



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LA UNIÓN DE PÉPTIDOS DERIVADOS DEL CARBOXILO
TERMINAL DE CETPI A LIPOPOLISACÁRIDOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

NADIA GUTIÉRREZ QUINTANAR

TUTOR PRINCIPAL

DR. JAIME MAS OLIVA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

DR. JUAN XICOHTENCATL CORTES
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS, UNAM

MÉXICO, D. F. OCTUBRE, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 <i>CETP y CETPI</i>	4
1.2 <i>Proteínas y péptidos de unión a lipopolisacáridos</i>	7
1.3 <i>Lipopolisacáridos</i>	10
1.4 <i>Respuesta inmunológica</i>	12
1.5 <i>Choque séptico</i>	15
2. HIPÓTESIS.....	17
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1 <i>Diseño del plásmido pUC57- CETP y pUC57-CETPI</i>	18
4.2 <i>Preparación de células competentes</i>	18
4.3 <i>Transformación de células competentes</i>	19
4.4 <i>Digestión del plásmido pUC57-CETP y pUC57-CETPI</i>	21
4.5 <i>Construcción del vector pIRESpuro3-CETP y pIRESpuro3-CETPI</i>	21
4.6 <i>Pruebas de fidelidad de la construcción de los vectores pIRESpuro3-CETP y pIRESpuro3-CETPI</i>	23
4.7 <i>Transfección con los vectores pIRESpuro3-CETP y pIRESpuro3-CETPI</i>	25
4.8 <i>Síntesis de péptidos derivados del C-terminal de CETP y CETPI</i>	27
4.9 <i>Producción de anticuerpos contra la región C-terminal de CETP y CETPI</i>	28
4.10 <i>Electroforesis en geles de gradiente de poliacrilamida</i>	29
4.11 <i>Ensayos de fluorescencia</i>	31
4.12 <i>Ensayos de interacción de cargas: Fuerza iónica</i>	31
4.13 <i>Ensayos de tratamiento de LPS con fosfatasa alcalina (AP)</i>	32
4.14 <i>Ensayos de fluorescencia en cultivo celular</i>	33
4.15 <i>Ensayos de viabilidad celular</i>	34
4.16 <i>Protocolo experimental en animales</i>	35
4.17 <i>Determinación de TNFα en suero de conejos</i>	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1 <i>Diseño del plásmido pUC57-CETP y pUC57-CETPI</i>	37
5.2 <i>Construcción de los vectores pIRESpuro3-CETP y pIRESpuro3-CETPI</i>	40
5.3 <i>Transfección con los vectores pIRESpuro3-CETP y pIRESpuro3-CETPI</i>	44
5.4 <i>Caracterización de la unión del péptido VSAK a lipopolisacáridos</i>	47
5.4.1 <i>Electroforesis en geles de gradiente de poliacrilamida</i>	47
5.4.2 <i>Ensayos de fluorescencia</i>	49
5.4.3 <i>Ensayos de interacción de cargas: Fuerza iónica</i>	50

5.4.4	<i>Ensayos con fosfatasa alcalina (AP)</i>	52
5.4.5	<i>Ensayos de fluorescencia en cultivo celular</i>	52
5.5	<i>Ensayos de viabilidad celular en presencia del péptido VSAK</i>	55
5.6	<i>Protocolo experimental en conejos</i>	57
5.7	<i>Determinación de TNFα en suero de conejos</i>	59
6.	DISCUSIÓN.....	60
7.	CONCLUSIONES	67
8.	PERSPECTIVAS.....	68
9.	REFERENCIAS	69
10.	PUBLICACIONES.....	73
10.1	<i>Capítulo del libro editado en el marco del 150 aniversario de la Academia Nacional de Medicina.</i>	73
10.2	<i>Artículo publicado: “Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity.”</i>	94
10.3	<i>Manuscrito en redacción: “The C-terminus Domain of CETPI Defines its Function as a New Plasma Lipopolysaccharide-Binding Protein”</i>	95
11.	PATENTE	138
12.	ANEXOS.....	143
12.1	<i>Esquema para la secuenciación de pIRESpuro3-CETP</i>	143
12.2	<i>Esquema para la secuenciación de pIRESpuro3-CETPI</i>	144
12.3	<i>Tabla de oligonucleótidos</i>	145
12.4	<i>Digestión con enzimas KpnI y EcoRV</i>	146

RESUMEN

Hace algunos años en nuestro laboratorio se descubrió la proteína CETPI, una nueva isoforma de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), cuya diferencia radica en la región de su carboxilo terminal (C-terminal). En CETP, los últimos 12 residuos forman una estructura hélice- α y se ha demostrado que este segmento de la proteína es de gran importancia para su función. De manera interesante, el carboxilo terminal de CETPI está constituido por 18 aminoácidos con un alto contenido de prolinas y aminoácidos con carga positiva, dando como resultado un segmento poco estructurado.

Al realizar alineamientos de secuencia y estructura tridimensional con proteínas que pertenecen a la misma familia de CETP, se encontró que CETPI comparte con la proteína bactericida/incrementadora de permeabilidad (BPI), los más importantes elementos estructurales incluyendo el plegamiento global en forma de boomerang. No obstante, su identidad de secuencia de aminoácidos es sólo del 16%. Debido a su similitud estructural y a que poseen un mayor número de aminoácidos con carga positiva en la parte cóncava en comparación con el carboxilo terminal de CETP, se propuso que esta nueva isoforma puede tener la capacidad de unión a lipopolisacáridos (LPS), que son componentes de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y se caracterizan por presentar cargas negativas. Cuando los LPS se encuentran libres en el torrente sanguíneo desencadenan una respuesta inflamatoria exacerbada. La inflamación puede generar que la circulación sanguínea sea deficiente y con ello la disfunción de órganos vitales, ocasionando que el organismo entre en choque séptico.

Por lo anterior, resultó de gran interés estudiar la función de la proteína CETPI que se encuentra en plasma, pero cuya síntesis se lleva a cabo en el intestino delgado. La hipótesis que se propuso fue que CETPI descrita por primera vez por nuestro laboratorio tiene la capacidad de unirse a los LPS. Para comprobarlo, fue necesario primero implementar las técnicas para la sobreexpresión y purificación de la proteína a partir de la construcción de un vector diseñado por nosotros para su traducción en células eucariontes. Sin embargo, debido a que por el método de transfección se obtuvieron bajos rendimientos para la purificación de la proteína, se decidió realizar una serie de experimentos utilizando péptidos derivados del C-terminal de CETPI, para así generar bajo otro enfoque un primer acercamiento sobre la importancia de la función fisiológica de esta proteína.

Para demostrar la interacción de los péptidos y los LPS, fue necesario establecer un protocolo en el que las propiedades de las moléculas no fueran modificadas para su estudio. Realizando electroforesis en geles nativos de gradiente de poliacrilamida e inmunotransferencia tipo Western blot, se evidenció que la unión ocurre y es mayor cuando se emplea el péptido de 18 aminoácidos (VSAK). Dicha unión se evaluó utilizando diferentes serotipos de LPS, se caracteriza por ser de tipo electrostático

y está determinada por la presencia de cargas negativas en el lípido A, el componente agonista de los LPS.

Por otra parte, se encontró que la unión del péptido VSAK a LPS no sólo ocurre bajo condiciones de cultivo celular sino que el péptido tiene la capacidad de bloquear la unión de los LPS con receptores celulares. Después de haber demostrado que el péptido no es tóxico en diferentes tipos celulares, se probó el péptido VSAK en un modelo experimental piloto desarrollado en conejos a los que se les indujo choque séptico mediante la administración de LPS. El experimento demostró una tendencia del péptido VSAK en el control del incremento en la temperatura de los animales en comparación con el grupo al que se le administraron LPS únicamente. Adicionalmente, los resultados obtenidos de las muestras de suero de los conejos sugieren que el péptido VSAK es capaz de disminuir la producción de la citocina proinflamatoria TNF α .

Con base en los resultados obtenidos, consideramos que el trabajo de investigación de ciencia básica realizado en el laboratorio puede extrapolarse a la innovación tecnológica que permita el uso de péptidos derivados del C-terminal de CETPI en la creación de un tratamiento para la protección contra los efectos nocivos de los LPS y el desarrollo de choque séptico. Además, el presente trabajo proporciona evidencia experimental para fundamentar la propuesta de que la nueva proteína CETPI descrita por primera vez en nuestro laboratorio, puede estar involucrada en un mecanismo fisiológico natural de protección contra los LPS.

ABREVIATURAS

BPI: Proteína bactericida/incrementadora de permeabilidad

BSA: Albúmina Sérica Bovina

C-terminal: Carboxilo terminal

CETP: Proteína transferidora de ésteres de colesterol

CETPI: Isoforma I de la proteína transferidora de ésteres de colesterol

CHO-S: Células de ovario de hámster chino adaptadas para crecimiento en suspensión

DE: Desviación estándar

EE: Error estándar

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EOC: Línea celular derivada de microglía

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HEK-293: Línea celular derivada de riñón

HepG2: Línea celular derivada de hígado

LBP: Proteína de unión a lipopolisacáridos

LPS: Lipopolisacáridos

μ H: Momento hidrofóbico

MTT: Ensayo de reducción de la molécula 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) 2,5 bromuro difeniltetrazolio

PLTP: Proteína transferidora de fosfolípidos

PLUNC: Clon proteico palatino pulmonar y del epitelio nasal

PmB: Polimixina B

RAW: Línea celular de macrófagos

SFB: Suero fetal bovino

TLR: Receptor tipo toll

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *CETP* y *CETPI*

Con base en estudios filogenéticos, hace más de una década se caracterizó una familia de proteínas denominada PLUNC (clon proteico palatino pulmonar y del epitelio nasal) que incluye a proteínas asociadas con funciones inmunológicas, así como proteínas relacionadas con la unión y transporte de lípidos. En esta familia se encuentran las proteínas LBP (proteína de unión a lipopolisacáridos), BPI (proteína bactericida/incrementadora de permeabilidad), PLTP (proteína transferidora de fosfolípidos) y CETP (proteína transferidora de ésteres de colesterol). Tanto LBP como BPI juegan un papel importante en los mecanismos regulatorios directamente asociados con la unión a LPS, mientras que CETP y PLTP son dos proteínas clave en el transporte de lípidos entre lipoproteínas en el plasma¹⁻³.

CETP es una proteína plasmática secretada principalmente por el hígado, que promueve la transferencia de ésteres de colesterol y triglicéridos entre lipoproteínas. Estudios de delección y mutagénesis sitio específica han mostrado que el dominio C-terminal de CETP (E₄₆₅-S₄₇₆) estructurado como una hélice- α anfipática corresponde a una región crítica para la transferencia de lípidos⁴. En el laboratorio, se ha propuesto que este dominio tiene la propiedad de facilitar a través de transiciones desorden-al-orden la desorción de lípidos sobre la superficie de lípidos en la forma de micelas, mecanismo a través del cual CETP podría llevar a cabo su función^{5,6}.

De forma interesante, con base en estudios realizados en nuestro laboratorio, se describió la expresión de una nueva isoforma de CETP en conejos a la que se denominó CETPI y cuya secuencia es de 491 aminoácidos. Esta proteína es sintetizada exclusivamente en el intestino delgado y se ha identificado en el plasma humano ⁷. CETPI se diferencia de CETP en que no tiene el exón 16, y 54 bases contenidas en el intrón 15 forman parte del nuevo mRNA característico de CETPI, que en consecuencia sustituye los 24 residuos del extremo carboxilo terminal presentes en CETP por una secuencia de 18 aminoácidos con un alto contenido en prolinas y residuos con carga positiva ⁷. Esta característica implica la sustitución de la estructura hélice- α clave del carboxilo terminal de CETP por una estructura secundaria que con base en estudios de predicción puede mantenerse desordenada en CETPI ⁶.

Como se ha comentado, CETP pertenece a la familia de proteínas PLUNC entre las que se encuentra la proteína BPI. Particularmente, CETP y BPI comparten los más importantes elementos estructurales, incluyendo el plegamiento global en forma de boomerang, así como la simetría y arquitectura de los dominios amino y carboxilo ⁸, a pesar de que su identidad de secuencia de aminoácidos es solo del 16%. No obstante, en la superficie cóncava tanto BPI como la nueva isoforma CETPI no tienen el dominio clave hélice- α situado en el carboxilo terminal, y en su lugar ambas proteínas presentan un alto contenido de aminoácidos con carga positiva. En BPI, la distribución de cargas positivas a lo largo de la superficie

cóncava de la proteína es importante para su función asociada con la unión a LPS¹ (Figura 1).

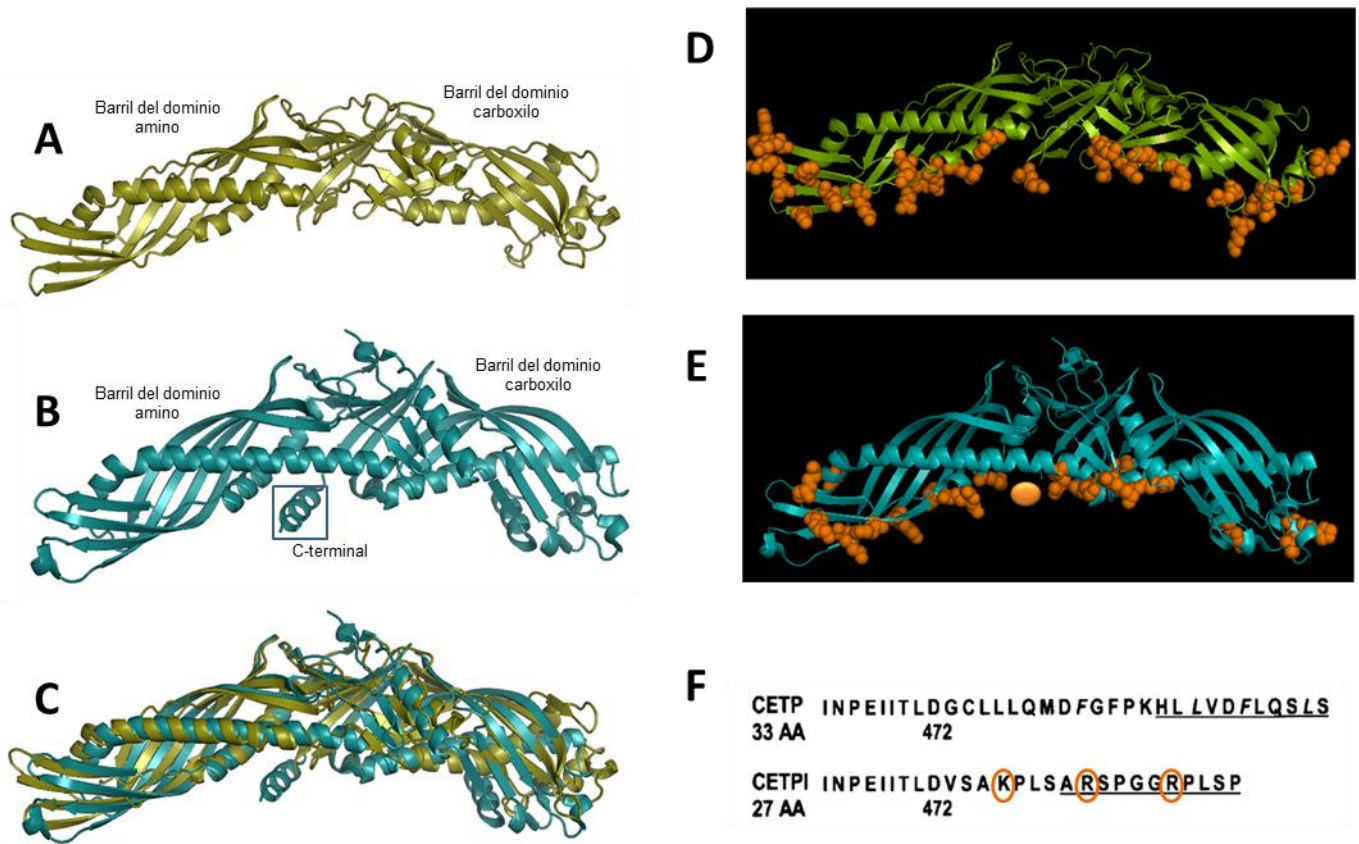


Figura 1. Estructura cristalográfica de las proteínas BPI (A) y CETP (B). El alineamiento estructural demuestra un alto grado de similitud estructural (C). Del lado derecho, con esferas naranjas se destaca la presencia de aminoácidos con carga positiva en las proteínas (D) y (E). Considerando que CETPI se diferencia de CETP en la secuencia de aminoácidos del carboxilo terminal, en el panel (F) se encierran con naranja los aminoácidos con carga positiva presentes en CETPI y no en CETP, dichos aminoácidos están representados en la figura (E) por la elipse naranja central. Imágenes obtenidas del Protein Data Bank, CETP: 2obd; BPI: 1bp1.

1.2 Proteínas y péptidos de unión a lipopolisacáridos

Como parte del sistema de inmunidad innata, los LPS deben estar unidos a una proteína que trabaje como una molécula presentadora, para que así sean reconocidos por su receptor en la superficie celular. En el ser humano, dos proteínas clave para la mediación de la respuesta a la presencia de LPS en circulación son BPI y LBP. Estas proteínas como se ha mencionado pertenecen a la misma familia y su estructura es similar, sin embargo sus funciones son antagónicas. LBP al unirse a los LPS favorece la respuesta celular, mientras que BPI al unirse a los LPS reduce la respuesta celular³. De manera interesante, BPI tiene una mayor afinidad por los LPS, por lo que se ha propuesto que tiene la capacidad de prevenir la formación del complejo LBP-LPS y disminuir los efectos proinflamatorios⁹.

BPI es una proteína citoplasmática que se encuentra en los gránulos primarios (azurófilos) de neutrófilos, y tiene actividad antimicrobiana selectiva hacia bacterias Gram-negativas¹⁰. Estudios realizados con esta proteína sugieren que en el torrente sanguíneo favorece la agregación de los LPS¹¹. Particularmente, la proteína BPI puede favorecer tres efectos:

- I. Actividad bactericida a través de la interrupción secuencial de la membrana bacteriana externa e interna

- II. Actividad neutralizadora de endotoxinas, formando complejos con los LPS, y bloqueando la interacción con los receptores del huésped.
- III. Opsonización de las bacterias, de manera que se mantiene incrementada la fagocitosis ¹¹.

BPI presenta actividad contra diferentes tipos de bacterias Gram-negativas en concentraciones nanomolares, reflejando una alta afinidad por el lípido A de los LPS y en consecuencia una potente actividad neutralizadora. De hecho, se ha reportado su expresión en células epiteliales del tracto gastrointestinal, la cavidad oral y el tracto genitourinario, características por las que BPI ha sido muy utilizada en estudios clínicos ¹².

Uno de los mecanismos de acción que se han propuesto para la función de proteínas que interaccionan con LPS, como BPI o LBP, es desplazando de la membrana bacteriana cationes bivalentes como el calcio y el magnesio ⁹. En este sentido, mediante el estudio tanto de péptidos derivados de estas proteínas como de péptidos diseñados, se ha demostrado que las interacciones electrostáticas así como la hidrofobicidad son características clave para la unión de los péptidos al lípido A de los LPS ¹³.

De manera interesante, péptidos con estas características han demostrado ser capaces de ocasionar la disrupción de los agregados de LPS, lo que se ha correlacionado con su acción antimicrobiana y sus propiedades

inmunomoduladoras del efecto endotóxico ¹⁴. Adicionalmente, se ha reportado que la presencia de residuos con carga positiva en la secuencia de estos péptidos es de gran importancia, ya que favorece su afinidad por los LPS con carga negativa atribuida a sus grupos fosfato. Sin embargo, la estructura secundaria del péptido también juega un papel importante en la unión ^{13,15}.

El mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos es diverso, actúan sobre la membrana bacteriana u otros blancos no específicos, contrario a lo que ocurre con los antibióticos que actúan sobre proteínas específicas. Por lo anterior, los péptidos pueden ofrecer una nueva opción terapéutica en una era con problemas crecientes asociados con la resistencia a antibióticos y la incidencia de problemas de inflamación aguda y crónica. No obstante, aún no se cuenta con un potencial tratamiento contra infecciones sistémicas generadas por bacterias Gram-negativas¹⁶.

Las razones por las que ocurre esto están relacionadas con los costos y la estabilidad estructural del péptido, lo que se ha traducido en la necesidad de reducir el número de aminoácidos en el péptido para incrementar su estabilidad química y evitar que sean degradados por peptidasas durante las etapas de síntesis o bien una vez que han sido administrados, sin que esto modifique su eficacia y sigan manteniendo baja toxicidad ¹³.

1.3 Lipopolisacáridos

Los LPS son glucolípidos fosforilados que forman parte estructural de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas exclusivamente (Figura 2 A y B). La descripción de los LPS se puede realizar identificando cuatro componentes: el lípido A, un núcleo interno, un núcleo externo y el antígeno O (Figura 2 C). El lípido A está integrado por un esqueleto de diglucosamina 1,4-bifosforilada al cual están unidas cadenas acilo y que se ancla a los fosfolípidos de la monocapa externa de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas¹⁷⁻¹⁹.

Dentro de la misma molécula de LPS, el núcleo interno está conformado por dos o más carbohidratos del tipo 2-ceto-3-ácido deoxioctónico (KDO) que se unen a las glucosaminas del lípido A, así como dos o tres heptosas (L-glicero-D-manoheptosa) unidas al KDO, siendo ambos carbohidratos únicos de bacterias. Sin embargo, el núcleo externo tiene una composición más variable y está integrado por carbohidratos comunes. El antígeno O se mantiene unido al carbohidrato terminal del núcleo externo, sobresale de la pared bacteriana y es altamente inmunogénico. Aunque el antígeno O está compuesto por unidades repetidas de oligosacáridos comunes, pueden existir diversas variantes entre especies y entre cepas bacterianas en relación al tipo de carbohidratos que lo conforman¹⁷.

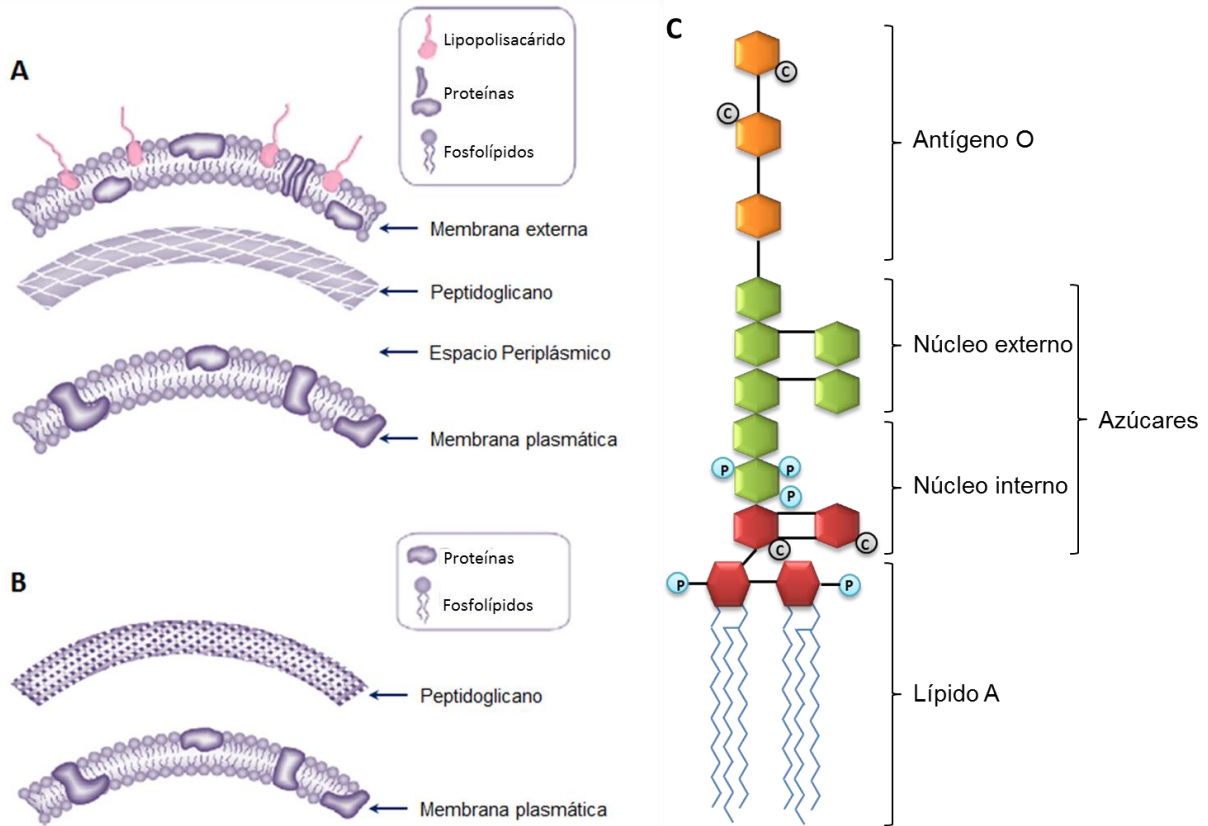


Figura 2. Esquema de la pared celular de bacterias Gram-negativas **(A)** y Gram-positivas **(B)**. Estructura de los LPS, identificando sus componentes más importantes **(C)**. Figura adaptada a partir de Schmidtchen y Malmsten, 2013.

Cada una de las especies de bacterias Gram-negativas tienen LPS únicos, y muchas de estas variantes pueden residir en el lípido A. No obstante, las cadenas acilo de los LPS siempre están embebidas en la pared celular externa de la bacteria, quedando expuestas únicamente las glucosaminas fosforiladas del lípido IVA. Con base en experimentos que conducen a la modificación de las glucosaminas, se demostró que su actividad endotóxica disminuye, por lo que se considera que son involucradas en la actividad agonista de los LPS ^{17,20}.

Cuando los LPS se encuentran incorporados a la bacteria no son tóxicos, pero una vez que son liberados de la pared bacteriana hacia el torrente sanguíneo se les consideran endotoxinas debido a la exacerbada respuesta inflamatoria que desencadenan, ocasionando el desarrollo de choque séptico y en muchas ocasiones la muerte ²¹.

