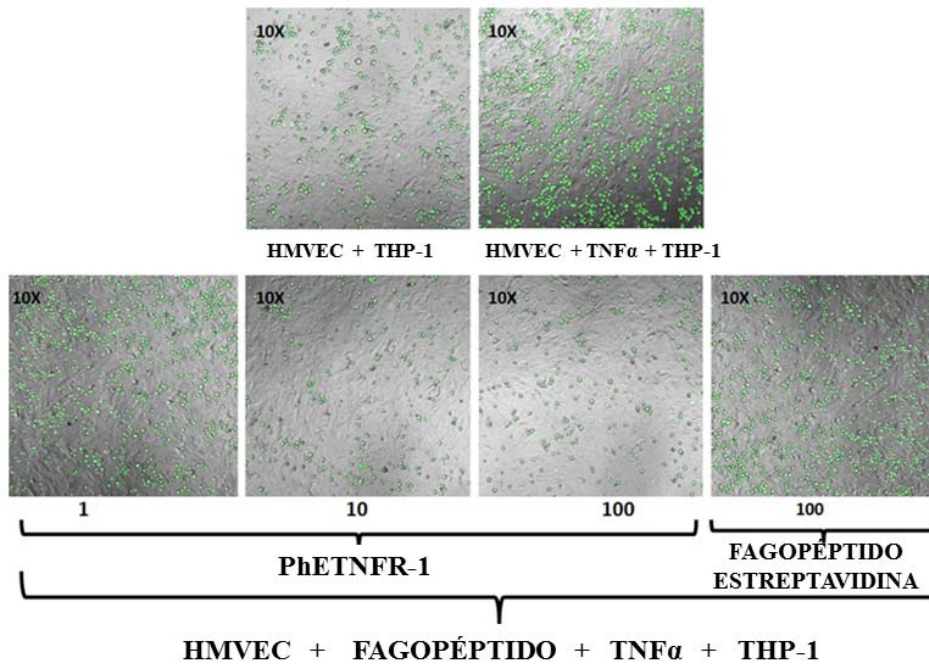
## 3. RESULTADOS

En nuestro grupo de trabajo se caracterizaron un fagopéptido (FALM7) obtenido a partir de una biblioteca "Phage Display Ph.D.7" con capacidad de inhibir la adherencia celular entre células endoteliales de la línea HMVEC y células mononucleares de sangre periférica, ver figura 2. Dicho fagopéptido pudo reconocer alguna molécula sobre la superficie de las células mononucleares, debido a que inicialmente este fagopéptido fue seleccionado al enfrentarse a células mononucleares activadas. El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos del péptido lineal de este fagopéptido reveló que éste tiene un 71.4% de identidad con una región extracelular del receptor de quimiocina 2 (CCR2).



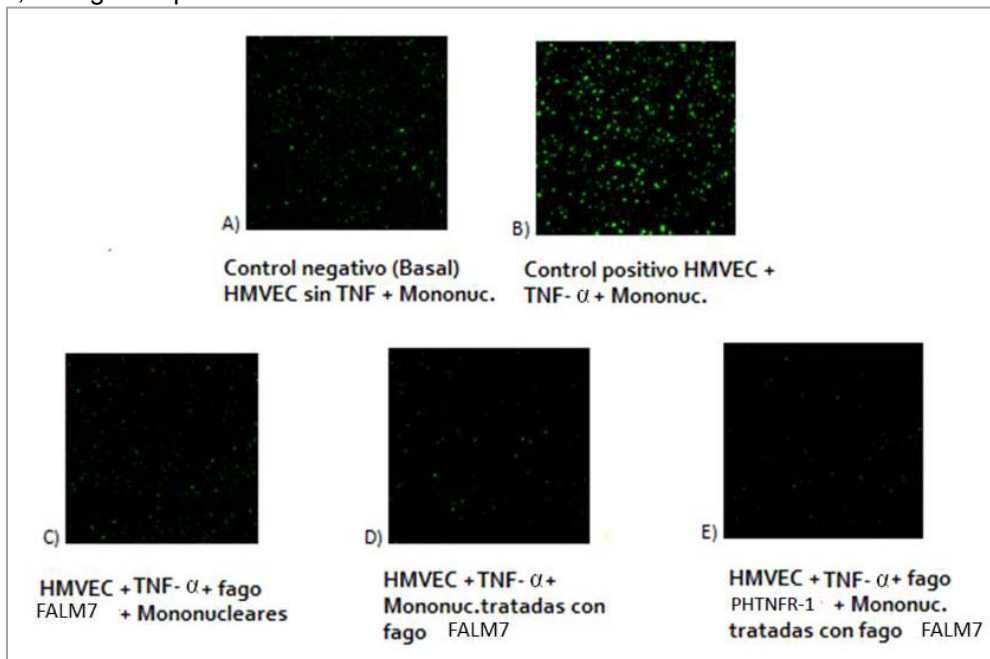
**Figura 2. Inhibición de la adherencia celular por fagopéptido anti-ligandos de células mononucleares (FALM)-7 evaluada por citometría de flujo.** La proporción de células mononucleares (TNF- $\alpha$ /con FALM7) es menor cuando está presente el FALM7 con respecto al control positivo (TNF- $\alpha$ /sin FALM7), ver óvalo rojo.