1.4 Respuesta inmunológica

Charles Janeway acuñó a finales de 1980 el término inmunidad innata y propuso la existencia de receptores con patrones de reconocimiento específicos contra patógenos ²². A partir de entonces y durante muchos años la respuesta inmune innata fue considerada relativamente sencilla comparada con la respuesta inmune adquirida, sin embargo hoy en día se sabe que es un proceso biológico complejo en el que las interacciones proteína-proteína son de gran importancia²³. En las células de mamífero la respuesta inmunológica a los LPS inicia con la interacción de proteínas séricas como LBP y receptores específicos y/o proteínas de unión del sistema inmune tales como CD14 soluble (sCD14) en células mieloides y CD14 de unión a membrana (mCD14) presente en células endoteliales y epiteliales, lo cual da lugar a la activación celular a través de la vía del receptor tipo toll 4 (TLR4)-MD-2 ^{17,24-26}.

Los receptores tipo toll (TLRs) son proteínas transmembranales que después de su unión al ligando microbiano se oligomerizan, reclutando adaptadores de señal

específicos para los dominios citoplasmáticos del receptor toll de la interleucina-1 (IL-1). Dichos adaptadores dan inicio a una cadena de reacciones de fosforilación y ubiquitinación. En particular, el receptor TLR-4 se acopla a dos proteínas adaptadoras: MyD88 (Factor de Diferenciación Mieloide 88) capaz de inducir la producción de citocinas proinflamatorias, y TRIF que es una proteína adaptadora con dominio TIR que induce al interferón beta así como la producción de citocinas proinflamatorias (Figura 3)^{25,27}.

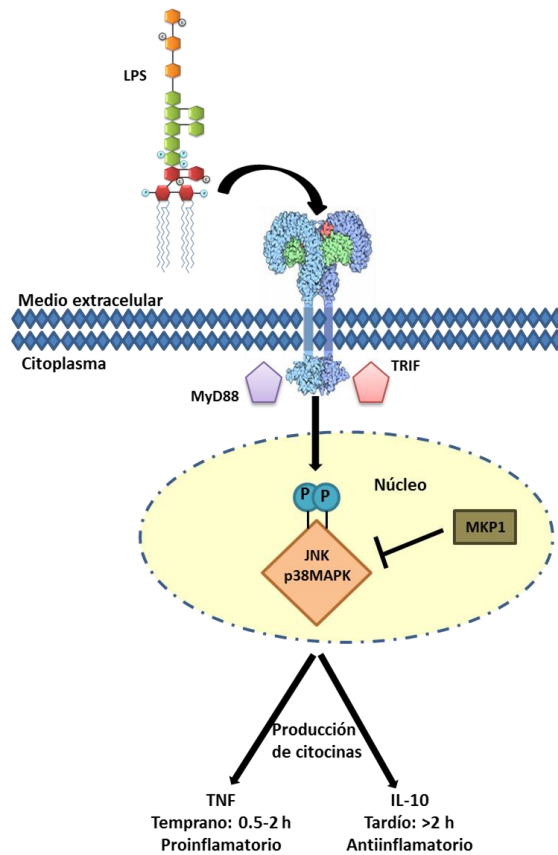


Figura 3. Respuesta inmune a LPS mediada por el receptor TLR-4. La unión del lipopolisacárido a TLR-4, induce el acoplamiento de las proteínas MyD88 y TRIF en el dominio citoplasmático del receptor. Estas proteínas reclutadas, inician cadenas de señalización que favorecen a la liberación de citocinas. En la imagen únicamente se representan TNF e IL-10 como ejemplo de los estados porinflamatorio o antiinflamatorio. Figura adaptada a partir de Dickinson y Keyse, 2006.

Uno de los tipos celulares en los que se expresan los TLR son los macrófagos, que forman parte del sistema retículoendotelial y son los encargados de la respuesta primaria contra microorganismos. Los macrófagos eliminan a los microorganismos invasores, evitan su proliferación y obstaculizan la disgregación de sus componentes tóxicos. Ante el estímulo de LPS, generalmente son liberados mediadores de la inflamación tales como TNF α (Factor de Necrosis Tumoral alfa), IL-1, IL-6, eicosanoides, factor activador de plaquetas (PAF), NO y especies reactivas de oxígeno (Figura 4) ^{17,28}.

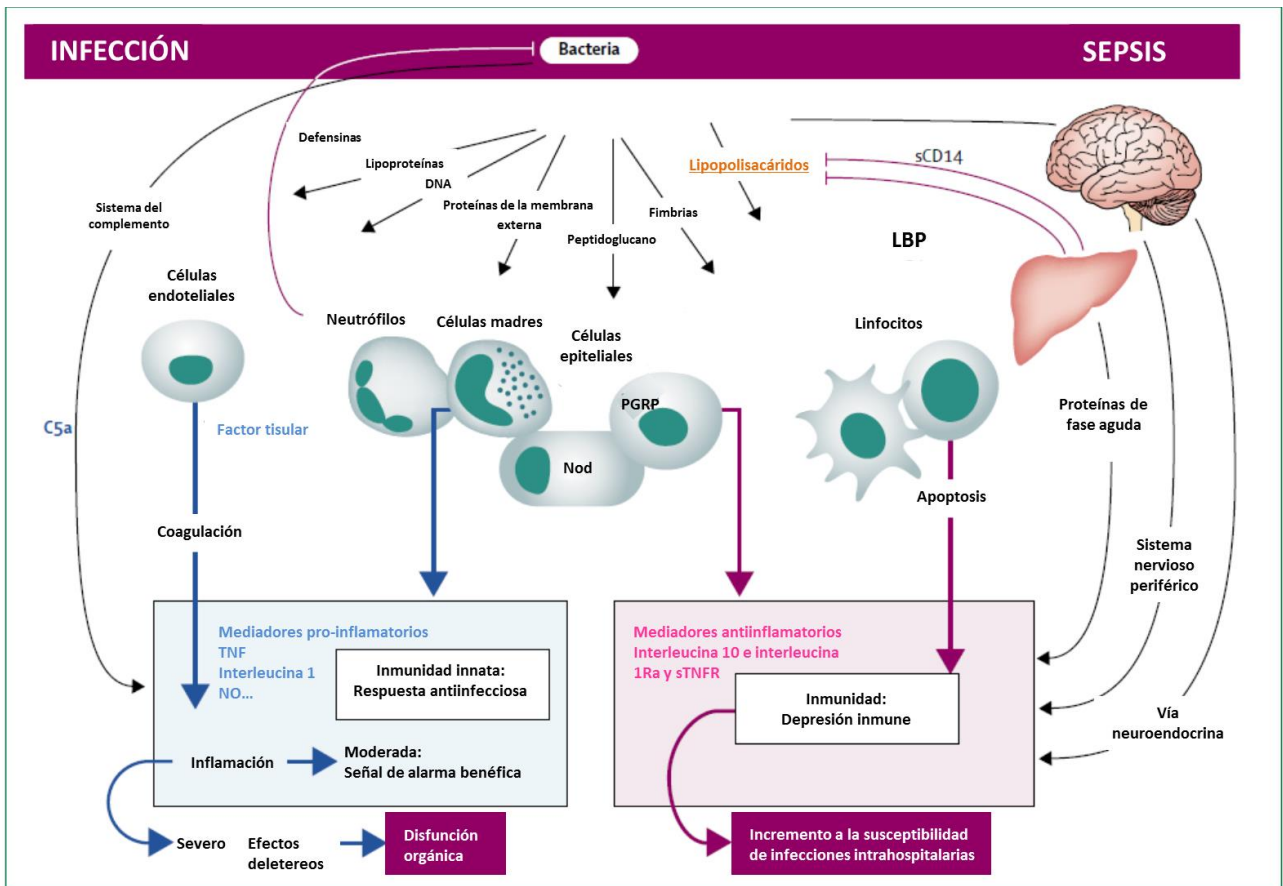


Figura 4. Representación esquemática de los efectos fisiológicos ocasionados por la respuesta inmunológica ante el desarrollo de una infección. Figura adaptada a partir de Annane, Bellissant y Cavaillon, 2005.

La proteína LBP al unirse a los LPS facilita la asociación del lípido A con CD14, de manera que posteriormente este nuevo complejo LBP-lípido A-CD14, entra en contacto con MD-2-TLR4 de macrófagos ^{29,30}. A pesar de que se ha propuesto que BPI puede contribuir en la regulación de la respuesta proinflamatoria originada por LBP, durante el desarrollo de una infección sistémica la subsecuente producción de altas cantidades de IL-1 y TNF α que son liberadas a la circulación, generan hipotensión y choque séptico^{15, 31}.

Otro receptor capaz de reconocer a los LPS es el receptor scavenger clase A (SR-A). Se propone que la unión al receptor scavenger puede ser un mecanismo de protección, eliminando el exceso de microorganismos o sus componentes, previniendo así la unión a CD14 y el subsecuente desarrollo de choque séptico, razón por la cual el SR-A puede considerarse un receptor anti-inflamatorio ¹⁷.

1.5 Choque séptico

Como se mencionó en el apartado anterior, la respuesta celular contra bacterias o sus componentes, conlleva a la liberación de una serie de mediadores de la inflamación (citocinas) que inducen la vasodilatación y la sobreexpresión de moléculas de adhesión. En consecuencia, se desencadenan una serie de condiciones como la disminución del ritmo cardiaco, extravasación de neutrófilos y monocitos, activación de leucocitos, linfocitos y células endoteliales. Se ha

propuesto que además de la estimulación de la coagulación por citocinas, los componentes bacterianos interactúan directamente con el sistema de coagulación y en caso de diseminarse esto ocasiona hipoperfusión e hipoxia ³².

Además de la hipoperfusión, la mucosa de la barrera intestinal se ve afectada con la translocación de las bacterias a los nódulos linfáticos mesentéricos, y bajo condiciones de estrés se dirige a otros órganos y a la circulación ³². Dentro de los órganos que pueden resultar afectados se encuentran los pulmones, hígado y riñones, cuya disfunción en conjunto con la presencia de hipoxia es un estado característico de pacientes con choque séptico ³³.

En la práctica clínica, el choque séptico es definido como un síndrome de respuesta de inflamación sistémica que se complica por la presencia de hipotensión. El primer indicio para el diagnóstico de la presencia de una infección en los pacientes es el incremento en la temperatura corporal, que está relacionada con la respuesta fisiológica temprana a la presencia de LPS. Sin embargo a pesar de realizar el diagnóstico, en muchas ocasiones la respuesta inmunológica exacerbada del organismo ocasiona el desarrollo de choque séptico. Este padecimiento es una de las principales causas de muerte en las unidades de cuidado intensivo, en donde una tercera parte de los casos son originados por infecciones ocasionadas por bacterias Gram-negativas y actualmente no existe un tratamiento eficaz para conterrestarlo ³³⁻³⁶.

2. HIPÓTESIS

- ❖ La nueva proteína CETPI descrita por primera vez en nuestro laboratorio tendrá la capacidad de unirse a los LPS y esta propiedad estará determinada por la secuencia de la región del carboxilo terminal de la proteína.
- ❖ Péptidos derivados de la región del carboxilo terminal de CETPI presentarán la capacidad de unirse a los LPS y podrán generar un efecto protector contra la toxicidad originada por los LPS tanto *in vitro* como *in vivo*.

3. OBJETIVOS

- ❖ Sobreexpresar en células eucariontes la proteína CETPI y purificarla.
- ❖ Estudiar la propiedad de unión de péptidos derivados del carboxilo terminal de CETPI a los LPS a través de ensayos bioquímicos, espectrofotométricos e inmunoenzimáticos.
- ❖ Caracterizar la unión del péptido VSAK a los LPS en condiciones de cultivo celular.
- ❖ Evaluar el efecto del péptido VSAK en un experimento piloto de choque séptico utilizando al conejo como animal experimental.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 *Diseño del plásmido pUC57- CETP y pUC57-CETPI*

Mediante la consulta de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), a la secuencia nucleotídica de los genes codificantes para las holoproteínas CETP y CETPI de conejo *in silico* se les adicionó la presecuencia de exportación MLAATVLTLLGNAH del gen codificante para CETP de humano, con la finalidad de asegurar que las proteínas fuesen exportadas al medio extracelular.

A través del servicio proporcionado por GenScript (Piscataway, E.U.) se llevó a cabo la optimización de las secuencias de nucleótidos considerando el tipo celular CHO-S (células de ovario de hámster chino adaptadas para crecimiento en suspensión, ATCC). Dichas secuencias fueron recibidas como parte del vector pUC57.

4.2 *Preparación de células competentes*

Una asada de células de *Escherichia coli* DH5 α fue inoculada en 5 mL de medio LB y se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación de 250 rpm. Posteriormente, en tubos eppendorf de 15 mL se inocularon 6 mL de medio SOC (bactotripton 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.05%, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) con 100 μ L del cultivo primario. Los tubos permanecieron

a 37 °C con agitación de 250 rpm hasta obtener una densidad óptica de 0.5, medida a una longitud de onda de 500 nm. El cultivo resultante fue colocado en hielo durante 10 min, se centrifugó a 1500 rpm a 4°C durante 12 min y la pastilla se resuspendió con 0.8 mL de amortiguador TFBI frío (Acetato de potasio 30 mM, pH 5.8, RbCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 50 mM, glicerol 15%). Se incubó en hielo por 15 min, posteriormente se centrifugó a 2300 rpm a 4°C durante 12 min, la pastilla fue resuspendida en 0.8 mL de TBFII frío (MOPS 10 mM, pH 6.5, RbCl mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol 15%) y se incubó en hielo por 15 min. La suspensión se distribuyó en alícuotas de 50 µL y fueron almacenadas a -70°C.

4.3 Transformación de células competentes

Una alícuota de células competentes DH5α fue descongelada lentamente en hielo. En un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL se mezclaron 25 µL de la suspensión celular con 23.23 nM de plásmido pUC57-CETP y 12.78 nM de pUC57-CETPI (Figura 5). Los tubos se incubaron en hielo durante 30 min, posteriormente las células fueron sometidas a choque térmico de 42°C durante 90 s e inmediatamente incubadas en hielo por 5 min. Se agregaron 500 µL de medio SOC a cada tubo y se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm durante 4 h. Se centrifugaron los tubos con el crecimiento bacteriano a 8,000 rpm durante 3 min, una vez retirado el sobrenadante, la pastilla se resuspendió con 100 µL de medio LB conteniendo 100 µg/mL de ampicilina. A continuación, las bacterias se

sembraron en cajas LB-Agar con la misma concentración de antibiótico y permanecieron a 37°C durante toda la noche.

De las colonias obtenidas en las cajas, se seleccionó una de cada plásmido, se inocularon en 5 mL de medio SOC con 100 µg/µL de ampicilina y se incubaron a 37°C con 250 rpm durante toda la noche. Al día siguiente el crecimiento bacteriano fue inoculado en 500 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/µL, y nuevamente se incubó durante 12 h a 37°C con una agitación de 250 rpm. Para la subsecuente purificación de los plásmidos por lisis alcalina se empleó el kit QIAGEN siguiendo las instrucciones del proveedor.

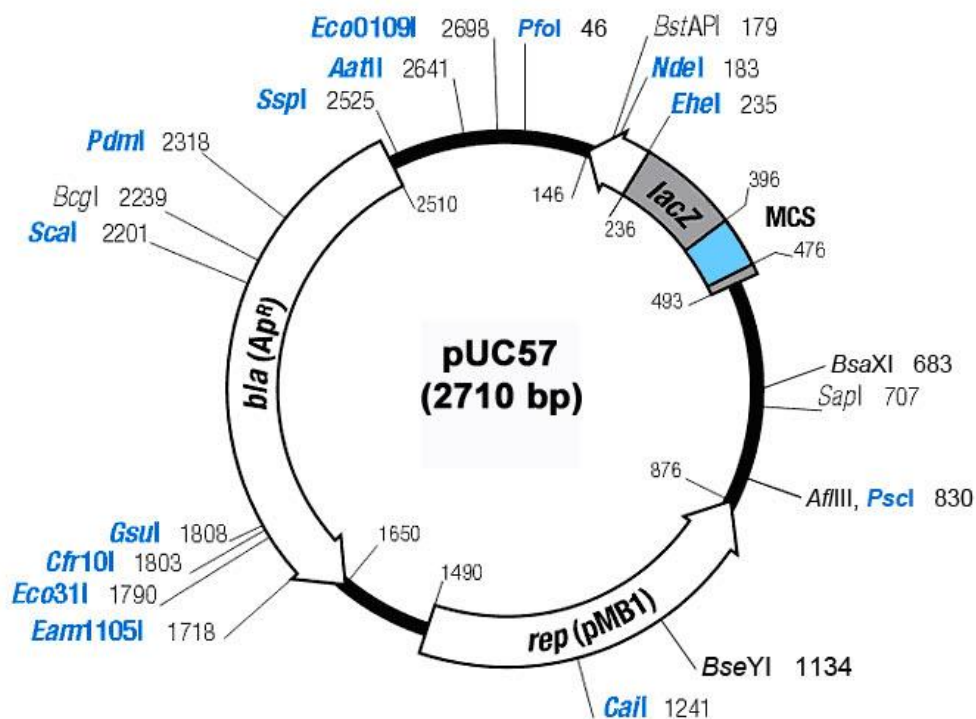


Figura 5. Mapa del vector pUC57 de la marca comercial GenScript. Sitio de clonación múltiple (MCS); Gen de resistencia a ampicilina (bla(Ap^R)).

4.4 Digestión del plásmido pUC57-CETP y pUC57-CETPI

Después de la purificación del plásmido, la cantidad obtenida fue determinada haciendo uso del NanoDrop (Thermo Scientific). Posteriormente, para la liberación de los insertos de interés fue necesario hacer una doble digestión, colocando en un volumen total de 50 μ L de reacción 26.5 nM de DNA y las enzimas EcoRI y BamHI (New England, BioLabs) de acuerdo a las especificaciones proporcionadas por el proveedor, dejando actuar la reacción 4 h a 37°C. Por medio de electroforesis en gel de agarosa al 4%, se resolvieron los fragmentos plasmídicos y la banda correspondiente al inserto liberado se cortó del gel para purificar el DNA, utilizando el producto QIAEXII Gel Extraction Kit (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del manual proporcionado por la empresa.

4.5 Construcción del vector pIRESpuro3-CETP y pIRESpuro3-CETPI

Para llevar a cabo la inserción de las secuencias de interés al vector pIRESpuro3 (Figura 6), se digirió este vector con las enzimas EcoRI y BamHI, por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, la banda correspondiente al plásmido linearizado fue observada y se cortó para su purificación con QIAEXII Gel Extraction Kit (QIAGEN).

Después de la purificación del DNA correspondiente a los insertos y al vector pIRESpuro3, se prosiguió a hacer la reacción de ligación. La enzima T4 DNA

ligasa (New England, BioLabs) se utilizó de acuerdo a los protocolos del proveedor en un volumen total de reacción de 20 μ L, considerando una relación del vector con el inserto de 1:3, e incubando 16 h a temperatura ambiente.

Al día siguiente, por cada una de las reacciones de ligación pRESpuro3-CETP y pRESpuro3-CETPI, 50 μ L de células competentes DH5 α fueron transformadas siguiendo la metodología que se describió anteriormente, solo que en esta ocasión se dejaron las cajas de LB-Agar en incubación a 37°C por 24 h. A partir de la obtención de colonias bacterianas en estas cajas se prosiguió a hacer una resiembra para su propagación bajo las mismas condiciones. De este nuevo crecimiento, una asada inoculada en 5 mL de medio de cultivo SOC con 200 μ g/ μ L de ampicilina, se incubó durante 16 h a 37°C con una agitación de 250 rpm. Posteriormente, los 5 mL de medio con crecimiento bacteriano fueron vertidos en 500 mL de medio LB con 200 μ g/ μ L de ampicilina y se dejó incubar 8 h a 37°C con agitación de 250 rpm. La purificación del DNA plasmídico de los vectores pRESpuro3-CETP y pRESpuro3-CETPI se llevó a cabo con el producto Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del mismo.

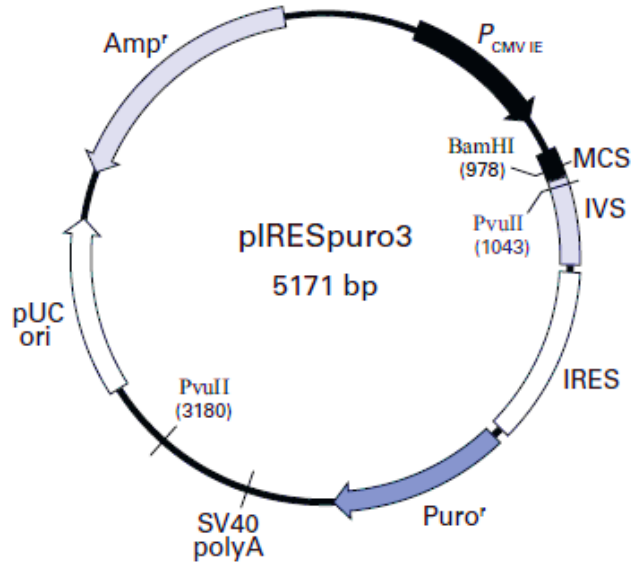


Figura 6. Mapa del vector pIRESpuro3 de la marca comercial Clontech. Las características importantes de señalar son: Sitio de clonación múltiple (MCS), promotor del gen de sitio de unión interna al ribosoma ($P_{CMV IE}$), gen de resistencia a ampicilina (Amp^r), gen de resistencia a Puromicina ($Puro^r$).

4.6 Pruebas de fidelidad de la construcción de los vectores pIRESpuro3-CETP y pIRESpuro3-CETPI

Los plásmidos ya purificados fueron empleados en reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos para la amplificación de segmentos de las construcciones. En un volumen total de reacción de 12.5 μ L, se utilizaron 5 U/ μ L de Taq Polimerasa (New England, BioLabs), 2.9 nM de DNA y 0.2 pM de oligonucleótidos sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. La reacción de PCR consistió en un ciclo de desnaturalización de 94°C por 5 min, 35 ciclos de la secuencia de 94°C por 45 s, 55°C por 45 s, 72°C por 2 min y finalmente para terminar la reacción, un ciclo de 10 min a 72°C. Para el análisis de

los resultados se realizó electroforesis en gel de agarosa al 4%, cargando en cada pozo el volumen total de cada una de las reacciones.

Por otra parte, se hicieron reacciones de digestión con las enzimas EcoRV y KpnI (New England, BioLabs) considerando un volumen total de 20 μ L y 18.25 nM de DNA. De acuerdo con las especificaciones de la compañía, la reacción fue incubada durante toda la noche a 37°C por 4 h, e inactivada con 6 μ L de EDTA 100 mM pH 8. Mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, colocando en el pozo la mitad del volumen de la reacción, se corroboró que el tamaño de los fragmentos correspondiera a lo estimado *in silico* con el programa NEBcutter (New England BioLabs).

Como última prueba, los vectores pIRESpuro3-CETP y pIRESpuro3-CETPI fueron enviados a secuenciar al Instituto de Biotecnología (UNAM), utilizando oligonucleótidos específicos. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias diseñadas *in silico*, corroborando a la vez que el marco de lectura para la traducción de la proteína estuviera en fase, utilizando del portal ExPASy (<http://expasy.org/tools/>) los programas ClustalW2 y BLAST-NCBI.

4.7 Transfección con los vectores *pIRESpuro3-CETP* y *pIRESpuro3-CETPI*

Se probaron diversas condiciones para la transfección de células de ovario de hámster chino (CHO-S, ATCC) considerando variaciones de confluencia, crecimiento adherente y en suspensión, la relación DNA:Lipofectamina, tiempo de formación de complejos, tiempo de exposición de los complejos con las células, tiempo de recuperación después de la transfección, dosis de Puromicina para la selección de clones y tiempo de exposición.

En cajas para cultivo celular de 60 mm, las células permanecieron con medio D-MEM/F-12 hasta alcanzar una confluencia del 95% y un día antes del ensayo, se recambió el medio por OptiMEM sin antibióticos. La formación de los complejos para la transfección, se llevó a cabo incubando durante 5 min a temperatura ambiente 20 μ L de Lipofectamine $\text{\textcircled{R}}$ 2000 (Invitrogen) con 500 μ L de medio OptiMEM y posteriormente mezclando esta solución con 17.5 nM de DNA resuspendidos en 500 μ L de OptiMEM. La disolución final se dejó incubando 40 min a temperatura ambiente y a continuación se administró a las células mantenidas en medio OptiMEM sin antibióticos. Después de 6 h, el medio de cultivo se sustituyó por nuevo medio D-MEMF-12 sin antibióticos ni SFB. Pasadas 24 h de haber realizado la transfección, se recuperó el sobrenadante, se centrifugó a 15,000 rpm durante 1.5 min, conservando el sobrenadante.

Se realizaron experimentos similares con diferentes líneas celulares crecidas en su respectivo medio de cultivo, HepG2 (derivadas de hígado, ATCC) en medio D-MEM con 1 mM de piruvato de sodio y 10% de SFB, Caco2 (derivadas de colon, ATCC) en medio MEM 20% SFB, RAW (macrófagos, ATCC) en medio RPMI con 10% SFB, HEK-293 (derivadas de riñón, ATCC) en medio D-MEM con 10% SFB.

Una vez recuperado el medio extracelular (10 mL), se concentró utilizando el sistema Amicon (Merck Millipore) con una membrana con poro de 10 kDa hasta obtener un volumen final de 200 μ L. Los medios concentrados se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10%. La transferencia a membranas de PVDF y la sobreexpresión fue evaluada por la técnica de inmunotransferencia tipo Western blot optimizada para la detección de las proteínas CETP y CETPI.

Para CETP la membrana se bloqueó durante toda la noche a 4°C utilizando una solución de leche descremada al 5% p/v, Tris-salino (TBS) pH 7.6 (Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM) y Tween al 0.1% v/v. Por la mañana, se incubó por 2 h a 33°C más 2 h a 37°C, en solución de bloqueo con el anticuerpo monoclonal anti-CETP en una dilución 1:500. Se realizaron 3 lavados de 15 min con solución de bloqueo. En una dilución 1:5,000 del anticuerpo secundario de cabra anti-ratón IgG acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Santa Cruz Biotechnology) en solución de bloqueo sin leche, se incubó la membrana por 2 h a 37°C. Se hicieron 3 lavados de 15 min y un último de 25 min con solución de bloqueo sin leche.

Para la detección de CETPI, la membrana se incubó por 3 h a 4°C más 2 h a temperatura ambiente, en una dilución 1:4,000 del anticuerpo policlonal anti-CETPI en solución de bloqueo con Tween al 1%. Se hicieron 5 lavados de 15 min con solución de bloqueo con Tween al 1%. Con una dilución 1:20,000 del anticuerpo secundario acoplado a HRP en solución de bloqueo Tween al 1%, la membrana fue incubada durante 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados de 15 min con solución de bloqueo Tween al 1% sin leche, 2 lavados de 15 min con solución TBS/NaCl 0.5M/SDS 0.2% y un último lavado de 10 min con la misma solución.

El revelado para la detección de ambas proteínas se llevó a cabo con quimioluminiscencia (Immobilon Western, Millipore) y exponiendo placas radiográficas a las membranas ya tratadas. Con la finalidad de descartar la unión inespecífica de los anticuerpos se usó como control albúmina sérica bovina (BSA).

4.8 Síntesis de péptidos derivados del C-terminal de CETP y CETPI

Dos péptidos correspondientes al carboxilo terminal de la proteína CETPI fueron sintetizados por la compañía GenScript. El péptido denominado ARS de 11 aminoácidos (⁴⁸¹ARSPGGRPLSP⁴⁹¹) y el péptido VSAK que se compone de los últimos 18 aminoácidos (⁴⁷⁴VSAKPLSARSPGGRPLSP⁴⁹¹) (Tabla 1). Los péptidos

liofilizados se disolvieron a una concentración de 1 mg/mL en amortiguador de carbonato de amonio (pH 9.5) para una dilución final 1:5.

Adicionalmente fueron utilizados como control péptidos correspondientes al carboxilo terminal de CETP, sintetizados por la compañía GenScript. El péptido nativo hélice-X (⁴⁶⁵EHLLVDFLQSL⁴⁷⁶) y hélice-Z (⁴⁶⁵EHLLV~~M~~FLQSL⁴⁷⁶) con la mutación D₄₇₀N. Una pureza mayor al 98% fue corroborada por espectrometría de masas y cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), llevada a cabo por la empresa proveedora.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos

Características	helix-X	helix-Z	ARS	VSAK
Número de residuos	12	12	11	18
Peso molecular (Da)	1399.8	1399.6	1094.2	1774
Punto isoelectrico	4.17	5.13	12.4	12.41
Hidrofobicidad (kcal/mol)	0.27	0.28	-0.22	-0.078
μH (kcal/mol)	0.41	0.41	0.297	0.17

4.9 Producción de anticuerpos contra la región C-terminal de CETP y CETPI

Con base en los protocolos desarrollados previamente en el laboratorio [12-15], por medio de la empresa Alpha Diagnostic International se obtuvieron los anticuerpos que reconocen el C-terminal de CETP y CETPI a partir de la síntesis

de los últimos 11 aminoácidos del carboxilo terminal de cada una de las proteínas. Los péptidos fueron acoplados a hemocianina de lapa (KLH) adicionando un residuo de cisteína en el amino terminal de los péptidos. Los péptidos acoplados fueron inoculados en gallinas blancas Leghorn para la producción de los anticuerpos anti-CETP IgY y anti-CETPI IgY utilizando un protocolo estándar de 63 días. Los títulos fueron determinados por la empresa por medio del ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

4.10 Electroforesis en geles de gradiente de poliacrilamida

Se desarrolló un protocolo para poder evaluar la unión del C-terminal de CETPI a LPS, con base en protocolos en los que se ha empleado la electroforesis de tipo SDS-PAGE en la caracterización del lípido A y el antígeno O de los LPS ³⁷. Con base en este protocolo, para geles nativos de gradiente de poliacrilamida 0.8-25% fue necesario preparar las siguientes soluciones:

	0.8%
30% Poliacrilamida-Bisacrilamida	0.5 mL
TBE (Tris 0.09M, ácido bórico 0.08 M, EDTA 3 mM) pH 8.35	0.08 mL
H ₂ O	4.4 mL
Glicerol	-
10 % Persulfato de amonio	0.02mL
TEMED	0.006 mL

	25%
55% Poliacrilamida-Bisacrilamida	0.5 mL
TBE (Tris 0.09M, ácido bórico 0.08 M, EDTA 3 mM) pH 8.35	2.3 mL
H ₂ O	1.45 mL
Glicerol	0.75 mL
10 % Persulfato de amonio	0.02 mL
TEMED	0.006 mL

Muestras de LPS (serotipo O111:B4) solubilizadas en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.8 y tratadas con 2 ciclos de 5 min en baño de sonicación, fueron incubadas por 16 h a temperatura ambiente con los péptidos ARS (A481-P491) y el péptido VSAK (V474-P491) resuspendidos con amortiguador de carbonatos pH 9.5. Posteriormente, se les agregó amortiguador de carga (sacarosa 50%, azul de bromofenol 0.05%) y fueron colocadas en geles de gradiente de poliacrilamida con amortiguador TBE, utilizando 70 V por 30 min y posteriormente a 100 V por 3 h para la electroforesis de las muestras. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie G-250 y negro de Sudán. De manera paralela se llevó a cabo la electroforesis de las mismas muestras, pero al terminar la corrida las muestras fueron transferidas a membranas de PVDF durante 5 h a 300 mA y fueron analizadas a través de inmunotransferencia tipo Western blot usando el anticuerpo Anti-CETPI A481-P49.

De igual forma, se evaluó la interacción de otros péptidos, como el péptido nativo derivado del C-terminal de CETP nombrado hélice-X (E465-S476), y el péptido hélice-Z portador de la mutación D470N, derivado también de CETP. Adicionalmente, la unión del péptido VSAK a otros serotipos de LPS, como el O26:B6 y el O55:B5 fue observada.

4.11 Ensayos de fluorescencia

LPS (O55:B5) marcados con la sonda fluorescente BODIPY-FL o bien con AlexaFluor 488 (Invitrogen) fueron resuspendidos en PBS a una concentración de 5 µg/mL y colocados en un baño de sonicación durante 2 ciclos de 5 min. A continuación, fueron incubados con concentraciones crecientes del péptido VSAK/PBS durante 2.5 h a 37°C. El espectro de emisión de fluorescencia para la evaluación de las diferentes condiciones fue en el rango de 520 a 575 nm, con una longitud de onda de excitación de 503 nm para LPS-BODIPY FL y de 519 nm para LPS-Alexa Fluor. Las mediciones se hicieron a 25°C en un espectrofluorómetro Olis-SLM AMINCO MH-116.

4.12 Ensayos de interacción de cargas: Fuerza iónica

Estos ensayos se realizaron con 28 µg de LPS solubilizados en amortiguador de fosfatos pH 6.8, más 7 µg de péptido VSAK resuspendidos en amortiguador de carbonatos pH 9.5. Después de añadir concentraciones crecientes de NaCl, se mantuvo en incubación 16 h a temperatura ambiente. La electroforesis de las muestras en geles de gradiente de poliacrilamida (0.8-25%) se llevó a cabo durante 40 min a 80 V, 1 h a 100 V y 3 h a 110 V. Un gel con las mismas muestras fue teñido con azul de Coomassie y otro fue procesado por la técnica de inmunotransferencia tipo Western blot ligeramente modificada. Se bloqueó la

membrana durante toda la noche a 4°C utilizando una solución de leche descremada al 5% p/v, Tris-salino (TBS) pH 7.6 y Tween al 0.1% v/v. En una dilución 1:4,000 de anticuerpo policlonal anti-CETPI en solución de bloqueo con Tween al 1%, se incubó la membrana durante 2 h a 4°C y 2 h a temperatura ambiente. Se hicieron 6 lavados de 15 min con solución de bloqueo con Tween al 1%. Durante 1 h a temperatura ambiente, se incubó la membrana en una dilución 1:20,000 del anticuerpo policlonal IgY de gallina acoplado a HRP en solución de bloqueo Tween al 1%. Se realizaron 6 lavados de 15 min con solución de bloqueo Tween al 1% sin leche y 2 lavados de 12 min con solución TBS/NaCl 0.5M/SDS 0.2%.

4.13 Ensayos de tratamiento de LPS con fosfatasa alcalina (AP)

Para la desfosforilación de los LPS, 24 µg de LPS serotipo 0111:B4 fueron resuspendidos en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.8 [NaH₂PO₄/Na₂HPO₄] con 5 U de fosfatasa alcalina de camarón antártico (New England, BioLabs). El volumen de la reacción se ajustó a 70 µL siguiendo las recomendaciones del proveedor y se incubó durante 1 h a 37°C. La actividad de la enzima fue inhibida, manteniendo la reacción en baño maría a 70°C por 5 min. A continuación, se incubó a temperatura ambiente durante 16 h con 6 µg de péptido VSAK solubilizado en amortiguador de carbonatos pH 9.5. Las muestras fueron resueltas por electroforesis en gel de gradiente (0.8-25%) y una vez transferidas a

membranas de PVDF, se analizó el resultado mediante inmunotransferencia tipo Western blot.

4.14 Ensayos de fluorescencia en cultivo celular

A células RAW con una confluencia del 90% se les adicionó el péptido VSAK en una concentración de 200 µg/mL por 45 min antes de añadir 2 µg/mL de LPS marcados con la sonda BODIPY-FL y ser incubadas por 4 h a 37°C. El medio extracelular recuperado se centrifugó 18 min a 2500 rpm a 4°C, y fue concentrado utilizando un Amicon Ultra (Millipore) con membrana de 10K. La señal de fluorescencia se midió en el espectrofluorómetro Olis a 25°C, empleando una longitud de onda de excitación de 503 nm.

Por otra parte, para evaluar la unión de LPS a la superficie de los macrófagos en presencia del péptido VSAK, cultivos celulares de macrófagos en caja de 96 pozos (14,000 células/pozo) con una confluencia del 80% fueron mantenidos durante 2 h en medio RPMI sin SFB, se realizaron 2 lavados con 200 µL por pozo de PBS y se mantuvieron con esta solución 30 min a 4°C. A continuación, las células fueron incubadas durante 30 min con el péptido VSAK o Polimixina B (60 µg/ml) resuspendidos en PBS. Posteriormente, se agregaron LPS de *Salmonella minnesota* marcados con la sonda Alexa Fluor solubilizados en PBS y la incubación a 4°C continuó por 2 h adicionales. Inmediatamente después de realizar un lavado con PBS, las mediciones se llevaron a cabo en el lector de placas Synergy HT (BioTek) a 25°C, con una longitud de onda de excitación de

485 nm y de emisión de 528 nm, con una ganancia de 120. Así mismo se realizaron experimentos con las mismas concentraciones pero ahora adicionando primero el LPS y posteriormente el péptido.

4.15 Ensayos de viabilidad celular

La línea celular RAW 274.3 (ATCC, macrófagos) fue cultivada utilizando medio RPMI 1640 con 10% de SFB en placa de 96 pozos, sembrando 14,000 células por pozo. Con una confluencia del 80%, las células fueron ayunadas (medio de cultivo sin SFB) durante 1 h y posteriormente se incubaron durante 45 min con concentraciones crecientes del péptido VSAK (0, 100, 500 y 1,000 ng/ml) solubilizado en amortiguador de carbonatos 50 mM, pH 9.6 [$\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaCO}_3$]. Los LPS resuspendidos a una concentración de 10 ng/mL en agua Milli-Q y tratados por 2 ciclos de 5 min en un baño de sonicación, fueron agregados a las células y permanecieron bajo este tratamiento por 24 h. Al finalizar, se midió la viabilidad celular a través del ensayo estandarizado de reducción de la molécula 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) 2,5 bromuro difeniltetrazolio (MTT).

En otro panel experimental, células cultivadas de la misma forma recibieron un estímulo de 10 ng/mL de LPS y permanecieron bajo el tratamiento por 2, 4 y 12 h. Una vez terminado el tiempo indicado, se agregaron dosis crecientes de péptido VSAK (0, 100, 500 y 1,000 ng/ml) y permanecieron en incubación 20 h antes de realizar el ensayo de viabilidad celular con MTT.

De igual forma, se llevaron a cabo ensayos para evaluar la citotoxicidad ocasionada por el péptido VSAK en cultivos celulares de macrófagos, microglía e hígado, adicionando concentraciones crecientes de péptido VSAK y manteniendo el tratamiento por 16 h.

4.16 Protocolo experimental en animales

Conejos machos Nueva Zelanda con un peso de 2-2.5 Kg se mantuvieron bajo condiciones de alimentación *ad libitum* y acceso libre al agua. Después de un periodo de cuarentena de 10 días en un ambiente con temperatura y humedad controladas, se inició el tratamiento.

Para el diseño experimental, fueron considerados cuatro grupos con tres animales cada uno (Tabla 2). Los conejos fueron sometidos a un ayuno de 24 h previas al inicio del protocolo experimental y el primer registro de temperatura rectal de cada animal. Inmediatamente después de este primer registro de temperatura, el péptido VSAK (60 µg/kg) fue inoculado por vía intravenosa en la vena marginal de la oreja derecha y al término de 10 min se administraron por esta misma vía los LPS 0111:B4 (0.3 µg/kg) en la oreja izquierda. La temperatura rectal fue monitoreada cada 30 min, durante un periodo de 90 min. Al finalizar, los animales fueron sacrificados con pentobarbital sódico.

Tabla 2. Grupos de animales experimentales.

Grupo	Características del tratamiento
1	Vehículo
2	Péptido VSAK
3	LPS 0111:B4
4	Péptido VSAK + LPS 0111:B4

El experimento se llevó a cabo en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, y el protocolo de experimentación fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales, con el código JMO22-14. El trato de los animales fue realizado en acuerdo con lo establecido en la Guía de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio avalada por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos y la declaración de Helsinki. Las instalaciones del bioterio cuentan con las características establecidas por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

4.17 Determinación de TNF α en suero de conejos

Una vez terminado el protocolo de experimentación para cada uno de los animales y antes de ser sacrificados, se tomaron muestras de sangre de la vena marginal de la oreja en tubos vacutainer. En el laboratorio, los tubos fueron centrifugados por 15 min a 2,000 rpm, se recuperó el suero y las alícuotas fueron almacenadas a

-70°C. Una vez obtenidos los sueros de todos los grupos experimentales, las muestras fueron descongeladas y diluidas con PBS en una relación 1:3.

Para la determinación de TNF α en suero, se utilizó el Kit ELISA de la marca Cloud-Clone Corp., siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante. De cada dilución de muestra se tomaron 100 μ L y se agregaron a los pozos de la placa de ELISA. Después de un periodo de incubación de 2 h a 37°C, se retiró por pipeteo y se incubó 1 h a 37°C con el reactivo A. Posteriormente, al término de realizar 3 lavados, se incubó por 25 min a 37°C con el reactivo B y se hicieron 5 lavados. A continuación, la placa de ELISA se incubó durante 25 min a 37°C con la solución sustrato. Finalmente, después de agregar la solución de inhibición de la reacción, los resultados obtenidos mediante la lectura de absorbancia a 450 nm utilizando el lector de placas Synergy HT (BioTek) fueron analizados.

5. RESULTADOS

5.1 Diseño del plásmido pUC57-CETP y pUC57-CETPI

Las secuencias resultantes del diseño del vector para la sobreexpresión de las proteínas CETP y CETPI, optimizadas por la compañía GenScript (Piscataway, E.U.), se muestran a continuación. Al inicio y término, las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. La línea negra hace énfasis subrayando la presecuencia de exportación agregada.

Secuencia de nucleótidos de CETP de conejo insertados en el vector pRESpuro3

Longitud: 1554 pb

Secuencias adicionadas:

GAATTC (EcoRI)

GGATCC (BamHI)

ATGCTGGCTGCCACAGTCCTGACCCTGGCCCTGCTGGGCAATGCCCAT (48 nucleótidos correspondientes a la presecuencia de exportación de CETP humana)

**GAATTCATGCTGGCTGCCACAGTCCTGACCCTGGCCCTGCTGGGCAATGCCCATGCCTGTCCCA
AAGGCGCCTCCTACGAGGCTGGCATCGTGTGTGCGCATACCAAGCCCGCCCTCTTGGTGTGAA
CCAAGAGACGGCCAAGGTGGTCCAGACGGCCTTCCAGCGCGCCGGCTATCCGGACGTCAGCG
GCGAGAGGGCCGTGATGCTCCTCGGCCGGGTCAAGTACGGGCTGCACAACCTCCAGATCAGCC
ACCTGTCCATCGCCAGCAGCCAGGTGGAGCTGGTGGACGCCAAGACCATCGACGTCGCCATCC
AGAACGTGTCCGTGGTCTTCAAGGGGACCCTGAACTACAGCTACACGAGTGCCTGGGGGTTGG
GCATCAATCAGTCTGTGACTTCGAGATCGACTCTGCCATTGACCTCCAGATCAACACAGAGCT
GACCTGCGACCGTGGCAGTGTGCGCACCAATGCCCCGACTGCTACCTGGCTTTCCATAAACTG
CTCCTGCACCTCCAGGGGGAGCGGAGCCGGGGTGGCTCAAGCAGCTCTTCAAACTTCATC
TCCTTCACCTGAAGCTGATTCTGAAGCGACAGGTCTGCAATGAGATCAACACCATCTCCAACA
TCATGGCTGACTTTGTCCAGACGAGGGCCGCCAGCATCCTCTCAGATGGAGACATCGGGGTGG
ACATTTCCGTGACGGGGGCCCTGTGCATCACAGCCACCTACCTGGAGTCCCATCACAAGGGTCA
CTTCACGCACAAGAAGTCTCCGAGGCCTTCCCCCTCCGCGCCTTCCCGCCCGGTCTTCTGGGG
GACTCCCGCATGCTCTACTTCTGGTTCTCCGATCAAGTGTCAACTCCCTGGCCAGGGCCGCCT
TCCAGGAGGGCCGTCTCGTGTCTCAGCCTGACAGGGGATGAGTTCAAGAAAGTGTCTGGAGACCC
AGGGTTTCGACACCAACCAGGAAATCTTCCAGGAGCTTTCAGAGGCCTTCCACCGGCCAGG
CCCAGGTAGCCGTCCACTGCCTTAAGGTGCCCAAGATCTCCTGCCAGAACCAGGGGTGCTGTGG
TGTCTTCTCCGTGCGCGTGACGTTCCGCTTCCCCCGCCAGATGGCCGAGAAGCTGTGGCCTA
CAGGTTTGAGGAGGATATCATCACACCGTCCAGGCCTCCTACTCCCAGAAAAGCTCTTCCCTA
CACCTCTTGATTTCCAGTGCCTGCCGGCCAGCGGAAGGGCAGGCAGCTCAGCAAATCTCTCC
GTGGCCCTCAGGACTGAGGCTAAGGCTGTTTCCAACCTGACTGAGAGCCGCTCCGAGTCCCTG
CAGAGCTCTCTCCGCTCCCTGATCGCCACGGTGGGCATCCCGGAGGTGATGTCTCGGCTCGAG
GTGGCGTTCACAGCCCTCATGAACAGCAAAGGCCTGGACCTCTTCGAAATCATCAACCCCGAG
ATTATCACTCTCGATGGCTGCCTGCTGCTGCAGATGGACTTCGGTTTTCCAAGCACCTGCTGGT
GGATTTCTGCAGAGCCTGAGCTAGGGATCC**

Secuencia de aminoácidos de interés para los que traduce la construcción pRESpuro3-CETP

Longitud: 513 aminoácidos

Secuencias adicionadas: **MLAATVLTLLGNAH** (16 aminoácidos correspondientes a la presecuencia de exportación de CETP humana)

**MLAATVLTLLGNAHACPKGASYEAGIVCRITKPALLVLNQETAKVVQTAQFQRAGYPDVSGERAVM
LLGRVKYGLHNLQISHLSIASSQVELVDAKTIDVAIQNVSVVFKGTLNYSYTSAWGLGINQSVDFEIDS
AIDLQINTELTCDAGSVRTNAPDCYLAFHKLLHLQGEREPGWLKQLFTNFISFTLKLILKRQVCNEIN
TISNIMADVFQTRAASILSDGDIGVDISVTGAPVITATYLESHHKGFTHKNVSEAFPLRAFPPGLLGDS
RMLYFWFSDQVLNSLARAQFQEGRLVLSLTGDEFKVLLETQGFDTNQEIQELSRGLPTGQAQVAV
HCLKVPKISCQNRGVVSSVAVTFRFPRPDGREAVAYRFEEDIITTVQASYSQKKLFLHLLDFQCVP
ASGRAGSSANLSVALRTEAKAVSNLTERSESLQSSLRSLIATVGIPEVMSRLEVAFTALMNSKGLDL
FEIINPEIITLDGCLLLQMDFGFPKHLLVDFLQSL**

Secuencia de nucleótidos de CETPI de conejo insertados en el vector pRESpuo3

Longitud: 1536 pb

Secuencias adicionadas:

GAATTC (EcoRI)

GGATCC (BamI II)

ATGCTGGCTGCCACAGTCCTGACCCTGGCCCTGCTGGGGCAATGCCCAT (15 nucleótidos correspondientes a la presecuencia de exportación de CFTP humana)

GAATTCATGCTGGCTGCCACAGTCCTGACCCTGGCCCTGCTGGGGCAATGCCCATGCCTGTCCCA
AAGGCGCCTCCTACGAGGCTGGCATCGTGTGTGCGCATCACCAAGCCCGCCCTCTTGGTGTGAA
CCAAGAGACGGCCAAGGTGGTCCAGACGGCCTTCCAGCGCGCCGGCTATCCGGACGTCAGCG
CGAGAGGGCCGTGATGCTCCTCGGCCGGGTCAAGTACGGGCTGCACAACCTCCAGATCAGCC
ACCTGTCCATCGCCAGCAGCCAGGTGGAGCTGGTGGACGCCAAGACCATCGACGTCGCCATCC
AGAACGTGTCCGTGGTCTTCAAGGGGACCCTGAACTACAGCTACACGAGTGCCTGGGGGTTGG
GCATCAATCAGTCTGTCGACTTCGAGATCGACTCTGCCATTGACCTCCAGATCAACACAGAGCT
GACCTGCGACGCTGGCAGTGTGCGCACCAATGCCCCGACTGCTACCTGGCTTTCCATAAACTG
CTCCTGCACCTCCAGGGGGAGCGCGAGCCGGGGTGGCTCAAGCAGCTCTTACAAAACCTTCATC
TCCTTCAACCCTGAAGCTGATTCTGAAGCGACAGGTCTGCAATGAGATCAACACCATCTCCAACA
TCATGGCTGACTTTGTCCAGACGAGGGCCGCCAGCATCCTCTCAGATGGAGACATCGGGGTGG
ACATTTCCGTGACGGGGGCCCTGTATCACAGCCACCTACCTGGAGTCCCATCACAAGGGTCA
CTTACGCACAAGAACGTCTCCGAGGCCTTCCCCTCCGCGCCTTCCCGCCCGGTCTTCTGGGG
GACTCCCGCATGCTCTACTTCTGGTTCTCCGATCAAGTGTCAACTCCCTGGCCAGGGCCGCT
TCCAGGAGGGCCGTCTCGTGTGTCAGCCTGACAGGGGATGAGTTCAAGAAAGTGTGGAGACCC
AGGGTTTCGACACCAACCAGGAAATCTTCCAGGAGCTTTCAGAGGCCTTCCCACCGGCCAGG
CCCAGGTAGCCGTCCACTGCCTTAAGGTGCCAAGATCTCCTGCCAGAACCAGGGGTGTGCTGG
TGTCTTCTCCGTGCGCGTGACGTTCCGCTTCCCCCGCCAGATGGCCGAGAAGCTGTGGCCTA
CAGGTTTGAGGAGGATATCATCACCAACCGTCCAGGCCTCCTACTCCCAGAAAAAGCTCTTCTA
CACCTCTTGATTTCCAGTGCCTGCGCGCCAGCGGAAGGGCAGGCAGCTCAGCAAATCTCTCC
GTGGCCCTCAGGACTGAGGCTAAGGCTGTTTCCAACCTGACTGAGAGCCGCTCCGAGTCCCTG
CAGAGCTCTCTCCGCTCCCTGATCGCCACGGTGGGCATCCCGGAGGTCATGTCTCGGCTCGAG
GTGGCGTTACAGCCCTCATGAACAGCAAAGGCCTGGACCTCTTCAAATCATCAACCCCGAG
ATTACTACTCTCGATGTGAGTGCAAAGCCCTGTGCGGCCGTTCTCCGGGAGGGCGGCCCTGT
CTCCATGAGGATCC

Secuencia de aminoácidos de interés para los que traduce la construcción pRESpuo3-CETPI

Longitud: 507 aminoácidos

Secuencias adicionadas: **MLAATVLTLLALLGNAH** (15 aminoácidos correspondientes a la presecuencia de exportación de CFTP humana)

MLAATVLTLLALLGNAHACPKGASYEAGIVCRITKPALLVNLQETAKVVQTAFORAGYPOVSGERAVM
LLGRVKYGLHNLQISHLSIASSQVELVDAKTIDVAIQNVSVYFKGLNYSYTSAWGLGINQSVDFEIDS
AIDLQINTELTCDAGSVRTNAPDCYLAFAHKLLHLQGEREPGWLKQLFTNFISFTLKLILKRQVCNEIN
TISNIMADVFVQTRAASILSDGDIGVDISVTGAPVITATYLESHHKGFHFKNVSEAFPLRAFPPGLLGD
RMLYFWFSDQVLNSLARAFAQEGRLVLSLTGDEFKVVLETQGFDTNQEIQELSRGLPTGQAQVAV
HCLKVPKISCQNRGVVSSVAVTFRFPRPDGREAVAYRFEEDIITTVQASYSQKFLHLHLLDFQCVP
ASGRAGSSANLSVALRTEAKAVSNLTERSESLQSSLRSLIATVGIPEVMSRLEVAFTALMNSKGLDL
FEIINPEIITLDVSAKPLSARSPGGRPLSP

5.2 Construcción de los vectores pIRESpuro3-CETP y pIRESpuro3-CETPI

La transformación de células competentes DH5 α de *Escherichia coli* con los vectores pUC57-CETP y pUC57-CETPI se llevó a cabo de manera exitosa (Figura 7A) y a partir de la digestión de los plásmidos con las enzimas EcoRI y BamHI, se obtuvo el DNA correspondiente al inserto (Figura 7B).