Junto con los datos anteriores, también se seleccionó y probó la capacidad inhibitoria de un fagopéptido dirigido contra el TNFR. Este fagopéptido fue evaluado mediante ensayos de adherencia celular (entre células HMVEC y monocitos de la línea celular THP-1), en los cuales la inhibición de la adherencia observada fue un efecto indirecto del bloqueo de la unión del TNF- $\alpha$  con su receptor, con la consiguiente expresión disminuida de moléculas de adhesión, ver figura 3. Además de este fagopéptido, se seleccionaron otros fagopéptidos con potencial de reconocer al IL-17R y a VAP-1, los cuales aún faltan por caracterizar su función bloqueadora (12).



**Figura 3. Ensayo de inhibición de adherencia evaluando la clona PhETNFR-1 y fago estreptavidina (fago no relacionado).** El efecto de inhibición se observa con las concentraciones 10 y 100 fagopéptidos/célula endotelial. Imágenes representativas de tres experimentos diferentes realizados por duplicado.

Finalmente se evaluó el efecto bloqueador de ambos fagopéptidos (PhETNFR-1 y FALM7) en un ensayo de inhibición de la adherencia celular, en el cual se observó una menor cantidad de leucocitos fluorescentes adheridos en el co-cultivo al estar presentes los fagopéptidos PhETNFR-1 y FALM7. Lo que sugiere un efecto aditivo en la disminución de la adherencia celular, ver figura 3 panel E.



**Figura 3. Ensayo de inhibición de la adherencia de células mononucleares sobre células HMVEC evaluando los fagopéptidos PhETNFR-1 y FALM7.**

#### 4. CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos se concluye que, los fagopéptidos obtenidos PhETNFR-1 y FALM7 mostraron por separado inhibición de la adherencia celular, lo que sugiere que tienen un efecto bloqueador; y que este efecto parece aditivo cuando se evalúan juntos estos fagopéptidos en un ensayo de inhibición de la adherencia celular. La demostración de la capacidad inhibitoria de estas clonas de fagopéptidos seleccionadas es un avance importante en este proyecto para la obtención de péptidos con capacidad de bloqueo de las moléculas de interés para tratar la inflamación.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Aristizábal B, González Ángel, Pérez-Cuevas B, Flores V, Martínez C. (2005). Respuesta inmune innata. Anaya JM. Autoinmunidad y enfermedad autoinmune, (21-28), Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas.
2. Chan A, Carter P. (2010) Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. Nat Rev Immunol, 10: 301-316.
3. Barreiro O, Sánchez F. (2009) Bases moleculares de las interacciones leucocito-endotelio durante la respuesta inflamatoria. Rev Esp Cardiol; 62: 552-562.



# IV CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

"Generación de Nuevas Técnicas de Diagnóstico y Tratamiento"

6, 7 y 8 de Junio de 2013, Tonantzintla, Cholula, Puebla



4. Arap M. (2005) Phage display technology – applications and innovations. *Genet Mol Biol*, 28: 1-9.
5. Phage display. *BioLabs*. 2010.
6. Ladner R, Sato A, Gorzelany J, de Souza M. (2004) Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov Today*, 9: 525-529.
7. Kruglov, A.A., Kuchmiy, A., Grivennikov, S.I. (2008) Physiological functions of tumor necrosis factor and the consequences of its pathologic overexpression or blockade: mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 231–244.
8. Zhang Q, Cui F, Fang L, Hong J, Zheng B, Zhang JZ. (2013) TNF- $\alpha$  impairs differentiation and function of TGF- $\beta$ -induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway. *Journal of Molecular Cell Biology*;5, 85–98.
9. Chui R, Dorovini-Zis K. (2010) Regulation of CCL2 and CCL3 expression in human brain endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *Journal of neuroinflammation*; 7 (1).
10. Zepp J, Wu Ling, Li X. (2011) IL-17 receptor signaling and T helper 17-mediated autoimmune demyelinating disease. *Trends in Immunology*; 32 (5): 232-239.
11. O'Rourke AM, Wang EY, Salter-Cid L, Huang L, Miller A, Podar E, Gao HF, Jones DS, Linnik MD. (2007) Benefit of inhibiting SSAO in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neural Transmission*; 114 (6):845-849.
12. Torres-Cardeña A. Obtención de fagopéptidos específicos para el receptor de TNF- $\alpha$ , el receptor de IL-17 y de VAP-1. Tesis de maestría. *Inmunología, ENCB-IPN* (2012).