Por otra parte, de igual forma el vector pIRESpuro3 fue purificado y digerido (Figura 7C). De la reacción de ligación del vector pIRESpuro3 con los insertos de las secuencias que traducen para CETP y CETPI, células DH5 α fueron transformadas y de las colonias resultantes se seleccionó una colonia de pIRESpuro3-CETP (Colonia 1D) y dos colonias del vector pIRESpuro3-CETPI (Colonia 2A y Colonia 2B).

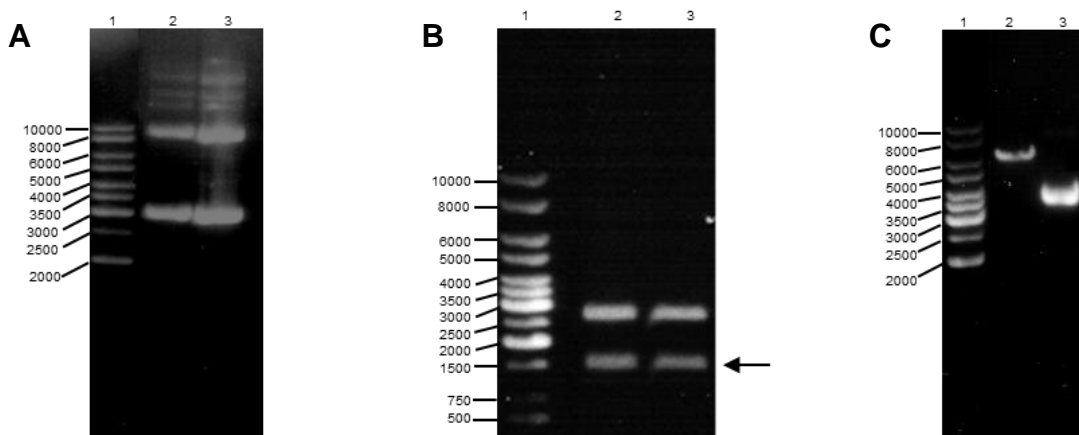
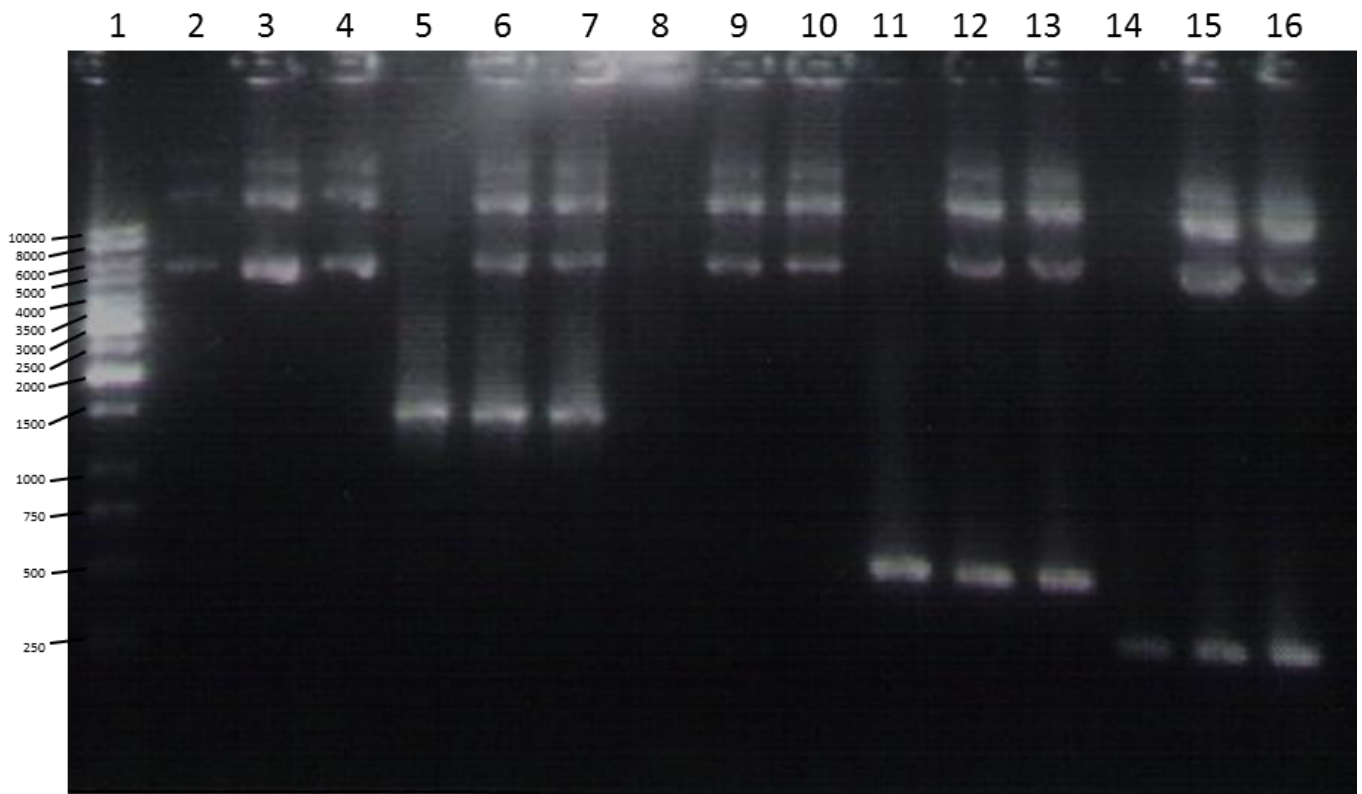


Figura 7. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Vector pUC57-CETP. Carril 3: Vector pUC57-CETPI. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 4%. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Digestión del vector pUC57-CETP con las enzimas EcoRI y BamHI. Carril 3: Digestión del vector pUC57-CETPI con las enzimas EcoRI y BamHI. La flecha indica los fragmentos correspondiente a la liberación de las secuencias codificantes para las proteínas CETP y CETPI. (C) Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Vector pIRESpuro3. Carril 3: Digestión del vector pIRESpuro3 con las enzimas EcoRI y BamHI.

La correcta construcción de los vectores pRESpuro3-CETP y pRESpuro3-CETPI obtenidos a partir de las colonias seleccionadas, fue corroborada con reacciones de PCR utilizando diferentes oligonucleótidos específicos de segmentos clave (Anexos 12.1-12. 3). Como se observa en la Figura 8, se colocó el marcador de peso molecular y posteriormente una muestra del DNA purificado de las colonias. En los carriles 5-7, así como en los carriles 11-13 la banda inferior en el gel corresponde a la amplificación del segmento esperado y considerando que el oligonucleótido no es específico para la secuencia terminal que diferencia a CETP de CETPI, la intensidad de la banda es la misma. En los carriles 8-10 no se observa una banda de amplificación debido a que en este caso se utilizó un oligonucleótido específico para una secuencia del vector pUC57, y al no ver amplificación descartamos la posibilidad de que hubiera ocurrido una contaminación con el vector bacteriano. Por último, en los carriles 14-16 se logra apreciar una diferencia en la intensidad de las bandas de amplificación, siendo en la colonia 1D (carril 14) de menor intensidad que en las colonias de 2A y 2B (carriles 15 y 16 respectivamente), lo cual se debe a que el oligonucleótido 8218 es específico para la secuencia terminal del inserto de CETPI.



- | | |
|-----|---------------------------------|
| 1. | MPM |
| 2. | pIRESpuro3-CETP (Colonia 1D) |
| 3. | pIRESpuro3-CETPI (Colonia 2A) |
| 4. | pIRESpuro3-CETPI (Colonia 2B) |
| 5. | Colonia 1D (T7F-5611) |
| 6. | Colonia 2A (T7F-5611) |
| 7. | Colonia 2B (T7F-5611) |
| 8. | Colonia 1D (5606 -5611) |
| 9. | Colonia 2A (5606 -5611) |
| 10. | Colonia 2B (5606 -5611) |
| 11. | Colonia 1D (8216-8217) |
| 12. | Colonia 2A (8216-8217) |
| 13. | Colonia 2B (8216-8217) |
| 14. | Colonia 1D (8218-8219) |
| 15. | Colonia 2A (8218-8219) |
| 16. | Colonia 2B (8218-8219) |

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 4% de las muestras de PCR para la comprobación de la correcta construcción de los vectores pIRESpuro3-CETP y pIRESpuro3-CETPI. En el recuadro inferior se enlista la identificación de las muestras cargadas en el gel y entre paréntesis los oligonucleótidos utilizados para la amplificación. Consultar Anexos 12.3.

Posteriormente, haciendo una digestión de los vectores pIRESpuro3-CETP y pIRESpuro3-CETPI empleando las enzimas *EcoRV* y *KpnI* se corroboró nuevamente que la construcción era correcta, considerando que el sitio de corte de estas enzimas coinciden con sitios dentro del inserto y fuera de él (Anexo 12.3). La visualización del producto de las digestiones mediante electroforesis en gel de agarosa, evidenció que en todos los casos los fragmentos del tamaño esperado estaban presentes (Figura 9).

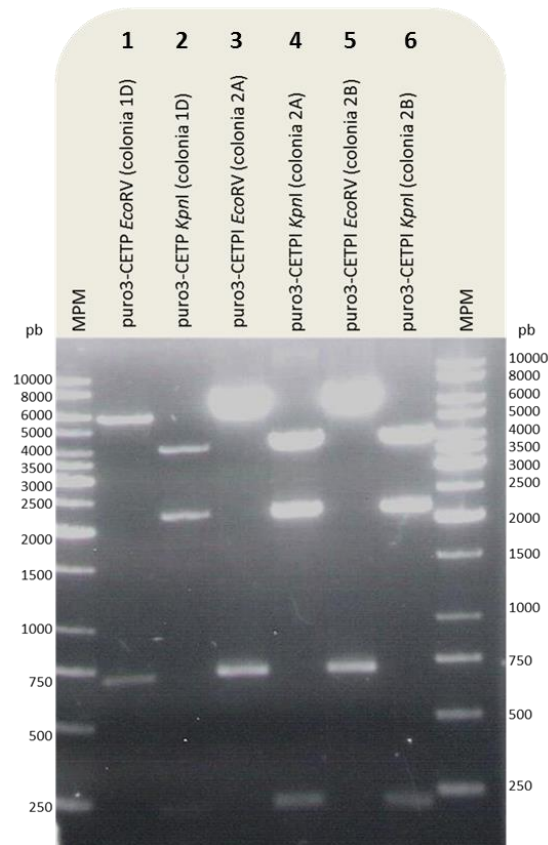


Figura 9. Gel de electroforesis en agarosa al 1% de las construcciones pIRESpuro3-CETP y pIRESpuro3-CETPI digeridas con enzimas *EcoRV* y *KpnI*. **(1)** Fragmentos esperados para pIRESpuro3-CETP digerido con *EcoRV*: 5970 pb, 743pb. **(2)** Para pIRESpuro3-CETP digerido con *KpnI*: 4272 pb, 2193 pb, 248 pb. **(3)** y **(5)** Fragmentos esperados para pIRESpuro3-CETPI digerido con *EcoRV*: 5952 pb y 743 pb. **(4)** y **(6)** Para pIRESpuro3-CETP digerido con *KpnI*: 4272 pb, 2175 pb y 248 pb. MPM: Marcador de peso molecular. Análisis de patrón de digestión esperado utilizando la herramienta virtual NEBcutter, New England BioLabs. Consultar Anexo 12.4.

Finalmente, alicuotas de las construcciones de DNA enviadas a secuenciar al Instituto de Biotecnología (UNAM), demostraron que la secuencia era correcta y que el marco de lectura para la traducción de la proteína estaba en fase.

5.3 Transfección con los vectores *pIRESpuro3-CETP* y *pIRESpuro3-CETPI*

Se obtuvo la estandarización de un protocolo para el cultivo de células CHO-S en suspensión, en ausencia de SFB y la generación de un banco de criotubos con células cultivadas bajo estas condiciones. Durante este periodo, fue posible la familiarización con el ciclo celular de esta línea celular, su morfología y condiciones óptimas para su proliferación

Para los experimentos de transfección, se realizaron pruebas de evaluación de viabilidad celular en presencia de concentraciones crecientes de puromicina durante 24 h (antibiótico utilizado para la selección de células transfectadas) haciendo uso del ensayo de MTT. Posteriormente, por medio de un método de transfección piloto se evaluaron diferentes proporciones de lipofectamina:DNA, y utilizando la técnica de tinción con plata se seleccionó la condición en la que se observó una mayor densidad de bandas. Sin embargo empleando diferentes técnicas como el uso de Amicon Ultra 30 kDa, el equipo Speed Vac y un Amicon 10kDa, no se obtuvo suficiente cantidad de proteína concentrada que pudiera ser detectada con los anticuerpos anti-CETP (monoclonal) y anti-CETPI (policlonal).

Con base en los experimentos realizados, se observó que el reto con puromicina tenía que ser mantenido por varios días obteniendo una muerte celular masiva que permitiera identificar en un determinado momento, la permanencia de varias colonias aisladas que pudieran ser las células transfectadas de forma exitosa. Las colonias así obtenidas, fueron mantenidas por semana y media. En cuanto se detectó un incremento del número de células presentes en la caja se prosiguió a evaluar la presencia de la proteína pero ésta era muy escasa en las muestras.

En consecuencia, la transfección fue evaluada en otras líneas celulares tales como HepG2, Caco2, RAW y HEK-293. Sin embargo, aun cuando se probaron las mejores condiciones para la transfección de cada una de estas líneas, no se logró obtener la transfección estable. No obstante, se estableció que para obtener una transfección transitoria del vector pIRESpuro3-CETPI en células HEK-293, es necesario tener una confluencia celular del 95%, incubar durante 5 min a temperatura ambiente 20 μ L de Lipofectamine $\text{\textcircled{R}}$ 2000 con 500 μ L de medio de cultivo sin antibióticos ni suero fetal bovino y mezclar esta solución con 17.5 nM de DNA resuspendidos en 500 μ L de medio de cultivo sin antibióticos ni suero fetal bovino, para finalmente dejar incubando la disolución final 40 min a temperatura ambiente (Figura 10).

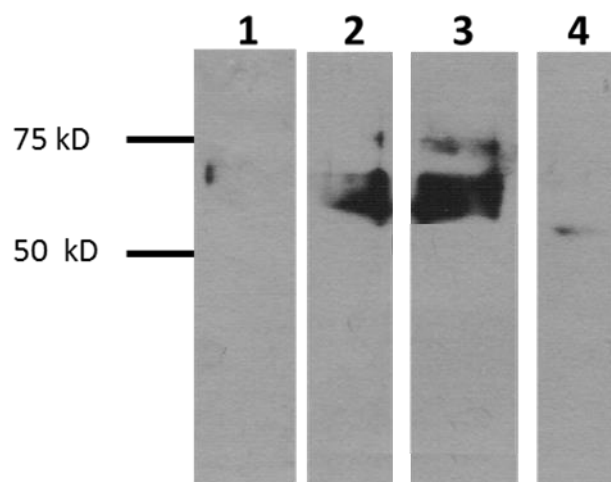


Figura 10. Sobreexpresión de la proteína CETPI en células HEK-293. En la detección se usó el anticuerpo policlonal Anti-CETPI A481-P491. Medios extracelulares analizados mediante inmunotransferencia tipo Western blot. **Carril 1.** Células sin transfectar; **Carril 2** Transfección con 8 µg de DNA; **Carril 3** Transfección con 24 µg de DNA; **Carril 4** Control con albúmina sérica bovina (BSA) 1.6 µg.

Debido a que hasta el momento los diferentes protocolos experimentales de sobreexpresión no permitían obtener la suficiente cantidad de proteína total para que la purificación de CETPI fuera viable y se pudieran realizar experimentos de unión de la proteína a LPS, de manera paralela a los experimentos descritos, se iniciaron ensayos de unión de péptidos sintéticos derivados del carboxilo terminal de CETPI a LPS.

5.4 Caracterización de la unión del péptido VSAK a lipopolisacáridos

5.4.1 Electroforesis en geles de gradiente de poliacrilamida

Para poder evaluar la unión de péptidos del C-terminal de CETPI a LPS, fue necesario realizar varios experimentos para determinar el gradiente de poliacrilamida óptimo (0.8-25%) en la electroforesis en geles nativos. A partir de la estandarización de este protocolo, se realizaron los experimentos utilizando el péptido ARS (A481-P491) correspondiente a los últimos 11 residuos y otro péptido denominado VSAK (V474-P491) correspondiente a los últimos 18 residuos.

En este tipo de experimentos de electroforesis de LPS en geles de poliacrilamida se observó un patrón de barrido en las muestras, y no bandas bien definidas debido al alto contenido de polisacáridos, que es característico de los LPS (Figura 11A). Mientras que bajo condiciones en las que únicamente fueron evaluados los péptidos, no se define un corrimiento en el gel, ya que por su bajo peso molecular (péptido VSAK 1777.04 Da; péptido ARS 1094.2 Da) no quedan retenidos en la matriz de poliacrilamida. Posteriormente, a partir de un gel de poliacrilamida como el que se muestra en la figura 11A se realizó una inmunotransferencia tipo Western blot empleando el anticuerpo Anti-CETPI A481-P491, y se encontró la señal exclusivamente en las muestras de los péptidos que fueron incubados con LPS, siendo más intensa la señal en el péptido VSAK (Figura 11B). Los resultados sugieren que los péptidos se mantienen unidos a los LPS, y solamente en esta condición quedan retenidos en la matriz de poliacrilamida.

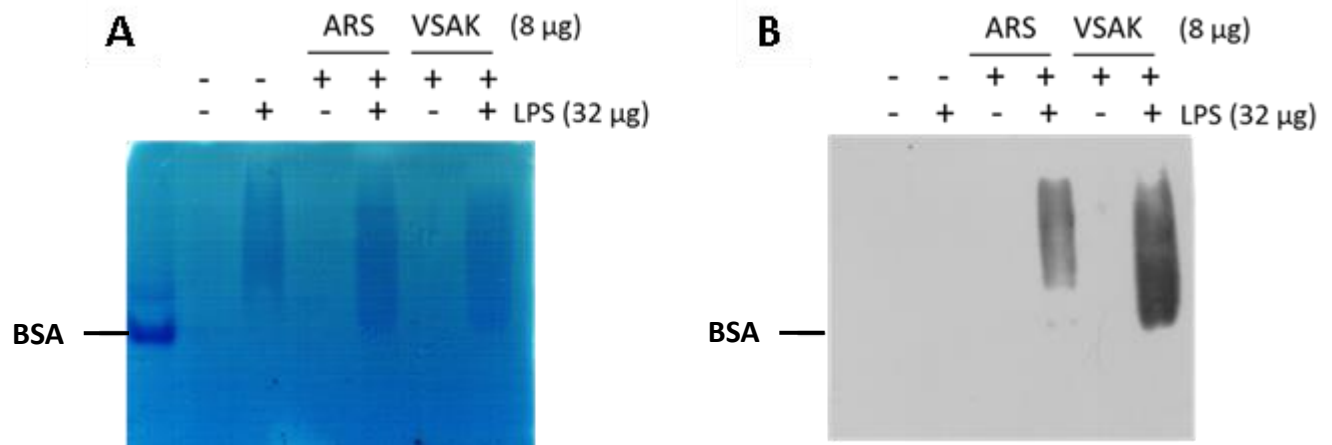


Figura 11. Electroforesis en gel nativo de gradiente de poliacrilamida (0.8-25%) de muestras de LPS (serotipo O26:B6), el péptido ARS, péptido VSAK y mezclas de LPS con los péptidos. **A)** Gel teñido con azul de Coomassie. **B)** Detección realizada a través de inmunotransferencia tipo Western blot de las mismas muestras, usando el anticuerpo primario IgY Anti-CETPI A481-P491 dirigido contra el C-terminal de CETPI. Albúmina sérica bovina (BSA).

De igual forma, en experimentos control en los que fueron evaluados péptidos derivados del C-terminal de CETP, únicamente se encontró la señal de unión de los LPS con los péptidos ARS y VSAK (Figura 12A), siendo más evidente con el péptido VSAK. En todos los casos, se detectó la señal de unión específica del péptido VSAK a los tres serotipos de LPS evaluados (Figura 12B).

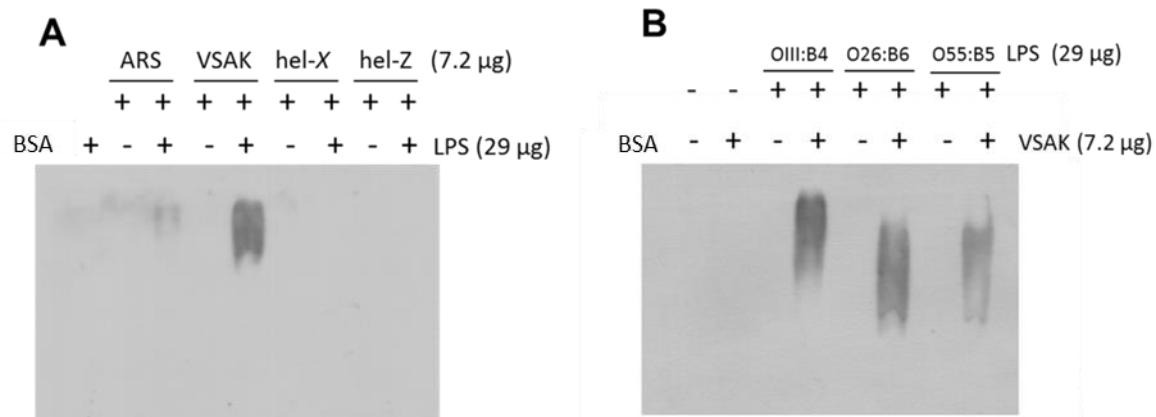


Figura 12. La unión a LPS está determinada a los últimos 18 residuos del C-terminal de CETPI, y puede extenderse a varios serotipos de LPS. **A)** Identificación a través de inmunotransferencias tipo Western blot de la unión del péptido VSAK a LPS empleando el serotipo 0111:B4. **B)** Únicamente cuando se incuban los tres serotipos de LPS (0111:B4; O26:B6 y O55:B5) con el péptido VSAK se identifica la señal que corresponde a la unión péptido VSAK/LPS.

5.4.2 Ensayos de fluorescencia

Una vez determinada la capacidad de unión del péptido VSAK a los LPS con mayor afinidad que ARS, se decidió caracterizar esta unión utilizando 5 µg/ml de LPS marcados con la sonda fluorescente BODIPY-FL. Incubando los LPS con concentraciones crecientes del péptido VSAK, el análisis de las mediciones obtenidas en el espectrofluorómetro demostró un incremento en el espectro de emisión de fluorescencia con respecto al incremento de la concentración de péptido en las muestras, siendo evidente a partir de 50 µg/ml y obteniendo el máximo pico de emisión a 531 nm (Figura 13).

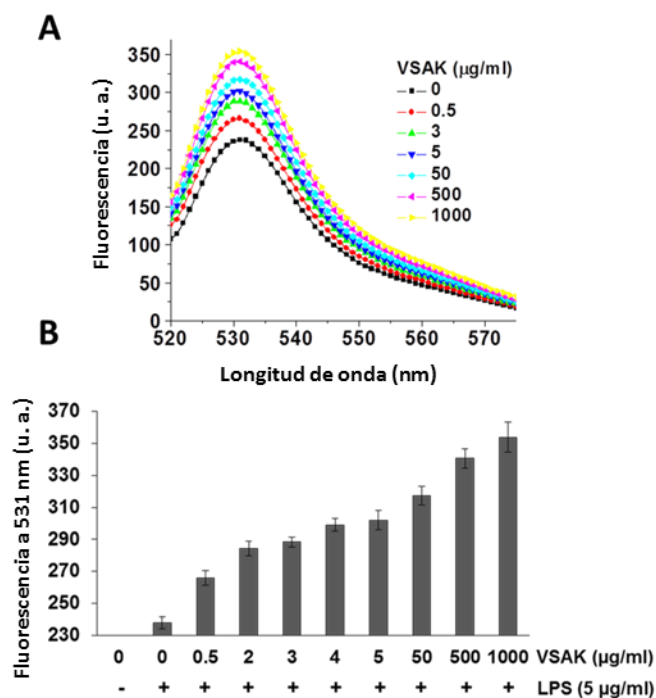


Figura 13. Caracterización de la unión del péptido VSAK a LPS, a través de fluorescencia. **(A)** Gráfica del efecto generado por diferentes concentraciones de péptido VSAK al unirse a LPS acoplados con la sonda fluorescente BODIPY. Espectro de emisión en un intervalo de 520-575 nm, utilizando una longitud de onda de excitación de 513 nm. **(B)** Valores de emisión de fluorescencia a 531 nm. Se representan los valores promedio ($n=3$, $X \pm DE$).

5.4.3 Ensayos de interacción de cargas: Fuerza iónica

Para caracterizar el tipo de unión entre el péptido VSAK y los LPS, a las muestras se les adicionaron concentraciones crecientes de NaCl (0-1400 nM), considerando que la unión pudiera ser de tipo electrostático, y que ocurriera por la interacción de la carga positiva del péptido VSAK con la carga neta negativa del LPS. Los resultados mostraron una disminución en la señal detectada por la técnica de inmunotransferencia tipo Western blot, fenómeno atribuido a una menor unión

péptido VSAK-LPS debido a la presencia de los iones Na^+ y Cl^- . Este fenómeno fue observado a partir de una concentración de 200 mM de NaCl y la señal dejó de ser evidente con 1400 mM de NaCl (Figura 14A). En este sentido, cuando el efecto de las concentraciones crecientes de NaCl en el experimento de fluorescencia péptido VSAK-LPS-BODIPY-FL fue evaluado, se encontró una disminución significativa en los valores de fluorescencia a 531 nm y a una concentración a 400 mM los valores fueron similares a los obtenidos con la muestra blanco que fue tratada con el péptido (Figura 14B y C).

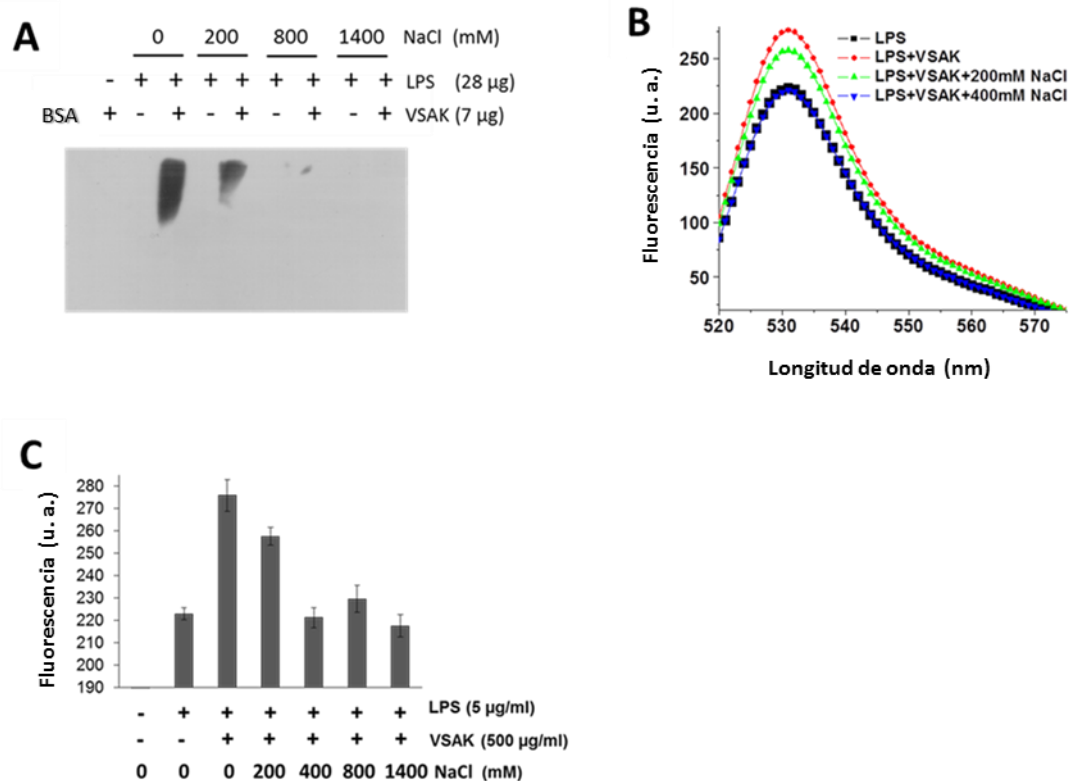


Figura 14. La unión del péptido VSAK a LPS está determinada por interacciones electrostáticas. **(A)** Evaluación del efecto de la fuerza iónica en la unión péptido VSAK-LPS, empleando concentraciones crecientes de NaCl. Inmunotransferencia tipo Western blot de geles nativos de gradiente. **(B)** Valores de emisión de fluorescencia a 531 nm. **(C)** Espectro de emisión generado con la sonda BODIPY acoplada a LPS, considerando la emisión de 531 nm. Se representan los valores promedio ($n=3$, $X \pm \text{DE}$).

5.4.4 Ensayos con fosfatasa alcalina (AP)

Siendo que en la unión del péptido VSAK a los LPS participan fuerzas de tipo electrostático, el experimento subsecuente fue encaminado a demostrar que el sitio en el cual el péptido se une al LPS se localiza en el lípido A, debido a que contiene en su estructura grupos fosfato que le otorgan una carga negativa. Utilizando un tratamiento de los LPS con fosfatasa alcalina, se demostró por inmunotransferencia de tipo Western blot que la unión del péptido a los LPS desfosforilados deja de ser evidente (Figura 15).

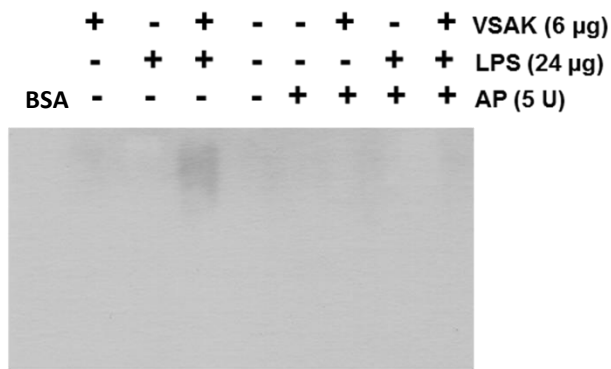


Figura 15. Evaluación de la unión péptido VSAK-LPS empleando fosfatasa alcalina (AP). Inmunotransferencia tipo Western blot en un gel de gradiente nativo, utilizando el anticuerpo anti-CETPI.

5.4.5 Ensayos de fluorescencia en cultivo celular

Posteriormente, se decidió evaluar si la unión de péptido VSAK a los LPS podría llevarse a cabo en condiciones de cultivo celular de macrófagos. A los cultivos de

células RAW se les adicionó péptido VSAK antes del tratamiento con LPS-BODIPY-FL, y los medios extracelulares fueron concentrados utilizando un centricon. Las mediciones de fluorescencia evidenciaron un ligero incremento en la señal cuando el péptido VSAK estuvo presente (Figura 16), de manera similar a lo que se encontró *in vitro* en el experimento que se muestra en la Figura 13.

Con base en estos resultados, se realizaron ensayos para determinar si el péptido evitaba que los LPS se unieran a la superficie de los macrófagos. A diferencia del experimento previo, el medio extracelular fue retirado y se evaluó la presencia de la sonda remanente en el cultivo celular. Los resultados obtenidos por el lector de placas demostraron una disminución en la unión de los LPS a macrófagos cuando fueron tratados previamente con péptido VSAK (Figura 17A). En una relación LPS-péptido VSAK 1:400 el efecto fue equiparable al producido por el control de Polimixina B (60 $\mu\text{g/ml}$), obteniendo resultados similares cuando se emplearon LPS de *Escherichia coli* BODIPY-FL. A continuación, se demostró que bajo las mismas condiciones experimentales el péptido VSAK también es capaz de desplazar los LPS unidos a la superficie de macrófagos (Figura 17B).

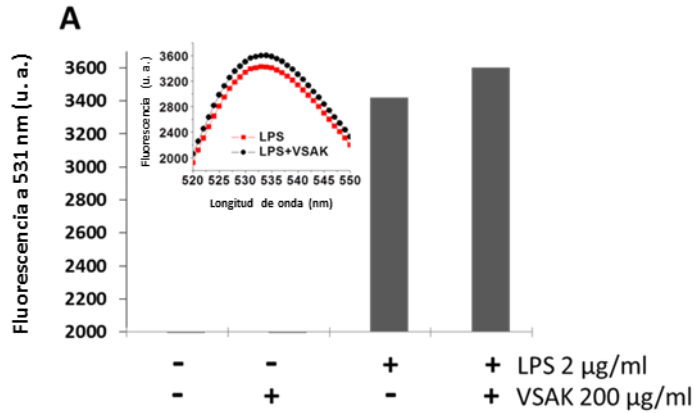


Figura 16. La unión del péptido VSAK a LPS también se lleva a cabo en condiciones de cultivo celular de macrófagos. Medios extracelulares evaluados mediante fluorescencia utilizando la sonda BODIPY acoplada a LPS. El inserto en la gráfica muestra los resultados de emisión en un rango de 520-550 nm. Ensayo demostrativo de una muestra.

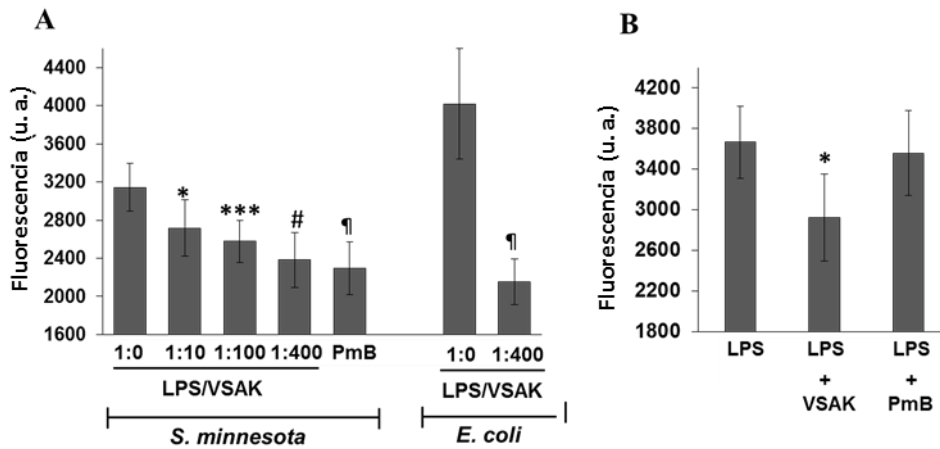


Figura 17. El péptido VSAK reduce la unión de los LPS a los receptores celulares de macrófagos. **(A)** Evaluación del efecto de concentraciones crecientes de péptido VSAK sobre la unión de LPS a su receptor, empleando LPS de *S. minnesota* y *E. coli* 055:B5 acoplados a la sonda Alexa. **(B)** Los LPS unidos a su receptor pueden ser desplazados, si el péptido VSAK es añadido posteriormente al medio extracelular. Se representan los valores promedio ($n=5$, $X \pm DE$), * $p<0.1$, *** $p<0.01$ # $p<0.005$, ¶ $p<0.001$ valores comparados con el control.

5.5 Ensayos de viabilidad celular en presencia del péptido VSAK

Con base en el ensayo de MTT, se encontró que la presencia del péptido VSAK tiene un efecto protector de la citotoxicidad generada por LPS cuando el péptido es adicionado a las células antes del tratamiento con LPS. El máximo nivel de protección ocurre a una concentración de 1000 ng/mL de péptido VSAK. Además, el péptido *per se* no demostró inducir citotoxicidad bajo ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 18).

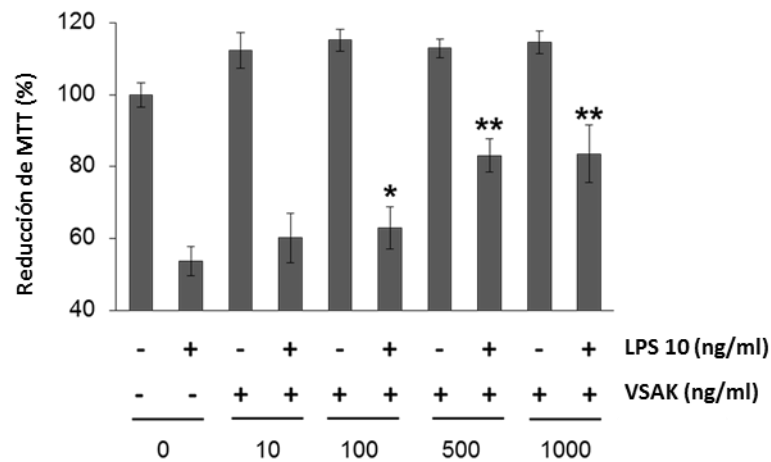


Figura 18. El péptido VSAK previene el efecto citotóxico ocasionado por LPS en macrófagos. Gráfica de la viabilidad celular de cultivos tratados durante 45 min, con concentraciones crecientes de péptido VSAK de manera previa a la adición de LPS. Se representan los valores promedio (n=6, $X \pm DE$), *p<0.05, **p<0.001 comparados con los controles.

En un experimento complementario, en el que los macrófagos fueron estimulados durante diferentes tiempos con 10 ng/mL de LPS (0, 2, 4 y 12 h) antes de adicionar concentraciones crecientes de péptido VSAK, se observó que a una concentración de 1,000 ng/mL de péptido VSAK la citotoxicidad fue menor que en el control (Figura 19). De manera que existe un fenómeno de protección por el tratamiento con el péptido VSAK.

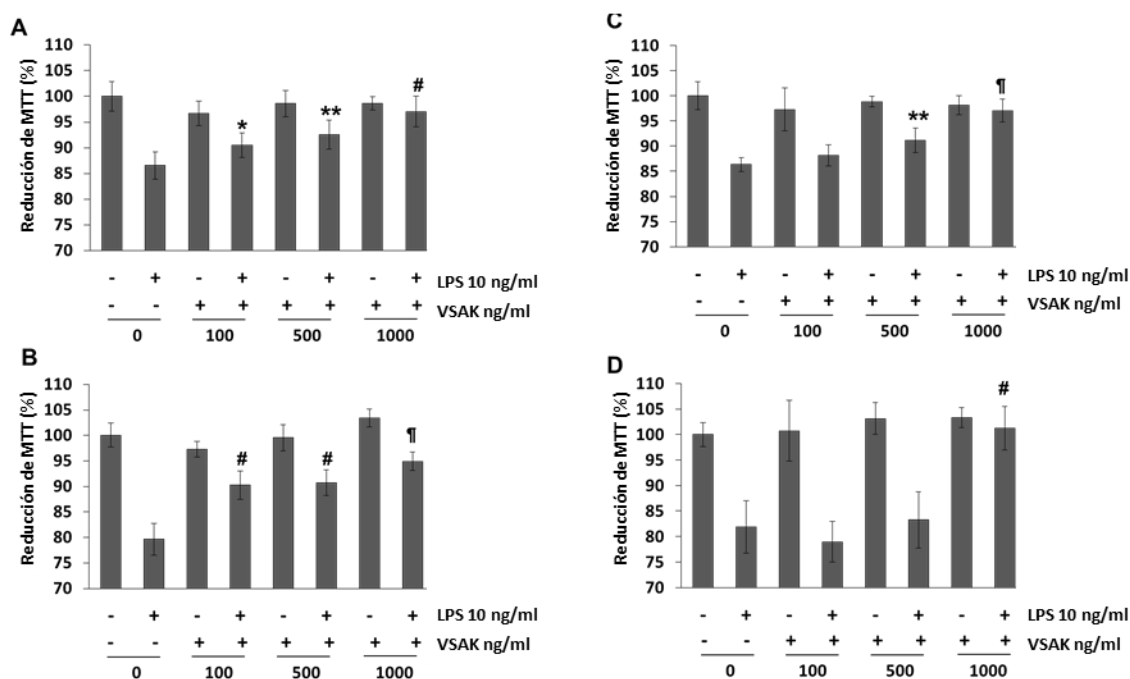


Figura 19. El péptido VSAK contrarresta el efecto citotóxico producido por LPS en macrófagos. **(A)** Control experimental. Cultivos celulares fueron incubados durante 45 min con LPS 10 ng/ml. **(B)** Efecto de los LPS sobre la viabilidad celular, cuando las células son incubadas con la endotoxina, durante 2h previas a la adición de péptido VSAK, 4h **(C)** y 12 h **(D)**. En todos los casos, posteriormente a la adición de péptido VSAK, las células se incubaron durante 20 h. Se representan los valores promedio (n=6, $X \pm DE$), *p<0.05, **p<0.01, #p<0.001, ¶p<0.0001 comparados con el grupo control.

Finalmente, se evaluó la citotoxicidad que pudiera tener el péptido VSAK en células de microglía e hígado. Los resultados indican que el péptido no es citotóxico incluso adicionando 56 $\mu\text{g/mL}$, que es una concentración muy por arriba de la dosis que tiene un efecto protector en macrófagos (Figura 20).

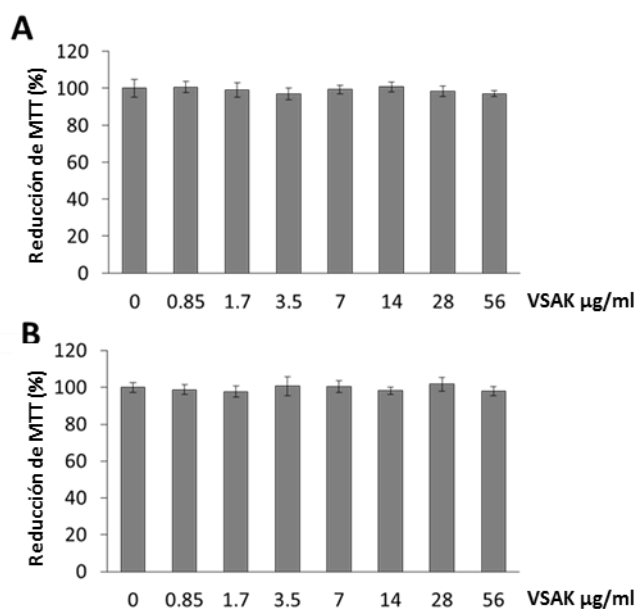


Figura 20. Evaluación del efecto citotóxico del péptido VSAK en hepG2 y células EOC de microglía. Ensayos de MTT en hepG2 (A) y células de microglía (B). Se representan los valores promedio ($n=5$, $X \pm \text{DE}$).

5.6 Protocolo experimental en conejos

Con el objetivo de evaluar el efecto del péptido VSAK como molécula capaz de contrarrestar los efectos de los LPS *in vivo*, se diseñó un experimento piloto de choque séptico utilizando al conejo como animal experimental. En la clínica, el

método más sencillo para determinar la presencia de choque séptico es el incremento de la temperatura del paciente de manera abrupta, que posteriormente se correlaciona con la disminución del ritmo cardiaco que conlleva a la hipoxia y daño de órganos vitales. En el protocolo experimental que se desarrolló, el registró de la temperatura rectal de los conejos con los diferentes tratamientos evidenció que el péptido VSAK es capaz de controlar el aumento de temperatura ocasionado por los LPS ($\Delta T=1.7^{\circ}\text{C}$), en comparación con el grupo que solo recibió la administración de LPS ($\Delta T=2.3^{\circ}\text{C}$). Además, el péptido VSAK *per se* no demostró generar efectos adversos en los animales ($\Delta T=0.2^{\circ}\text{C}$) (Figura 21).

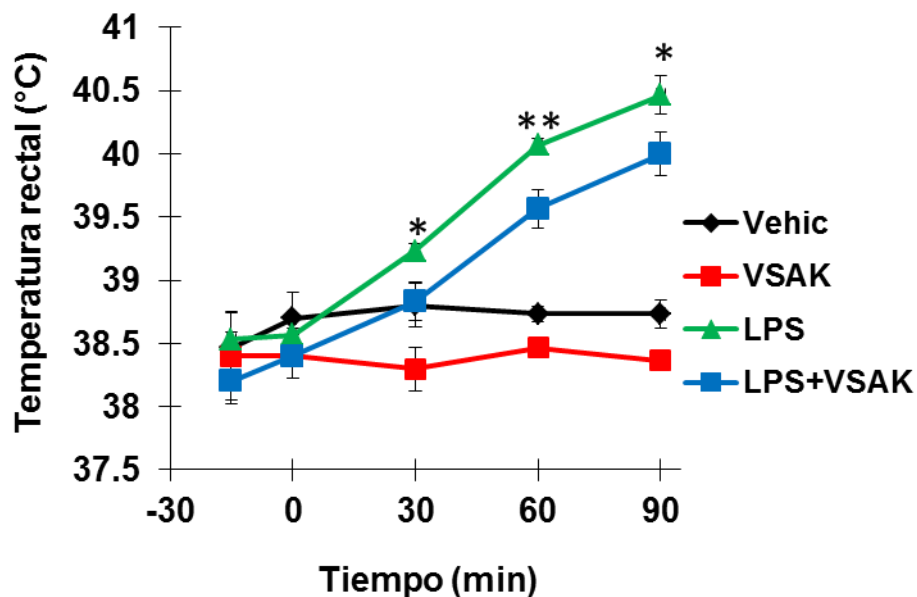


Figura 21. Evaluación del efecto protector del péptido VSAK en un modelo animal de conejos. Registro de la temperatura rectal en grupos experimentales durante un periodo de 90 min. El tratamiento administrado en una sola dosis fue en una relación 1:200 de LPS: péptido VSAK. Se representan los valores promedio ($n=3$, $X \pm \text{DE}$). Los valores $*p<0.05$, $**p<0.01$ fueron obtenidos comparando el grupo control de LPS con respecto al grupo que recibió LPS y el péptido VSAK.

5.7 Determinación de $TNF\alpha$ en suero de conejos

Finalmente, para estudiar el efecto del péptido VSAK en un evento de choque séptico en animales experimentales considerando la respuesta inmunológica, se determinó la concentración de $TNF\alpha$ en suero, ya que es una citocina producida por el sistema inmune innato y que está involucrada en el desarrollo de hipotensión. En este sentido, de acuerdo con lo esperado la concentración de $TNF\alpha$ incrementó considerablemente cuando los conejos fueron tratados con LPS exclusivamente. Sin embargo, con el tratamiento de péptido VSAK en este primer experimento piloto, se observó una posible tendencia en la disminución de la concentración de $TNF\alpha$ en el torrente sanguíneo y el tratamiento con el péptido VSAK *per se* no generó la producción de la citocina. No obstante, será necesario comprobar los resultados obtenidos realizando un experimento con un mayor tamaño de muestra.

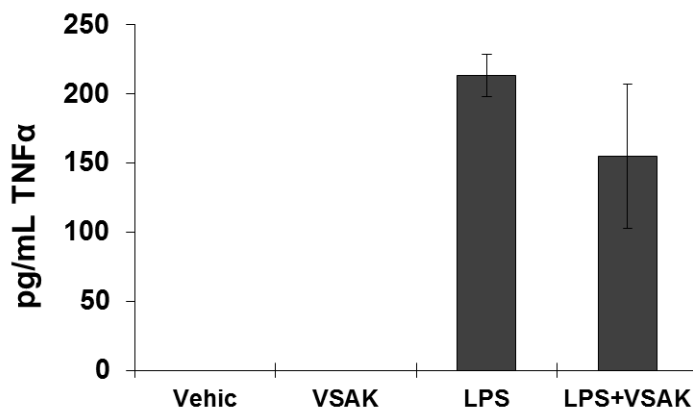


Figura 22. Determinación de la concentración de $TNF\alpha$ en suero de conejos. Cuantificación realizada con un kit de ELISA comercial. Se representan los valores promedio ($n=3$, $X \pm EE$).

6. DISCUSIÓN

A partir de la publicación de la estructura cristalográfica de CETP en el año 2007⁸, los estudios sobre su mecanismo de funcionamiento se ampliaron. Particularmente, la propuesta sobre la importancia del dominio C-terminal de la proteína en la transferencia de lípidos pudo ser sustentada experimentalmente en el laboratorio⁶. En consecuencia, considerando que la proteína CETPI descubierta en nuestro laboratorio se diferencia de CETP exclusivamente en el C-terminal⁷, resultó de gran interés conocer la función de esta nueva isoforma.

Con base en estudios de alineamiento de secuencias y análisis de las estructuras cristalográficas de algunas proteínas pertenecientes a la familia PLUNC^{8,29,38,39}, resultó evidente que CETP y BPI comparten un plegamiento global similar, por lo que se generó la hipótesis de que CETPI podría tener al igual que BPI la capacidad de unirse a LPS. Esta propuesta, fue sustentada por experimentos previos del laboratorio en los que empleando varios modelos celulares de intestino delgado bajo el estímulo con concentraciones muy bajas de LPS, se registró un aumento en la expresión de CETPI (*Véase Publicaciones 10.3*).

Con la finalidad de poder estudiar la unión de CETPI a LPS, la estrategia experimental que se planteó inicialmente, involucraba la purificación de la proteína. Se diseñó un vector para la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO-S). Esta línea celular fue seleccionada para la transfección debido a que tiene la cualidad de adaptarse con facilidad al crecimiento en suspensión,

permitiendo la obtención de altos niveles de expresión de las proteínas de interés y además presentan la capacidad de proliferar en ausencia de suero fetal bovino, lo que evita complicaciones en el proceso de purificación. Sin embargo, después de probar diversas condiciones experimentales, la obtención de la proteína a partir de la transfección de las células CHO-S fue deficiente, aun cuando la optimización de la secuencia diseñada para la traducción de la proteína se obtuvo considerando este tipo celular.

Con base en los resultados, se decidió utilizar este mismo vector en otras líneas celulares como HepG2, Caco2, RAW y HEK-293. No obstante, únicamente se obtuvieron resultados positivos de la transfección transitoria de células HEK-293. Con esta línea celular, mediante inmunotransferencia tipo Western blot se detectó la presencia de la proteína en el medio extracelular, sin embargo este resultado se obtuvo bajo condiciones que requieren altas concentraciones de plásmido y lipofectamina, y la cantidad de proteína no fue suficiente para poder llevar a cabo su purificación.

Debido a que la transfección transitoria impedía que la obtención de CETPI pura fuera viable, se decidió realizar experimentos con péptidos derivados del C-terminal de CETPI, en cuya secuencia hay un alto número de aminoácidos con carga positiva que se ha descrito son importantes para proteínas y péptidos que se unen a bacterias Gram-negativas o bien a sus componentes.

Se demostró que el péptido con mayor afinidad por los LPS es VSAK de 18 aminoácidos. Este péptido comparte ciertas características que han sido

importantes para otros péptidos que tienen la capacidad de unión a LPS, como son la longitud de su secuencia, la presencia de residuos de lisina y arginina y que la carga electrostática neta sea positiva ^{13,14, 24}. De acuerdo con lo anterior, los resultados evidenciaron que el péptido ARS con carga neta +2, tiene una menor afinidad por los LPS en comparación con el péptido VSAK que tiene una carga neta de +3, es más hidrofóbico y de mayor longitud. En consecuencia, a diferencia de los péptidos (VFR12 y GKY25) reportados por Singh y colaboradores (2013) ⁴⁰, el péptido VSAK reúne las características fisicoquímicas óptimas para su unión al lípido A de los LPS que se encuentran fuera de la membrana bacteriana.

De tal forma que el siguiente experimento tuvo como objetivo evaluar la especificidad de esta unión utilizando controles de CETP y LPS de otros serotipos, demostrando que el péptido VSAK es específico y tiene capacidad de unión a los serotipos O111:B4, O26:B6 y O55:B5 de *E.coli*. Posteriormente, se decidió evaluar la unión mediante fluorescencia, y de manera similar a lo que ha sido descrito por otros autores ^{19 21}, la unión del péptido VSAK a LPS genera una señal de emisión mayor, que corresponde con la capacidad del péptido para alterar los niveles de agregación de los LPS. Incluso se ha propuesto que la reorganización de las micelas de LPS en agregados de menor tamaño reduce su capacidad de unión a LBP y en consecuencia la producción de citocinas proinflamatorias como TNF α disminuye ^{21, 14}.

A diferencia de otros péptidos que han sido caracterizados por poseer propiedades

de unión a LPS ⁴¹, en el laboratorio se observó que el péptido VSAK no adquiere una estructura hélice- α en presencia de LPS (véase *Publicaciones 10.3*), lo que pudiera representar una ventaja ya que la interacción se llevaría a cabo sobre la superficie con un componente electrostático importante y en consecuencia tendría afinidad por los LPS cargados negativamente en el plasma más no por aquellos que están en la membrana bacteriana, pudiendo así evitar que más endotoxinas fueran liberadas al torrente sanguíneo. En este sentido, en nuestro proyecto de investigación, una de las perspectivas que se han planteado con base en el análisis de los resultados obtenidos, es llevar a cabo la evaluación del reordenamiento de los LPS generado por el péptido VSAK.

Como parte de la caracterización de la unión del péptido VSAK a LPS, mediante inmunotransferencia tipo Western blot y ensayos de fluorescencia utilizando concentraciones crecientes de NaCl, se determinó que la unión péptido VSAK-LPS está dada por interacciones electrostáticas. Con base en experimentos realizados con Polimixina B en donde se reporta que cuando las moléculas de LPS se agregan en micelas las cargas negativas del lípido A quedan accesibles para que se lleve a cabo la interacción ⁴², se propuso que el sitio de unión de péptido VSAK a los LPS es el lípido A ^{26,43}. Empleando fosfatasa alcalina, se demostró que en ausencia de las cargas negativas en los LPS, la unión con el péptido VSAK no se lleva a cabo.

Después de haber reunido evidencia experimental de la unión péptido VSAK-LPS

y haberla caracterizado, se iniciaron los experimentos sobre el estudio de esta unión bajo condiciones de cultivo celular, siendo una herramienta clave el uso de LPS acoplados a una sonda fluorescente. Los resultados demostraron de manera muy interesante que la unión se lleva a cabo y que al igual que los experimentos previos, la intensidad de la señal de los LPS incrementa ligeramente cuando el péptido está presente en el medio extracelular.

El tratamiento de los cultivos celulares con la sonda fluorescente, demuestra que en ausencia del péptido el LPS se une a la superficie celular, pero conforme las concentraciones del péptido VSAK incrementan esta unión disminuye y es un fenómeno que se repite utilizando diferentes serotipos y sondas. Como estándar en estos análisis se empleó Polimixina B, que es una molécula con una alta afinidad por los LPS, pero que por esta misma propiedad no es una molécula factible para su uso en el tratamiento contra LPS ^{24, 44}. En este sentido, resulta particularmente interesante que la unión del péptido VSAK a LPS no sea fuerte, ya que esta condición no favorece la desestabilización de las membranas celulares.

De manera interesante, se encontró que en ninguna de las líneas celulares evaluadas existe un efecto citotóxico ocasionado por la presencia de altas concentraciones de péptido VSAK. Por el contrario, en estudios con cultivos celulares de macrófagos, el péptido VSAK demostró ser capaz de prevenir el efecto citotóxico ocasionado por LPS.

Con base en lo anterior, el proyecto se complementó desarrollando un protocolo experimental piloto en el que se evaluó el efecto del péptido VSAK en conejos a los cuales se les indujo choque séptico mediante la administración de LPS. Los resultados demostraron que el incremento de temperatura generado como consecuencia de la respuesta inmunológica ante la presencia de LPS, es de menor magnitud cuando los animales reciben el tratamiento con el péptido VSAK, en comparación con el grupo de conejos a los que se les administraron LPS únicamente. Adicionalmente, de manera preliminar se observó que el péptido VSAK tiene una tendencia a disminuir la concentración de $TNF\alpha$ en plasma, sugiriendo que CETPI podría estar involucrada en mecanismos fisiológicos antiinflamatorios.

A pesar de que existen numerosas investigaciones utilizando péptidos derivados de proteínas naturales o bien que han sido sintetizados *de novo*, con el objetivo de generar tratamientos de protección contra el efecto endotóxico de los LPS, una de las limitantes más importantes ha sido la relación molar péptido/LPS ya que generalmente son muy altas, lo que limita su posible uso en humanos debido a la citotoxicidad intrínseca de los péptidos al ser administrados en estas concentraciones²⁴. Este análisis, resalta la importancia del presente proyecto ya que se demostró que en los conejos el péptido VSAK a una concentración de 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tiene un efecto protector.

En este sentido, con base en la investigación básica desarrollada en el laboratorio consideramos que péptidos derivados del C-terminal de CETPI tales como VSAK emergen como una nueva generación de moléculas que pueden ser empleadas en tratamientos contra septicemia y choque séptico, por lo que se realizó y registró un documento de patente para proteger el uso de estos péptidos (*Consultar el apartado 10*).

La capacidad de los péptidos derivados del C-terminal de CETPI para neutralizar los efectos tóxicos de los LPS en circulación, también sugieren que la función fisiológica de CETPI podría estar relacionada con la protección contra los LPS presentes en el torrente sanguíneo. Se ha descrito que durante un evento de infección bacteriana, la actividad de transporte reverso del colesterol llevada a cabo por la proteína CETP mediante la transferencia de esteres de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) a lipoproteínas de muy baja densidad ricas en triglicéridos (VLDL), disminuye. Incluso, se ha llegado a considerar que la presencia de bajos niveles de concentración de HDL en suero, pueden ser un factor de riesgo para el desarrollo de choque séptico⁴⁵⁻⁴⁷. Evidencia experimental indica que las HDL presentan la capacidad de disminuir los efectos tóxicos de los LPS impidiendo que se lleve a cabo su reconocimiento por el sistema inmunológico. Aunado a esto, actualmente se sabe que las proteínas LBP y BPI tienen la capacidad de transferir los LPS a las HDL lo que favorece su eliminación del torrente sanguíneo al ser exportados al hígado⁴⁸. En este sentido, la afinidad de CETPI por las lipoproteínas se esperaría que fuera mayor comparada con LBP y BPI debido a su similitud con CETP cuya función está

directamente relacionada con las HDL, razón por la cual nuestro estudio propone que CETPI podría ser una nueva proteína involucrada en la neutralización de los LPS y por lo tanto en la regulación de la respuesta inflamatoria exacerbada generada por estas endotoxinas.

7. CONCLUSIONES

- ❖ Péptidos derivados del C-terminal de la proteína CETPI tienen la capacidad de unirse a LPS y en la interacción participan fuerzas de tipo electrostático.
- ❖ El péptido VSAK reduce los efectos citotóxicos de los LPS en cultivos celulares de macrófagos.
- ❖ En las líneas celulares de macrófagos, hígado, riñón y microglia, el péptido VSAK *per se* no presenta un efecto citotóxico.
- ❖ En un modelo experimental piloto de choque séptico, el péptido VSAK sugiere que podría controlar los efectos fisiológicos nocivos ocasionados por los LPS y reducir la producción de la citocina proinflamatoria $TNF\alpha$.
- ❖ Péptidos derivados del C-terminal de CETPI podrían ser utilizados como protectores de los efectos tóxicos de los LPS y el desarrollo del choque séptico.

8. PERSPECTIVAS

- ❖ Optimizar la sobreexpresión de la proteína CETPI en células eucariontes y purificarla
- ❖ Estudiar la unión de la proteína CETPI a los LPS tanto *in vitro* como *in vivo* con base en las técnicas desarrolladas en el laboratorio.
- ❖ Evaluar el posible reordenamiento de las moléculas de LPS generado por su interacción con el péptido VSAK.
- ❖ Optimizar la secuencia del péptido VSAK con la finalidad de poder generar una mayor protección contra los efectos citotóxicos de los LPS.
- ❖ Desarrollar un protocolo experimental *in vivo* con un mayor número de animales, y mediante la implementación de técnicas para la medición de diferentes indicadores de citotoxicidad comprobar el efecto protector del péptido VSAK y los péptidos optimizados.

9. REFERENCIAS

1. Beamer, L. J., Carroll, S. E. & Eisenberg, D. The BPI / LBP family of proteins : A structural analysis of conserved regions. *Protein Sci.* **7**, 906–914 (1998).
2. Chiang, S. C. *et al.* Identification and characterisation of the BPI/LBP/PLUNC-like gene repertoire in chickens reveals the absence of a LBP gene. *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 285–295 (2011).
3. Bingle, C. D. & Craven, C. J. PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 937–943 (2002).
4. Bolaños-García, V. M., Soriano-García, M. & Mas-Oliva, J. Stability of the C-terminal peptide of CETP mediated through an (i, i + 4) array. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1384**, 7–15 (1998).
5. García-González, V. & Mas-Oliva, J. Amyloidogenic properties of a D/N mutated 12 amino acid fragment of the C-terminal domain of the cholesteryl-ester transfer protein (CETP). *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 2019–2035 (2011).
6. García-González, V. *et al.* Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity. *J. Struct. Biol.* **186**, 19–27 (2014).
7. Alonso, A. L., Zentella-Dehesa, A. & Mas-Oliva, J. Characterization of a naturally occurring new version of the cholesterol ester transfer protein (CETP) from small intestine. *Mol. Cell. Biochem.* **245**, 173–82 (2003).
8. Qiu, X. *et al.* Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. **14**, 106–113 (2007).
9. Levy, O. MINIREVIEW A Neutrophil-derived anti-infective molecule : bactericidal / permeability-increasing protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2925–2931 (2000).
10. Levy, O. & Elsbach, P. Bactericidal / permeability-increasing protein in host defense and its efficacy in the treatment of bacterial sepsis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **3**, 407–412 (2001).
11. Balakrishnan, A., Marathe, S. a, Joglekar, M. & Chakravorty, D. Bactericidal/permeability increasing protein: a multifaceted protein with functions beyond LPS neutralization. *Innate Immun.* **19**, 339–47 (2013).

12. Canny, G. *et al.* Lipid mediator-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3902–3907 (2002).
13. Schmidtchen, A. & Malmsten, M. Current opinion in colloid & interface science peptide interactions with bacterial lipopolysaccharides. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **18**, 381–392 (2013).
14. Pulido, D., Nogués, M. V., Boix, E. & Torrent, M. Lipopolysaccharide neutralization by antimicrobial peptides : A gambit in the innate host defense strategy. *J. Innate Immun.* **4**, 327–336 (2012).
15. Levy, O. Review article Antimicrobial proteins and peptides of blood : templates for novel antimicrobial agents. *Blood* **96**, 2664–2672 (2000).
16. Nguyen, L. T., Haney, E. F. & Vogel, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* **29**, 464–472 (2011).
17. Amersfoort, E. S. Van, Berkel, T. J. C. Van & Kuiper, J. Receptors , mediators , and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 379–414 (2003).
18. Brandenburg, K. *et al.* Molecular basis for endotoxin neutralization by amphipathic peptides derived from the α -helical cationic core-region of NK-lysin. *Biophys. Chem.* **150**, 80–87 (2010).
19. Mohanram, H. & Bhattacharjya, S. Resurrecting inactive antimicrobial peptides from lipopolysaccharide (LPS) Trap. *Antimicrob. Agents Chemother.* **Accepted**, (2014).
20. Park, B. S. *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4 – MD-2 complex. *Nature* **458**, 1191–1195 (2009).
21. Rosenfeld, Y., Papo, N. & Shai, Y. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J. Biol. Chem.* **281**, 1636–1643 (2006).
22. Miller, S. I., Ernst, R. K. & Bader, M. W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 36–46 (2005).
23. Triantafilou, M. & Triantafilou, K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J. Endotoxin Res.* **11**, 5–11 (2005).

24. Gutschmann, T. *et al.* New antiseptic peptides to protect against endotoxin-mediated shock. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3817–3824 (2010).
25. Watts, C. Location, location, location: identifying the neighborhoods of LPS signaling. *Nat. Immunol.* **9**, 343–5 (2008).
26. Kim, H. M. *et al.* Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist eritoran. *Cell* **130**, 906–917 (2007).
27. Dickinson, R. J. & Keyse, S. M. Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J. Cell Sci.* **119**, 4607–15 (2006).
28. Annane, D., Bellissant, E. & Cavillon, J. Septic shock. *Lancet* **365**, 63–78 (2005).
29. Eckert, J. K. *et al.* The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity. *Immunity* **39**, 647–660 (2013).
30. *Lipid A in Cancer Therapy*. 136 (Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC, 2009).
31. Dinarello, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic Shock. *Chest* **112**, 321S–329S (1997).
32. *Endotoxins: Pyrogens, LAL testing and depyrogenation*. 419 (Informa Healthcare USA, Inc., 2007).
33. Nguyen, H. *et al.* Infectious disease/ Review article: Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Ann. Emerg. Med.* **48**, 28–54 (2006).
34. Gonzalo, S. *et al.* Intestinal effects of lipopolysaccharide in rabbit are mediated by cyclooxygenase-2 through p38 mitogen activated protein kinase. *Eur. J. Pharmacol.* **648**, 171–178 (2010).
35. Huet, O. & Chin-Dusting, J. P. Septic shock : desperately seeking treatment. *Clin. Sci.* **126**, 31–39 (2014).
36. Rathinam, V. & Fitzgerald, K. Lipopolysaccharide sensing on the inside. *Nat. News Views Res.* **501**, 7–9 (2013).
37. Marolda, C. & Valvano, M. Micromethods for the characterization of lipid A-core and O-antigen lipopolysaccharide. *Glycobiol. Protoc.* **347**, (2007).

38. Hall, J. & Qiu, X. Structural and biophysical insight into cholesteryl ester-transfer protein. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1000–1005 (2011).
39. Beamer, L. J. Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. *Science (80-.)*. **276**, 1861–1864 (1997).
40. Singh, S., Kalle, M., Papareddy, P., Schmidtchen, A. & Malmsten, M. Lipopolysaccharide interactions of C-terminal peptides from human thrombin. *Biomacromolecules* **14**, 1482–1492 (2013).
41. Seelig, J. Thermodynamics of lipid – peptide interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 40–50 (2004).
42. Soon, R. L. *et al.* Design , synthesis , and evaluation of a new fluorescent probe for measuring polymyxin – lipopolysaccharide binding interactions. *Anal. Biochem.* **409**, 273–283 (2011).
43. Ohto, U., Fukase, K., Miyake, K. & Shimizu, T. Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4 / MD-2. *PNAS* **109**, 7421–7426 (2012).
44. Domingues, M. M. *et al.* Biophysical characterization of polymyxin B interaction with LPS aggregates and membrane model systems. *Biopolymers* **98**, 338–44 (2012).
45. Grion, C. M. C. *et al.* Lipoproteins and CETP levels as risk factors for severe sepsis in hospitalized patients. *Eur. J. Clin. Invest.* **40**, 330–8 (2010).
46. Masucci-Magoulas, L. *et al.* Decreased cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA and protein and increased high density lipoprotein following lipopolysaccharide administration in human CETP transgenic mice. *J. Clin. Invest.* **95**, 1587–94 (1995).
47. Hardardóttir, I. *et al.* Endotoxin and cytokines decrease serum levels and extra hepatic protein and mRNA levels of cholesteryl ester transfer protein in syrian hamsters. *J. Clin. Invest.* **97**, 2585–2592 (1996).
48. Catapano, A. L., Pirillo, A., Bonacina, F. & Norata, G. D. HDL in innate and adaptive immunity. *Cardiovasc. Res.* **103**, 372–383 (2014).

10.PUBLICACIONES

10.1 *Capítulo del libro editado en el marco del 150 aniversario de la Academia Nacional de Medicina.*

Academia Nacional de Medicina

Nuevos Péptidos y Proteínas con la Capacidad de Unión a Lipopolisacáridos como Potenciales Agentes Terapéuticos contra el Choque Séptico.

Nadia Gutiérrez Quintanar⁺, Victor García González⁺ y Jaime Mas Oliva*

Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México.

Resumen

El sistema inmune innato al proveer un rápido y efectivo sistema de defensa altamente regulado contra infecciones microbianas, bajo ciertas condiciones puede llevar a cabo una respuesta exacerbada, la cual a su vez puede representar un riesgo para la homeostasis del organismo. Actualmente es bien conocido que a través de una serie de eventos responsables de la transición de sepsis a choque séptico, tanto la activación celular de monocitos, macrófagos y neutrófilos, así como la aparición de una gran cantidad de moléculas provenientes de las células bacterianas en circulación, son importantes en esta transición. Particularmente, uno de los factores primarios que desencadenan las condiciones adversas en el choque séptico son los lipopolisacáridos (LPS), lípidos que forman parte de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. En este sentido, la literatura especializada muestra a un grupo de proteínas y péptidos con características catiónicas que presentan afinidad por la superficie microbiana cargada negativamente y por lo tanto por los LPS's, que a su vez se han utilizado como moléculas amortiguadoras o bloqueadoras de la acción negativa de estos lípidos sobre la membrana plasmática de diversos tipos celulares del torrente circulatorio al igual que de la pared vascular.

En nuestro laboratorio, desde hace ya algunos años, se descubrió una nueva isoforma de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETPI), la cual no presenta la capacidad de

transferir lípidos entre lipoproteínas. Estudios experimentales recientes sugieren que esta proteína en busca de función puede estar relacionada con la unión a los LPS's. A través del diseño y uso de péptidos derivados de un nuevo dominio clave situado en el extremo C-terminal de CETPI, hemos documentado la presencia de una función bloqueadora del efecto citotóxico inducido por los LPS. Independientemente de los estudios que han realizado grupos de trabajo internacionales con diversos péptidos y proteínas en el bloqueo de los LPS, estos tratamientos no han sido completamente efectivos. Con el descubrimiento de esta nueva potencial función fisiológica para CETPI, se abre una nueva posibilidad para extender nuestros estudios básicos, al diseño específico de péptidos derivados de su dominio C-terminal y la extensión a experimentación *in vivo*.

El presente capítulo revisa el estado del arte en el uso de proteínas y péptidos que presentan la capacidad de interactuar con LPS y su potencial uso en el control del llamado choque séptico.

+ Por invitación. Ambos autores contribuyeron de igual forma en este trabajo.

* Correspondencia: Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México. México 04510 D.F. AP 70-242. Correo electrónico: jmas@ifc.unam.mx

Introducción

El tratado *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* o Códice De la Cruz-Badiano escrito en 1552 por el médico náhua Martín de la Cruz y traducido al latín por el xochimilca Juan Badiano, es un herbario con texto explicativo que recopila un amplio conocimiento sobre las plantas medicinales y su uso en el tratamiento de enfermedades de la época (Figura 1) [1]. Herencia cultural, con un alto significado y valor científico, el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* ha resultado ser uno de los documentos más útiles en el estudio del pensamiento médico prehispánico, apenas traducido al castellano en 1969 [2].

El Códice De la Cruz-Badiano es un reflejo de la búsqueda constante del hombre para encontrar la cura contra enfermedades y malestares comunes. Martín de la Cruz hace referencia a la fiebre de la siguiente manera: “*La cara del febricitante tiene varias manifestaciones de aspectos. Alguna vez se pone roja, a veces se pone negra y a veces se pone pálida. También escupe sangre, vomita, el cuerpo se agita y se vuelve acá y allá. Ve poco. En la boca siente a veces, en especial en el paladar amargor, ardor y, alguna vez, dulzor... Éste generalmente tiene muy corrompido el estómago. Y cuando la orina está blanca, si no se ataja el peligro, ya se preparará tarde la medicina*” [1].

Actualmente la fiebre y su asociación con el choque séptico, tanto a nivel mundial como en México, representan en su conjunto una de las principales causas de morbilidad y mortalidad [3]. La sepsis, en su expresión más simple puede ser considerada como la respuesta sistémica generada en forma secundaria a una infección microbiana mediante la liberación en el torrente sanguíneo de un número importante de toxinas. Estas últimas al producir una inflamación sistémica alteran la temperatura corporal, así como el ritmo cardíaco y la respiración, pudiendo llevar al paciente a eventos hipotensivos importantes [4]. Por lo anterior, hoy en día, el objetivo de una amplia serie de investigaciones está relacionado con la comprensión de los mecanismos moleculares que promueven el choque séptico, así como con la búsqueda de estrategias bioquímicas y/o farmacológicas efectivas para su tratamiento.

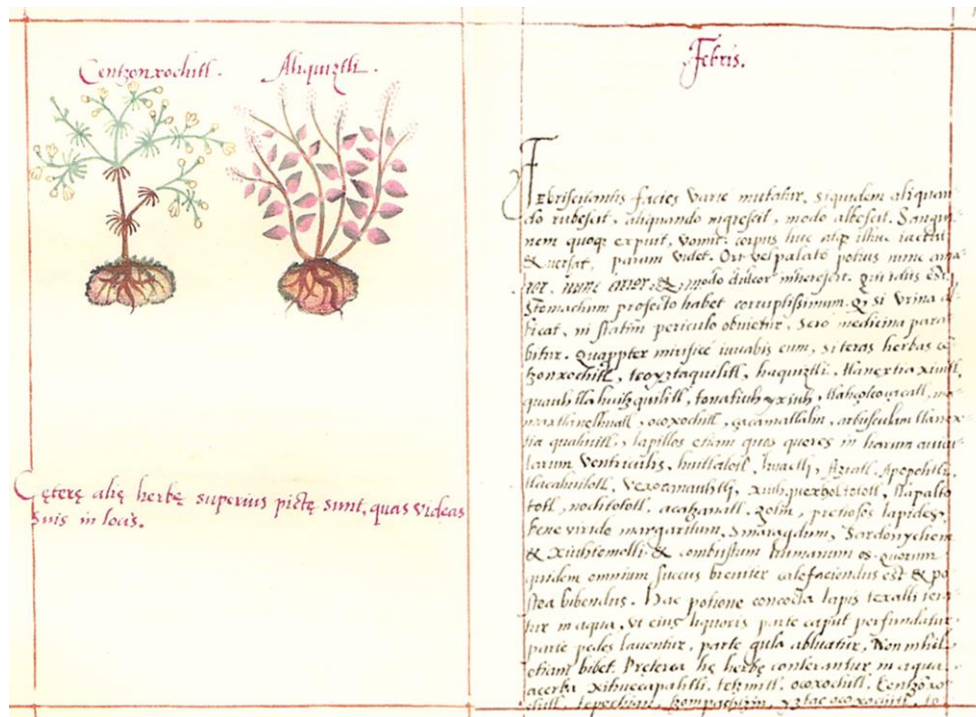


Figura 1. Imagen obtenida del *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* en donde se hace referencia al tratamiento recomendado para la fiebre [1,2].

Respuesta del sistema inmune

Generalmente, los sistemas inmune y neuroendocrino controlan de forma sutil diversos procesos de respuesta secundarios a la presencia de patógenos invasores en circulación. Generalmente cuando estos mecanismos de respuesta fallan, se genera la sobreproducción de moléculas de señalización como lo son las citocinas, la liberación de componentes celulares bacterianos e inicia la aparición de inflamación sistémica, convirtiendo la infección en sepsis [5,6]. Se ha reportado que cerca de una tercera parte de los casos de choque séptico son originados por infecciones de bacterias Gram-negativas [5].

Una serie de eventos son los responsables de la transición de un cuadro de sepsis, a choque séptico. La reacción inicial está dada por la activación celular de monocitos, macrófagos y

neutrófilos que interactúan con las células endoteliales a través de numerosos receptores de reconocimiento. Enseguida, se lleva a cabo la movilización de moléculas plasmáticas como resultado de la activación celular y el daño endotelial. Estas moléculas plasmáticas incluyen diversas citocinas como el factor de necrosis tumoral, las interleucinas, las caspasas, proteasas, leucotrienos, especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico, ácido araquidónico, eicosanoides y el factor activador de plaquetas. Adicionalmente, la activación del complemento y las cascadas de coagulación pueden amplificar la cadena de eventos.

Se ha descrito que el endotelio vascular es el sitio predominante de estas interacciones, y como resultado de estas condiciones puede presentarse un daño microvascular, trombosis y pérdida de integridad endotelial, lo que desencadena en isquemia tisular. Esta ruptura endotelial difusa es la responsable en la mayoría de los casos de la pérdida de la función de órganos y de la presencia de hipoxia tisular, conocido como un estado característico de pacientes en choque séptico [7].

El sistema reticuloendotelial está conformado por macrófagos tejido específicos, un componente importante de la respuesta primaria ante microorganismos [8]. En este contexto, los receptores tipo-Toll (TLRs) reconocen y responden a diversos componentes patogénicos de microorganismos, y proporcionan la primera línea de defensa contra infecciones microbianas. Entre los componentes microbianos, los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, actúan como un factor primario en el choque séptico al generar la potente respuesta inmune innata a través del complejo que se forma entre el receptor TLR tipo-4 y el correceptor MD-2 [9, 10]. Para que se produzca esta respuesta, se requiere de la participación de proteínas accesorias como LBP y CD14.

A través de la unión de los LPS a los receptores TLR-4, se inicia una cadena de reacciones de fosforilación y ubiquitinación que eventualmente conducen a la activación del factor de transcripción NF- κ B, así como a la activación de una serie de proteína cinasas por mitógenos (MAPKs) y factores de respuesta a interferón (IRFs). La endocitosis del TLR4 termina con la fase inicial de la señalización dependiente de MyD88, proceso que funciona como señal de inicio de la segunda fase dependiente de la molécula TRIF para la

transducción de moléculas de TLR4 localizadas en endosomas [11]. En consecuencia, los macrófagos principalmente en presencia de LPS, o de otros componentes bacterianos como el ácido lipoteicoico (LTA) inducen la liberación de una serie de mediadores de pro-inflamatorios, tales como el TNF- α , IL-1, IL-6, eicosanoides, PAF, NO y especies reactivas de oxígeno [8] (Figura 2).

Los TLR son miembros de una familia de receptores dedicados a la detección de microorganismos patógenos [12]. TLR4, es una proteína transmembranal tipo I, compuesta de 22 segmentos extracelulares ricos en leucinas (LRRs), un dominio transmembranal, y el dominio del receptor Toll/IL-1 (dominio TIR) [13]. De forma interesante, también se ha descrito que el serotipo LPS O111:B4 activa una respuesta alterna en macrófagos diferente a la vía canónica a través del TLR-4, esta respuesta es intracelular y lleva a la activación de la caspasa inflamatoria-11 [14,15].

Lipopolisacáridos

Como se ha mencionado previamente, uno de los factores primarios que induce la respuesta asociadas con el choque séptico, son los LPS, glucolípidos fosforilados que forman parte estructural de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. La descripción de los LPS se puede realizar identificando cuatro componentes: el lípido A, un núcleo interno, un núcleo externo y el antígeno O. El lípido A puede considerarse el componente más importante, integrado por un esqueleto de diglucosamina 1,4-bifosforilada a la cual están unidas cadenas acilo. Cabe señalar que la mayoría de las especies de bacterias Gram negativas presentan LPS únicos, en donde generalmente las variantes residen en el lípido A a través de las siguientes características:

- El patrón de acilación
- La longitud de los ácidos grasos
- La presencia de los grupos 4-amino-deoxi-L-arabinosa y/o fosfoetanolamina unidos a los grupos fosfato de las glucosaminas
- El número de ácidos grasos [8].

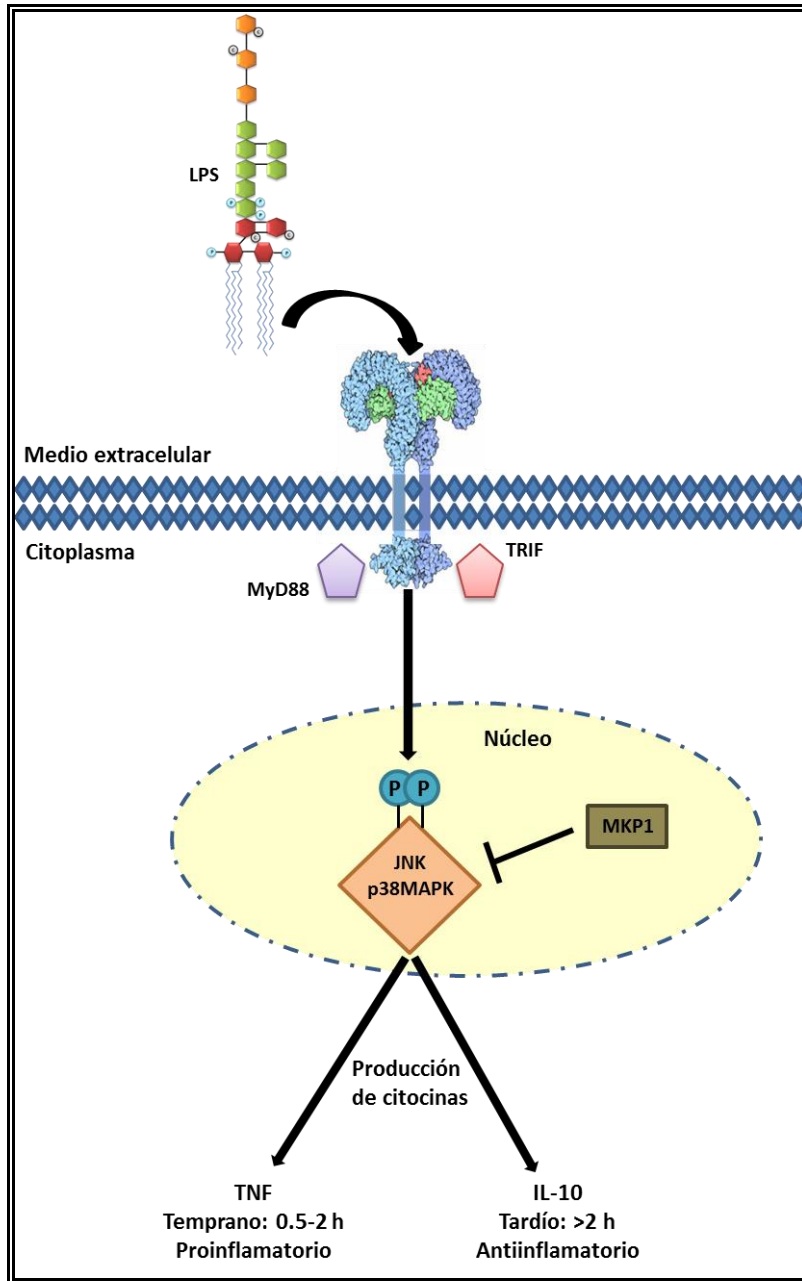


Figura 2. Los LPS generan una cascada de señalización a través del receptor tipo Toll (TLR), el cual recluta a las proteínas adaptadoras MyD88 y TRIF. Lo anterior conlleva a una respuesta temprana, en la cual las proteínas p38MAPK y JNK son activadas y participan en la expresión del TNF, posteriormente se lleva a cabo la inducción de la expresión de MKP-1, que funciona para la regulación río abajo de la actividad de p38/JNK y la producción de TNF. Conforme disminuye la expresión de MKP1, los niveles de actividad de p38 MAPK y JNK permanecen más altos que en células que no recibieron el estímulo y promueven la expresión de IL-10 [Adaptado de referencia 16].

Es importante considerar que en todas las variantes de LPS, los grupos fosfato son importantes para la actividad agonista, ya que en experimentos que conducen a su modificación, la actividad endotóxica se encuentra disminuida [8,17]. Dentro de la misma molécula de LPS, el núcleo interno está conformado por dos o más carbohidratos del tipo 2-ceto-3-ácido deoxioctónico (KDO) que se unen a las glucosaminas del lípido A, así como dos o tres heptosas (L-glicero-D-mano-heptosa) unidas al KDO, siendo ambos carbohidratos únicos de estas bacterias. No obstante, el núcleo externo tiene una composición más variable y está integrado por carbohidratos comunes. El antígeno O se mantiene unido al carbohidrato terminal del núcleo externo, sobresale de la pared bacteriana y es altamente inmunogénico. Aunque el antígeno O está compuesto por unidades repetidas de oligosacáridos comunes, pueden existir diversas variantes entre especies y entre cepas bacterianas en relación al tipo de carbohidratos que lo conforman.

Cuando los LPS se encuentran incorporados a la bacteria no son tóxicos, pero una vez que son liberados de la pared bacteriana en el torrente sanguíneo, se les considera como endotoxinas debido a la exacerbada respuesta inflamatoria que desencadenan.

Proteínas de unión a lipopolisacáridos

Con base en estudios filogenéticos, hace más de una década se caracterizó una familia de proteínas denominada PLUNC (clon protéico palatino pulmonar y del epitelio nasal) que incluye a proteínas asociadas a funciones inmunológicas, así como proteínas relacionadas con la unión y transporte de lípidos. En esta familia se encuentran las proteínas LBP (proteína de unión a lipopolisacáridos), BPI (proteína bactericida/incrementadora de permeabilidad), PLTP (proteína transferidora de fosfolípidos) y CETP (proteína transferidora de ésteres de colesterol). Tanto LBP como BPI juegan un papel importante en los mecanismos regulatorios directamente asociados con la unión a LPS [18]. Por otra parte, CETP y PLTP son dos proteínas clave en el transporte de lípidos entre lipoproteínas en el plasma [19,20].

Uno de los mecanismos de acción que se han propuesto para la función de proteínas que interaccionan con LPS, como BPI o LBP, es desplazando de la membrana bacteriana cationes bivalentes como el calcio y el magnesio [21]. Así mismo, estudios realizados con BPI sugieren que esta proteína en presencia de LPS en el torrente sanguíneo favorece su agregación, impidiendo que se lleve a cabo la cascada de señalización proinflamatoria dependiente de la vía de los TLR4 [22].

BPI es una proteína citoplasmática de 55 kDa constituyente de los gránulos primarios (azurófilos) de neutrófilos, con actividad antimicrobiana selectiva hacia bacterias Gram-negativas [23]. La selectividad de BPI es atribuida a su alta afinidad por los LPS, de manera que a través de la unión a bacterias blanco, la proteína BPI primordialmente puede favorecer tres efectos:

- Actividad bactericida a través de la disrupción secuencial de la membrana bacteriana externa e interna
- Actividad neutralizadora de endotoxinas, formando complejos con los LPS, y bloqueando la interacción con los receptores del huésped.
- Oponización de las bacterias, de manera que se mantiene incrementada la fagocitosis [23].

La expresión de BPI también se ha descrito en células epiteliales del tracto gastrointestinal, la cavidad oral y el tracto genitourinario [24]. BPI presenta una actividad contra un amplio rango de bacterias Gram-negativas en concentraciones nanomolares, reflejando una alta afinidad por el lípido A de los LPS y en consecuencia una potente actividad neutralizadora. De hecho, BPI ha sido blanco de una serie de estudios clínicos que se comentan en un siguiente apartado.

Enfoque farmacológico

Tomando en cuenta que la respuesta inflamatoria que se genera durante el choque séptico conduce al desarrollo de daños en los tejidos, y que la respuesta anti-inflamatoria provoca la reprogramación de leucocitos y cambios en el estatus inmunológico, el periodo de tiempo para la intervención en este padecimiento es corto, y el tratamiento debe controlar rápidamente la fuente de infección y restaurar la homeostasis hemodinámica. De manera que ha sido particularmente difícil encontrar moléculas que sean efectivas para el manejo del choque séptico. En este sentido, se ha abordado un concepto clave para el tratamiento de la sepsis grave y del choque séptico dependiente del tiempo, lo que sugiere una *hora de oro* y la perspectiva de un *día de plata* para el manejo de estos trastornos, en donde el tratamiento adecuado llevado a cabo en los servicios de urgencia, es clave en la supervivencia de los pacientes [7].

Los procedimientos rutinarios se enfocan en el control de la infección y mantener el estatus hemodinámico, así como en mecanismos para mantener el soporte en órganos que han sido dañados. También es importante el uso de fármacos no selectivos para combatir la inflamación, por ejemplo altas dosis de corticoesteroides [25] y fármacos antiinflamatorios no esteroideos [26]. Después del periodo crítico, se requiere de una rehabilitación apropiada y un seguimiento a largo plazo, periodo en el que la remoción de tejidos infectados y el tratamiento con antibióticos son claves para asegurar la supervivencia [27].

En las intervenciones generales que pueden prevenir el choque séptico se encuentran el uso de antibióticos profilácticos [28,29], acciones para mantener las concentraciones de glucosa en sangre [30], la descontaminación selectiva del tracto digestivo, el desarrollo de estrategias para la prevención de infecciones iatrogénicas, así como el empleo de terapias de inmunidad tales como vacunas, y la administración intravenosa de inmunoglobulinas [31,32].

Dentro de los tratamientos inmunológicos que se han estudiado, la experimentación con anticuerpos monoclonales (HA-1A, E5) cuyo blanco son los LPS no ha proporcionado resultados efectivos, debido a que presentan una baja actividad biológica [33-35]. Por el contrario, la proteína recombinante BPI mejoró significativamente el resultado funcional en

niños con septicemia por meningococo severa, 77% de 190 niños recuperaron su salud comparado con el 66% de 203 controles que recibieron tratamiento placebo, $p=0.019$. De igual forma, otros fármacos cuyo blanco son los LPS están siendo estudiados, tales como la proteína catiónica antimicrobial 18 (que es bactericida) [36] y análogos sintéticos del lípido A (E5564) [37]. Así mismo, se ha empleado un enfoque a través del uso de lipoproteínas humanas que ejercen efectos antiinflamatorios independiente de la unión a LPS [38] y anticuerpos monoclonales recombinantes contra CD14 (Tabla 1) [39]. No obstante, el desarrollo de vacunas contra los LPS ha fallado al enfrentarse este tipo de procedimiento a diversos problemas, incluyendo la identificación de la población blanco y los epítopes diana, así como la generación de anticuerpos en cantidades suficientes para la protección.

Tabla 1. Investigación farmacológica experimental enfocada en el tratamiento del choque séptico.

Blanco farmacológico	Moléculas	Fase de desarrollo
Lipopolisacáridos	Proteína catiónica antimicrobial 18 Análogos sintéticos del lípido A, E5564 Lipoproteínas recombinantes humanas Anticuerpos monoclonales contra CD14	Experimental Fase clínica II Experimental Fase clínica I
Mediadores proinflamatorios tardíos	Anticuerpo contra el grupo de la caja 1 de alta movilidad Caja A de unión a DNA, piruvato etil Factor inhibidor de la migración anti-macrófagos	Experimental Experimental Experimental
Sistema de cascada de complemento	Bloqueadores tanto de $C5_a$ como del receptor $C5_a$	Experimental
Apoptosis	Anti-caspasas Bloqueadores de Fas/Ligando Fas con proteínas de fusión al receptor Fas Metocloramida Sobreexpresión de células B linfoides/leucemia-2	Experimental Experimental Experimental Experimental
Pol-ADP-ribosa sintasa	Inhibidores de la Pol-ADP-ribosa sintasa	Experimental
NO (óxido nítrico) sintasa inducible	2-aminoprenoides, ONO-1714, antioxidantes polifenólicos flavonoides, aminoguanidina, L-N6-(1-iminoetil)-lisina	Experimental
Sistema nervioso autónomo	Estimulación del nervio vago	Experimental
Otras	Inhibidores de la reductasa del grupo CoA de alta movilidad Bloqueadores del receptor de endotelina Inhibidores de calpaina Agonistas de receptores de adenosina A_{2A}	Experimental Experimental Experimental Experimental

Tomado de referencia [6]

Por otra parte, se ha observado que fármacos de segunda generación contra el choque séptico pueden bloquear diversos factores de la cascada inflamatoria de forma inespecífica y masiva, por ejemplo el TNF α , la interleucina-1, el factor activador de plaquetas, moléculas de adhesión, metabolitos del ácido araquidónico, radicales libres de oxígeno, bradiquinina, la fosfodiesterasa, la esterasa C1, y la óxido nítrico sintasa. Sin embargo, estos enfoques farmacológicos no han sido completamente efectivos, aunque una intensa investigación se continúa realizando alrededor de ellos [6].

Considerando que BPI puede interaccionar con los LPS y neutralizar la actividad endotóxica, la proteína BPI recombinante (rBPI) se ha utilizado como un agente inmunoterapéutico en un amplio número de lesiones y estados patológicos, incluyendo las extremidades por isquemia-reperfusión, meningococemia grave, ligadura del conducto biliar, endotoxemia, y la resección hepática. Así mismo, la administración intravenosa de rBPI en ratas adultas ha demostrado ofrecer una protección significativa contra la disfunción sistólica y diastólica del miocardio que ocurre 24 h después de un evento de quemadura [40].

Con un enfoque terapéutico dirigido contra el TLR-4, en estudios clínicos empleando eritoran, una molécula inhibidora del TLR-4 altamente específica, se ha encontrado que su uso como tratamiento farmacológico no reduce la muerte por sepsis en pruebas clínicas en humanos [41].

Péptidos antimicrobianos: una posibilidad terapéutica

En los últimos 30 años, un número cada vez más amplio de proteínas y péptidos antimicrobianos (PAM) con actividad microbicida directa *in vitro* han sido aislados y caracterizados. Los PAM son proteínas endógenas que pueden presentar actividad antimicrobiana frente a una amplia variedad de microorganismos. La distribución de estas moléculas en los reinos vegetal y animal refleja una necesidad común de los organismos multicelulares de contar con este tipo de mecanismo de defensa contra infecciones microbianas [42]. Así mismo, varios PAM que se encuentran expresados en el humano

muestran un efecto muy potente sobre microorganismos patógenos, incluyendo bacterias resistentes a antibióticos.

Los PAM han recibido una creciente atención debido a la búsqueda de tratamientos antibióticos que sean efectivos contra un número importante de bacterias multirresistentes, y han sido aislados de diversas fuentes, como la piel de rana (magaininas), el veneno de las avispas (mastoparinas), el veneno de abejas (melitina), y de las polillas de la seda (cecropinas). Particularmente, estos péptidos cortos se pueden clasificar en varios grupos de acuerdo a su estructura secundaria, incluyendo 1) de tipo extendido y α -helicoidales, 2) cíclicos, y 3) péptidos que forman estructuras en hoja- β . Todos comparten las características comunes de ser catiónicos y tener momentos hidrofóbicos altos. Estos péptidos están compuestos de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos que facilitan su distribución entre la fase acuosa y lipídica, de manera que cuando se lleva a cabo la interacción con membranas de lípidos les permite adoptar una conformación anfipática común [43]. Considerando que esta distribución está favorecida hacia las membranas de lípidos con carga negativa, se sugiere que las interacciones electrostáticas son el componente clave en la selectividad de los PAM por las membranas de células bacterianas [44].

En las membranas de células eucariotas, los fosfolípidos con carga negativa están principalmente localizados en la capa interna de la membrana de lípidos, mientras que la capa externa se compone principalmente de lípidos zwitteriónicos y lípidos neutros, de forma que la carga neta es neutra. En contraste, en las membranas celulares bacterianas, además de los LPS, una gran proporción de fosfolípidos ácidos, tales como fosfatidilglicerol y cardiolipina presentes en ambas membranas, proporcionan una carga negativa a la superficie [45].

Para ayudar a contrarrestar el problema de la resistencia que han desarrollado las bacterias contra fármacos antimicrobianos, se ha considerado el uso de los PAM catiónicos como una alternativa a los antibióticos. Por lo general, el mecanismo de acción de estas moléculas implica la interrupción de la integridad de la membrana bacteriana, sin embargo también se han caracterizado otros mecanismos antimicrobianos dirigidos contra procesos celulares

clave, incluyendo la síntesis de ADN y de proteínas, el plegamiento de proteínas, la actividad enzimática y la síntesis de la pared celular [46].

Ubicuos en la naturaleza, los PAM constituyen un componente clave del sistema inmune innato de diversos organismos, que no sólo generan un amplio espectro de actividad contra bacterias y hongos patógenos, sino que incluso, la actividad tóxica se extiende a virus, parásitos y algunas veces a células cancerosas [46]. Muchos péptidos actúan sobre las membranas bacterianas u otros blancos, en contraste, la mayoría de los antibióticos normalmente se dirigen contra proteínas específicas. Estas propiedades pueden representar una ventaja característica de los PAM que favorezca el combate contra especies microbianas que se han vuelto resistentes por mutaciones génicas. En este sentido, la búsqueda de nuevas moléculas de carácter proteico implica la identificación de los péptidos activos presentes en la naturaleza, seguidos por el diseño de péptidos sintéticos análogos para estudios de estructura-función y su posterior abordaje utilizando experimentación en modelos *in vivo*.

Particularmente, la actividad antimicrobiana presente en el tejido hemático del humano está relacionada con la movilización de proteínas y péptidos citotóxicos a los sitios de infección. Estos agentes celulares se transportan en los gránulos citosólicos de leucocitos y plaquetas, mientras que los agentes extracelulares son producto de la degranulación celular o de la secreción desde el hígado de proteínas de fase aguda. Además de la actividad microbicida directa, muchos de los agentes plasmáticos también son capaces de neutralizar los efectos proinflamatorios ocasionados por los componentes de la superficie microbiana. Adicionalmente, varios de estos agentes presentan actividades relacionadas con la modulación de la respuesta inmune y mecanismos de reparación tisular [42]

Proteína CETP y la isoforma CETPI

CETP es una proteína plasmática que es secretada principalmente por el hígado que cataliza la transferencia de ésteres de colesterol y triglicéridos entre lipoproteínas. Estudios de deleción y mutagénesis sitio específica han mostrado que el dominio C-terminal (E₄₆₅-S₄₇₆)

estructurado como una hélice- α anfipática, corresponde a una región clave para la función de transferencia de lípidos [47,48]. En este sentido, resultados experimentales de nuestro laboratorio sugieren que el mecanismo de transferencia puede estar directamente relacionada con la formación de un sistema micelar de lípidos, en donde la conservación de la estructura hélice- α en el C-terminal es crítica para llevar a cabo este proceso de transferencia de lípidos [49].

Sin embargo, en nuestro laboratorio se ha descubierto una nueva isoforma de CETP sintetizada exclusivamente en el intestino delgado, a la que se denominó CETPI. Esta isoforma se diferencia de CETP en que no contiene el exón 16, y 54 bases contenidas en el intrón 15 forman parte del nuevo mRNA característico de CETPI, que en consecuencia sustituye los 24 aminoácidos del carboxilo terminal presentes en CETP por una secuencia de 18 aminoácidos con un alto contenido en prolinas y residuos con carga positiva, los cuales son críticos para la nueva función de CETPI [50].

Como se ha comentado, CETP pertenece a la familia de proteínas PLUNC, entre las que se encuentra la proteína BPI. Particularmente, CETP y BPI comparten los más importantes elementos estructurales, incluyendo el plegamiento global en forma de boomerang, así como la simetría y arquitectura de los dominios amino y carboxilo [51], a pesar de que tienen una homología muy baja en las secuencias de aminoácidos (16%). En la superficie cóncava tanto BPI como la nueva isoforma CETPI no tienen el dominio clave hélice- α situado en el carboxilo terminal, y en su lugar ambas proteínas presentan un alto contenido de aminoácidos con carga positiva, característica que es importante para la función asociada con la unión a LPS.

Cuando la proteína CETPI fue descubierta en nuestro laboratorio, se encontró que su expresión se restringe al intestino delgado y se encontró en cantidades importantes en plasma. De esta forma, en modelos celulares de intestino delgado, se ha estudiado la sobreexpresión de CETPI generada por el tratamiento con LPS desde concentraciones muy bajas, característica que puede estar relacionada con una función de unión a LPS [52].

A pesar de que naturalmente los organismos presentan mecanismos finamente diseñados para la síntesis de anticuerpos que son en general efectivos para contrarrestar infecciones

por bacterias Gram-negativas, estos no tienen la capacidad de neutralizar los efectos patofisiológicos asociados a los LPS. Hemos demostrado que a través de la unión de CETPI a LPS se lleva a cabo su bloqueo y en consecuencia, se evita la presencia de citotoxicidad. Específicamente por medio de la disección estructural de la función de péptidos derivados del C-terminal, los resultados experimentales demuestran que un péptido derivado del carboxilo Terminal de CTPI de 18 residuos, es una molécula inocua que presenta la capacidad de unión a LPS y genera condiciones de protección de los efectos citotóxicos causados por los LPS (Figura 3) [53].

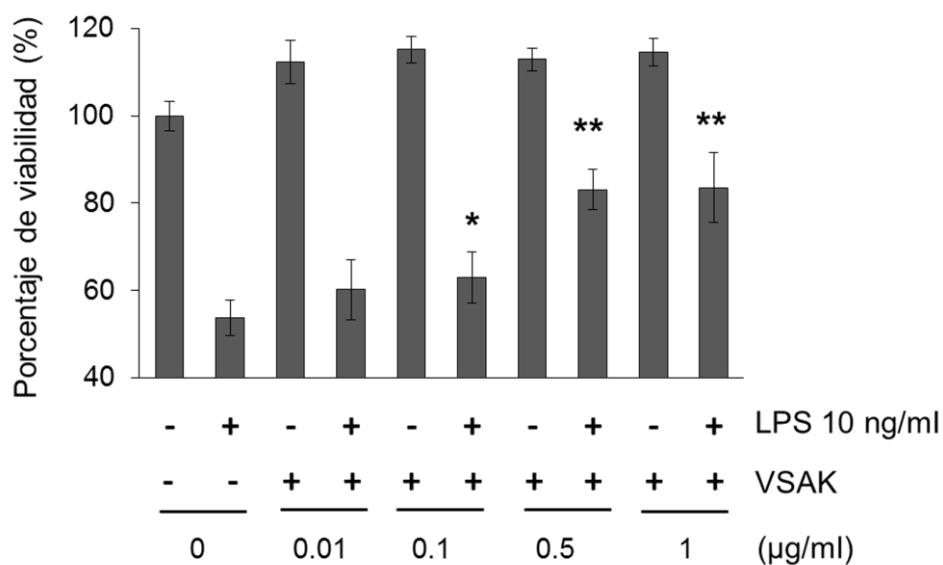


Figura 3. El tratamiento con un péptido derivado del carboxilo terminal de CETPI previene del desarrollo de citotoxicidad en macrófagos (RAW). Gráfico de viabilidad celular en células bajo un tratamiento previo de 45 min con dosis crecientes del péptido de 18 aminoácidos, previo al estímulo por 24 h con 10 ng/ml de LPS. Gráfica representativa de 6 repeticiones (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.001$

Actualmente nos encontramos realizando estudios utilizando un panel amplio de péptidos de diversas longitudes derivados del segmento carboxilo-terminal de CETPI como

moléculas inactivadoras de los efectos negativos producidos por los LPS, extendiendo nuestro estudio a la realización de pruebas experimentales de funcionalidad en el mamífero. Tomando como base la secuencia del segmento carboxilo-terminal de CETPI, actualmente nos encontramos estudiando las condiciones óptimas de protección de estas moléculas sobre la acción de los LPS y de esta manera evitar las cascadas de señalización deletéreas que se desencadenan por la unión de los LPS a sus receptores blanco tanto en las células del torrente sanguíneo como en las células presentes en la pared vascular [52,53].

Referencias

- [1] de la Cruz M y Badiano J. *Libellus de medicinalibus indorum herbis*, Códice de la Cruz-Badiano, *Códice Badiano* o *Códice Barberini* (1552).
- [2] de la Cruz M. *Libellus de medicinalibus indorum herbis*. Versión española con comentarios de diversos autores. Instituto Mexicano del Seguro Social (1964).
- [3] Villagómez-Ortiz A, Medellín R, Trujillo N, Méndez R, Guzmán R, Rosas V, García S (2013). Uso de proteína C activada en el tratamiento de sepsis grave o choque séptico. *Rev Asoc Mex Med Crit y Ter Int* 27:153-171.
- [4] American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis (1992). *Crit Care Med* 20: 864–874.
- [5] Rathinam VA, Fitzgerald KA (2013). Immunology: Lipopolysaccharide sensing on the inside. *Nature* 501:173-175.
- [6] Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM (2005). Septic shock. *Lancet* 365:63-78.
- [7] Nguyen HB *et al*; Emergency Department Sepsis Education Program and Strategies to Improve Survival (ED-SEPSIS) Working Group (2006). Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Ann Emerg Med* 48:28-54.
- [8] Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J (2003). Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 16:379-414.

- [9] Ohto U, Fukase K, Miyake K, Shimizu T (2012). Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc Natl Acad Sci* 109:7421-7426.
- [10] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 29:1303-1310.
- [11] Watts C (2008). Location, location, location: identifying the neighborhoods of LPS signaling. *Nat Immunol* 9:343-345.
- [12] Meng J, Gong M, Björkbacka H, Golenbock DT (2011). Genome-wide expression profiling and mutagenesis studies reveal that lipopolysaccharide responsiveness appears to be absolutely dependent on TLR4 and MD-2 expression and is dependent upon intermolecular ionic interactions. *J Immunol* 187:3683-3693.
- [13] Ohto U, Fukase K, Miyake K, Shimizu T (2012). Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc Natl Acad Sci* 109:7421-7426.
- [14] Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA (2013). Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science* 341:1250-1253.
- [15] Kayagaki N *et al.* (2013). Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* 341:1246-1269.
- [16] Dickinson RJ, Keyse SM (2006). Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J Cell Sci.* 119:4607-4615.
- [17] Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458:1191-1195
- [18] Beamer LJ, Carroll SF, Eisenberg D (1998). The BPI/LBP family of proteins: a structural analysis of conserved regions. *Protein Sci* 7:906-914.
- [19] Chiang SC, Veldhuizen EJ, Barnes FA, Craven CJ, Haagsman HP, Bingle CD (2011). Identification and characterisation of the BPI/LBP/PLUNC-like gene repertoire in chickens reveals the absence of a LBP gene. *Dev Comp Immunol* 35:285-295.
- [20] Bingle CD, Craven CJ (2002). PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Hum Mol Genet* 11:937-943.
- [21] Levy O (2000). A neutrophil-derived anti-infective molecule: bactericidal/permeability-increasing protein. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2925-2931.
- [22] Balakrishnan A, Marathe SA, Joglekar M, Chakravorty D (2013). Bactericidal/permeability increasing protein: a multifaceted protein with functions beyond LPS neutralization. *Innate Immunol* 19:339-347.

- [23] Levy O, Elsbach P (2001). Bactericidal/Permeability-increasing Protein in Host Defense and Its Efficacy in the Treatment of Bacterial Sepsis. *Curr Infect Dis Rep* 3:407-412.
- [24] Canny G, Levy O, Furuta GT, Narravula-Alipati S, Sisson RB, Serhan CN, Colgan SP (2002). Lipid mediator-induced expression of bactericidal/ permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci* 99:3902-3907.
- [25] Annane D, Bellissant E, Bollaert P, Briegel J, Keh D, Kupfer Y (2004). Corticosteroids for severe sepsis and septic shock: a systematic review and meta-analysis. *BMJ* 329: 480.
- [26] Bernard GR *et al* (1997). The Ibuprofen in Sepsis Study Group. The Effects of Ibuprofen on the Physiology and Survival of Patients with Sepsis. *N Engl J Med* 336:912–918.
- [27] Rivers E *et al* (2001). Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 345:1368–1377.
- [28] Bernard B, Grange JD, Khac EN, Amiot X, Opolon P, Poinard T (1999). Antibiotic prophylaxis for the prevention of bacterial infections in cirrhotic patients with gastrointestinal bleeding: a meta-analysis. *Hepatology* 29:1655–1661.
- [29] Sharma VK, Howden CW (2001). Prophylactic antibiotic administration reduces sepsis and mortality in acute necrotizing pancreatitis: a meta-analysis. *Pancreas* 22:28–31.
- [30] van den Berghe G *et al* (2001). Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med* 345:1359–1367.
- [31] Cafiero F, Gipponi M, Bonalumi U, Piccardo A, Sguotti C, Corbetta G (1992). Prophylaxis of infection with intravenous immunoglobulins plus antibiotic for patients at risk for sepsis undergoing surgery for colorectal cancer: results of a randomized, multicenter clinical trial. *Surgery* 112:24–31.
- [32] Douzinas EE *et al* (2000). Prevention of infection in multiple trauma patients by high-dose intravenous immunoglobulins. *Crit Care Med* 28:254–255.
- [33] Ziegler EJ *et al* (1991). Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. *N Engl J Med* 324: 429–436.
- [34] Greenberg RN, Wilson KM, Kunz AY, Wedel NI, Gorelick KJ (1991). Randomized, double-blind phase II study of anti-endotoxin antibody (E5) as adjuvant therapy in humans with serious gramnegative infections. *Prog Clin Biol Res* 367: 179–186.
- [35] Warren HS *et al* (1993). Assessment of ability of murine and human anti-lipid A monoclonal antibodies to bind and neutralize lipopolysaccharide. *J Exp Med* 177: 89–97.

- [36] Warren HS *et al* (2003). Protective efficacy of CAP18106-138-immunoglobulin G in sepsis. *J Infect Dis* 188:1382–1393.
- [37] Lynn M *et al* (2003). Blocking of responses to endotoxin by E5564 in healthy volunteers with experimental endotoxemia. *J Infect Dis* 187:631–639.
- [38] Wu A, Hinds CJ, Thiemermann C (2004). High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock* 21:210–221.
- [39] Reinhart K *et al* (2004). CD14 receptor occupancy in severe sepsis: results of a phase I clinical trial with a recombinant chimeric CD14 monoclonal antibody IC14. *Crit Care Med* 32: 1100–1109.
- [40] Horton JW, Maass DL, White DJ, Minei JP (2007). Bactericidal/permeability increasing protein attenuates the myocardial inflammation/dysfunction that occurs with burn complicated by subsequent infection. *J Appl Physiol* 103:948-958.
- [41] Opal SM *et al*; ACCESS Study Group (2013). Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA* 309:1154-1162
- [42] Levy O (2000). Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. *Blood* 96:2664-2672.
- [43] Henriksen JR, Andresen TL (2011). Thermodynamic profiling of peptide membrane interactions by isothermal titration calorimetry: a search for pores and micelles. *Biophys J* 101:100-109.
- [44] Oren Z, Shai Y (1998). Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47:451-463.
- [45] Matsuzaki K (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* 1462:1-10.
- [46] Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol* 29:464-472.
- [47] Wang S, Wang X, Deng L, Rassart E, Milne RW, Tall AR (1993). Point mutagenesis of carboxyl-terminal amino acids of cholesteryl ester transfer protein. Opposite faces of an amphipathic helix important for cholesteryl ester transfer or for binding neutralizing antibody. *J Biol Chem* 268:1955-1959.
- [48] Wang S, Kussie P, Deng L, Tall A (1995). Defective binding of neutral lipids by a carboxyl-terminal deletion mutant of cholesteryl ester transfer protein. Evidence for a carboxyl-terminal cholesteryl ester binding site essential for neutral lipid transfer activity. *J Biol Chem* 270:612-618.

- [49] García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mendoza-Espinosa P, Brocos P, Piñeiro A, Montalvan-Sorrosa D, Castillo R, Mas-Oliva J (2013). Key Structural Arrangements at the C-terminus Domain of CETP Promote a Mechanism for Lipid-transfer Activity. Enviado a revisión.
- [50] Alonso AL, Zentella-Dehesa A, Mas-Oliva J (2003). Characterization of a naturally occurring new version of the cholesterol ester transfer protein (CETP) from small intestine. *Mol Cell Biochem* 245:173-182.
- [51] Qiu X *et al* (2007). Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Nat Struct Mol Biol* 14:106-113.
- [52] García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mas-Oliva J (2013). Lipopolisaccharide-binding function at the C-terminus domain of CETPI. Manuscrito en preparación.
- [53] García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mas-Oliva J (2013). Sistema para la cuantificación de la isoforma I de la proteína transferidora de ésteres de colesterol y uso de péptidos derivados de su dominio C-terminal como moléculas bloqueadoras del efecto citotóxico inducido por lipopolisacáridos. Solicitud de patente en preparación.

10.2 Artículo publicado: “Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity.”

Journal of Structural Biology 186 (2014) 19–27



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Structural Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjsbi



Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity



Victor García-González^a, Nadia Gutiérrez-Quintanar^a, Paola Mendoza-Espinosa^a, Pilar Brocos^b, Ángel Piñeiro^b, Jaime Mas-Oliva^{a,c,*}

^aInstituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., México

^bDepartamento de Física Aplicada, Facultad de Física, Universidad de Santiago de Compostela, Spain

^cDivisión de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 December 2013

Received in revised form 4 February 2014

Accepted 10 February 2014

Available online 14 February 2014

Keywords:

CETP

C-terminus domain

Lipid ordering

Secondary structure transitions

Lipid micelles

ABSTRACT

The cholesteryl-ester transfer protein (CETP) promotes cholesteryl-ester and triglyceride transfer between lipoproteins. We evaluated the secondary structure stability of a series of small peptides derived from the C-terminus of CETP in a wide range of pH's and lipid mixtures, and studied their capability to carry out disorder-to-order secondary structure transitions dependent of lipids. We report that while a mixture of phosphatidylcholine/cholesteryl-esters forms large aggregated particles, the inclusion of a series of CETP carboxy-terminal peptides in a stable α -helix conformation, allows the formation of small homogeneous micelle-like structures. This phenomenon of lipid ordering was directly connected to secondary structural transitions at the C-terminus domain when lysophosphatidic acid and lysophosphatidylcholine lipids were employed. Circular dichroism, cosedimentation experiments, electron microscopy, as well as molecular dynamics simulations confirm this phenomenon. When purified CETP is studied, the same type of phenomenon occurs by promoting the reorganization of lipid from large to smaller particles. Our findings extend the emerging view for a novel mechanism of lipid transfer carried out by CETP, assigning its C-terminus domain the property to accomplish lipid ordering through secondary structure disorder-to-order transitions.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).



JLSB-VIER



Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity



Victor García-González^a, Nadia Gutiérrez-Quintanar^a, Paula Mendoza-Espinoza^a, Pilar Brucos^b, Ángel Piñeiro^b, Jaime Mas-Oliva^{a,c,*}

^a Instituto de Estudios Científicos, Universidad Veracruzana de México, Carretera México-Tehuacan, 20100, Veracruz, México

^b Departamento de Física Aplicada, Facultad de Física, Universidad Carlos III de Madrid, Madrid, Spain

^c División de Investigación Científica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México

A R T I C L E I N F O

A B S T R A C T

Article history:

Received 23 December 2013

Received in revised form 4 February 2014

Accepted 10 February 2014

Available online 24 February 2014

Keywords:

CETP

C-terminus domain

Lipid ordering

Secondary structure transitions

Lipid mixtures

The cholesteryl-ester transfer protein (CETP) promotes cholesteryl-ester and triglyceride transfer between lipoproteins. We evaluated the secondary structure stability of a series of small peptides derived from the C-terminus of CETP in a wide range of pH's and lipid mixtures, and studied their capability to carry out disorder to order secondary structure transitions dependent of lipids. We report that while a mixture of phosphatidylcholine/cholesteryl esters forms large aggregated particles, the inclusion of a series of CETP carboxy terminal peptides in a stable α helix conformation, allows the formation of small heterogeneous micelle-like structures. This phenomenon of lipid ordering was directly connected to secondary structural transitions at the C-terminus domain when 1,3-bisphosphatidic acid and 1,3-bisphosphatidylcholine lipids were employed. Circular dichroism, cross-linking experiments, electron microscopy, as well as molecular dynamics simulations confirm this phenomenon. When punch of CETP is studied, the same type of phenomenon occurs by promoting the reorganization of lipid from large to smaller particles. Our findings extend the emerging view for a novel mechanism of lipid transfer control and by CETP, assigning its C-terminus domain the property to accomplish lipid ordering through secondary structure disorder-to-order transitions.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

1. Introduction

Several studies focused on the thermodynamic and kinetic analysis of lipid transfer between unilamellar phospholipid vesicles, show that this process is carried out through diffusion of monomers across a water interface. Here, velocity of exchange has been suggested to occur in function of a kinetic model of micellization that allows a semi-quantitative prediction of the relative velocity of transfer (Andersson et al., 1976). When the change in free energy values during lipid desorption from a phospholipid monolayer towards the water interface reach the highest point, the critical transition state corresponds to the last carbon atom to desorb from the monolayer, usually related to a high-energy consumption (Nichols, 1985). Therefore, the kinetic and thermodynamic parameters associated to this phenomenon allow the estimation of transfer efficiency for different lipid molecules (Fig. 1). For instance, cholesterol presents a significant energy barrier opposed to its

desorption from a monolayer with a half-life of transfer not between two vesicles in the order of two hours, where ΔG_c corresponds to 55 kJ/mol. When the polarity of cholesterol is changed with the addition of a fatty acid, cholesteryl-oleate for example, transfer exceeds the scale of time for most biological processes since the operation would take 10^7 h to occur with a ΔG_c close to 94 kJ/mol. In contrast, the simple addition of a hydroxyl group promotes desorption relatively quickly, as it occurs in the case of 25-hydroxycholesterol, within a transfer time of around 2 min and a ΔG_c of 44 kJ/mol (McLean and Phillips, 1984). From this type of analysis, we can conclude that transfer of neutral lipids through an aqueous phase is a costly biophysical event. Therefore, nature has developed a series of lipid transfer proteins such as CETP with unique structural properties designed to efficiently lower the energy barrier for transfer of cholesteryl-esters through an aqueous environment, not only between lipoproteins but also between the plasma membrane of cells and lipoproteins. Nevertheless, the critical physicochemical characteristics of the process associated to the key structural features of this protein that would explain the extremely efficient lipid transfer process, are still lacking. The

* Corresponding author at: Instituto de Estudios Científicos, Universidad Veracruzana, Avda. México 04510 México, D.F., México. Fax: +52 5596239611.

E-mail address: jmas@icet.v.mx (J. Mas-Oliva).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2014.02.002>

0972-4875/\$ – see front matter. Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

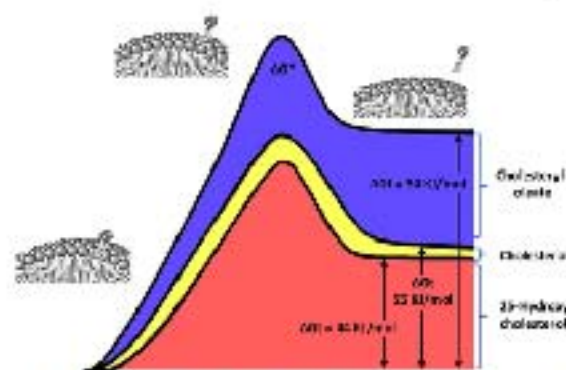


Fig. 1. Free energy diagram for lipid exchange through an aqueous phase. The transfer of lipid molecules from unilamellar phospholipid vesicles to an aqueous phase proceeds through a transition-state complex where an amphipathic lipid molecule is attached to the vesicle through its hydrophobic chain end. The formation of this activated-state complex is associated with a high energy of activation (ΔG^\ddagger), which exceeds the energy of transfer (ΔG°) by an amount which is determined, in part, by the constraints of the lipid molecule with respect to the surface of the vesicle (modified from McLean and Phillips, 1984).

present study proposes a new perspective for this process, taking into account that lipid transfer carried out by CETP associated to a minimum energy change would maintain the thermodynamic equilibrium of the process.

Recently, the crystallographic structure of CETP at 2.2 Å resolution has revealed a 60 Å long tunnel filled with two cholesterol-ester molecules (Qiu et al., 2007). Site specific mutagenesis has shown that a rather flexible carboxy-terminal region of CETP structured as an amphipathic α -helix, corresponds to a key region associated with the transfer process (Wang et al., 1995, 1993). Interestingly, since the boomerang-type concave surface of CETP corresponds to the radius curvature of high density lipoproteins (HDL), the position for the carboxy-terminal α -helix allows its optimal interaction with the surface of this type of lipoproteins through what we consider a corkeraw mechanism (Xicohtencatl-Cortes et al., 2004a,b). Most probably, the adopted orientation of this helical region is carried out parallel to the surface of HDL particles at the hydrophilic/hydrophobic interface of phospholipids as proposed by us for similar amphipathic helices contained in several human apolipoproteins (Dolaios-Carrizosa et al., 1997; Xicohtencatl-Cortes et al., 2004a,b). Since neutral lipids have been suggested to be contained in CETP and the basic principles that allow neutral lipids to reach the core-tunnel have not been solved yet, based on our results we propose a lipid ordering mechanism that allows the formation of micelle-like structures supported by secondary structural transitions at the amphipathic carboxy-terminal region of CETP. This mechanism would allow the movement of lipid through an aqueous interface within accessible thermodynamic parameters.

2. Material and methods

1- α -Phosphatidylcholine (PC), 1-lauroyl-2-hydroxy-sn-glycerol-3-phosphocholine (lys-C₁₂PC), 1-hexanoyl-2-hydroxy-sn-glycerol-3-phosphocholine (lys-C₆PC) and 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycerol-3-phosphate (LPA) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Cholesterol and cholesterol-esters were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Salts and buffers were purchased from J.T. Baker (Center Valley, PA).

2.1. Peptide synthesis

Peptides with a purity degree greater than 98% were synthesized by GenScript (Piscataway, NJ) and their identity and purity confirmed by mass spectrometry and HPLC analysis. Lyophilized peptides were dissolved in ammonium carbonate buffer (pH 9.5) to a concentration of 1.0 mg/mL. From this solution a further 1:5 dilution was carried out. To evaluate their secondary structure at pH 3.8 and 4.8, a sodium acetate buffer was used; for pH 6.3 and 7.2, a sodium phosphate buffer was used; and for pH's between 8.6 and 9.5, an ammonium carbonate buffer was employed. In all cases, ultrapure MilliQ water was always used together with a filtration step through 0.22 μ m membrane filters. Peptide concentration was determined by measuring the peptide bond absorbance at 205 nm.

Peptide samples at a concentration of 200 μ g/ml were incubated with the different lipid preparations for 12 h at 25 °C before their structural characterization employing circular dichroism, dynamic light scattering and electron microscopy. In the same manner, purified CETP was incubated with the different lipid preparations tested.

Several secondary structure predictors and servers were employed: the PSIPRED protein structure prediction server; Agadir an algorithm to predict the helical content of peptides; SOPMA (self-optimized prediction method with alignment); Protran DNA-Star program and Rosetta Design. Helical wheel representations were obtained using the Protran DNASTar program (Lasergene).

2.2. Circular dichroism (CD) spectroscopy

CD spectra were registered with an AVIVE2DS spectropolarimeter (AVIV Instruments) at 25 °C employing far UV wavelengths (190–260 nm). Experiments were performed at a peptide concentration of 200 μ g/ml in a 1 quartz path length cuvette running AVIV software. Spectra were recorded with a 1 nm bandwidth using 0.5 nm increments and 2.5 s accumulation time averaged over 3 scans. CD results are reported as mean molar ellipticity (Θ , deg cm² dmol⁻¹) considering the baseline correction.

2.3. Preparation of lipid mixtures

In order to obtain the desired concentrations of PC and cholesterol-esters in the different mixtures prepared, lipids were mixed in chloroform and dried for 6 h under a gentle stream of N₂, and an additional period of 24 h in vacuum on a SpeedVac concentrator (Savant). Lipid mixtures were prepared with a molar ratio of PC 2 mM and cholesterol-ester 100 μ M. After drying, the lipids were resuspended in a phosphate buffer (NaH₂PO₄ 33.3 mM, Na₂HPO₄ 16.6 mM) at pH 6.8, and subsequently sonicated 15 s on/30 s off pulses for 4 cycles of 10 min in an ice bath under a flow of N₂ using a Sonifier 250 ultrasonicator (Branson). Samples were left to equilibrate for 2 h at 25 °C and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min before being used.

2.4. Preparation of (lys-C₁₂)PC micelles

The required amounts of (lys-C₁₂)PC dissolved in chloroform were placed under a gentle stream of N₂ for 6 h, and an additional period of 22 h in vacuum. Samples were resuspended in a phosphate buffer (NaH₂PO₄ 33.3 mM, Na₂HPO₄ 16.6 mM) at pH 6.8 and 37 °C at a final concentration of 2.5 mM concentration. After this procedure, samples were kept 2 h at 25 °C, subsequently centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 12 °C and left to equilibrate for 2 h before being used.

2.5. Preparation of lysophosphatidic acid (LPA) micelles

The required amounts of LPA dissolved in chloroform were placed under a gentle flow of N_2 for 6 h, and an additional period of 12 h in vacuum. Samples were hydrated in a phosphate buffer (NaH_2PO_4 33.3 mM, Na_2HPO_4 16.6 mM) at a final concentration of 12.5 mM and further processed through 4 cycles of freezing in liquid N_2 and thawing at 37 °C. Solutions were kept 2 h at 25 °C and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm.

2.6. Purification of CETP from human plasma

CETP was purified using a combination of ultra-centrifugation and several sequential chromatography steps (Ruiz-Nariego et al., 1994). Briefly, lipoprotein free plasma was isolated from freshly drawn human plasma by ultracentrifugation using a TLA 100.4 rotor. The lipoprotein clear fraction was loaded to a phenyl-Sepharose column pre-equilibrated with 4 M NaCl/10 mM Tris/2 mM EDTA pH 7.4. Proteins were eluted in two steps with 150 mM NaCl/10 mM Tris/2 mM EDTA and ultrapure MilliQ water. Fraction eluted with water was applied to an anion exchange column (Q-Sepharose Fast Flow resin) and eluted with a 0–1.0 M NaCl gradient. Finally, the fraction obtained between 720 and 850 mM NaCl was applied to a concanavalin A-Sepharose column where specific CETP elution was achieved using α -methyl- α -mannoside (150 mM).

2.7. Dynamic light scattering (DLS)

DLS sample analysis was performed employing a Malvern Zetasizer Nano System at 25 °C immediately after CD measurements took place. The intensity of dispersed light was measured at an angle of 17°.

2.8. Molecular dynamics simulations

Coarse-Grained (CG) simulations were performed with periodic boundary conditions using GROMACS MD engine version 3.3.3 (Van Der Spoel et al., 2005), and carried out in the NPT ensemble. Water and surfactant molecules were separately coupled to a Berendsen thermostat at 300 K with a common period of 1 ps. The pressure was isotropically controlled at 1 bar using a Berendsen barostat (Berendsen et al., 1984) with an isothermal compressibility of $5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. The initial coordinates for CETP helix- X^{12} were obtained from available X-ray diffraction data (PDB: 2ahd) (Qiu et al., 2007). The MARTINI force field (version 2.0) was employed to model all CG molecules (Marrink et al., 2007). As previously proposed by us for coarse grain structures, lipids were parameterized using four beads for the PC head and the first 2–3 CH₂ groups of the surfactant, and one up to three additional hydrophobic beads for the rest of the surfactant tail (Brocos et al., 2012). Random mixtures consisting of 234 CG lipid molecules, 23,415 Martini waters (equivalent to 93,660 atomistic water molecules), 1 CETP helix X^{12} , and 2Na⁺ ions were introduced in rhombic dodecahedron boxes (edge length 15 nm). Each system was energy minimized using the steepest descent method and then three independent 5 μ s long trajectories per each system performed starting from different initial random velocities. A 1.2 nm cut off was employed for non-bonded interactions. The L-J potential was smoothly shifted to zero between 0.9 and 1.2 nm. A similar approach was employed for electrostatic interactions, considering a Coulombic potential with a relative permittivity of 15 together with a shift function from 0 to 1.2 nm. The neighbor list was updated every 10 steps. The trajectory analysis was performed using tools of the GROMACS package, RasMol 2.7 and PyMol 0.99. More details can be found in a recent study from our group where CG

simulations of micelles were performed using identical methods (Brocos et al., 2012).

2.9. Transmission electron microscopy

Peptides and CETP samples incubated with the different lipid mixtures tested were processed using a negative staining technique and visualized using transmission electron microscopy (NS-TEM). Samples (10 μ l) were placed on carbon-coated copper grids (400 mesh) for 10 min at 25 °C before observations were made. Since in our experience contrast of negative stained samples can be improved by using copper-grids with slightly thicker carbon coatings, according to the color reference chart provided by the company Dinkler International, we exposed copper grids to be used for the visualization of the lipid/CETP structures, to carbon vapor for longer periods of time until approximately a thickness of 100 nm was reached. Excess liquid was removed with Whatman paper and grids negatively stained for 5 min with uranyl acetate solution (2% w/v). Samples were dried for 20 min and NS-TEM images were acquired using a JEM-1200EX11 JEM microscope at 20 kV with a 60,000 \times magnification.

2.10. Lipid/peptide cosedimentation assays and peptide bond spectroscopy

With the objective to evaluate binding of CETP derived peptides to lipid aggregates, cosedimentation experiments were performed using ultracentrifugation with an Optima TLX ultracentrifuge and a TLA-100.2 rotor (Palmer et al., 2009). Samples consisting of peptide, lipid, or peptide/lipid mixtures were centrifuged at 200,000g for 12 h to discard possible liposomal structures. When lysa-C₁₂PC and LPA were used, a further centrifugation step was carried out at 300,000g for 36 h, and 64 h respectively. In all cases 13 °C was maintained throughout the experiments. Supernatants were recovered and the remaining pellets resuspended in a phosphate buffer pH 7.2. Afterwards, absorbance of the supernatants and the remaining resuspended pellets was measured following the absorbance of peptide bonds at 205 and 218 nm.

2.11. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis

Pellets obtained from the peptide/lipid cosedimentation assays were analyzed on non-denaturing gradient polyacrylamide gel electrophoresis. Samples were processed using 3–35%, 3–38% and 3–40% polyacrylamide gradients gels using a Tris-borate buffer during 16 h at 80 V. Gradient gels were stained with Coomassie blue G-250 (Tolado-Isbelles et al., 2010).

3. Results

The tridimensional view of the C-terminus region of CETP (aa 453–476) composed of a β -sheet (aa 453–462) and the native amphipathic α -helix (aa 465–476) named helix- X^{12} are shown in Fig. 2. When glutamic acid 465 is substituted by a cysteine residue, as it will be shown below, particular secondary structure characteristics are developed with this new model peptide known as helix- X^{12} (Fig. 2A). Peptide helix- X^{12} when placed in solution and incubated at different pH's, maintains most of its α -helical structure within a wide range of pH values (6.3–9.5) when studied by circular dichroism (CD) (Fig. 2B). This situation does not occur when native peptide helix- X^{12} is tested, since CD experiments show that secondary structure is lost and the peptide keeps a random conformation independently of pH values (Fig. 2C). The particular characteristics shown by peptide helix- X^{12} constitute a key feature in the development of several patents carried out by

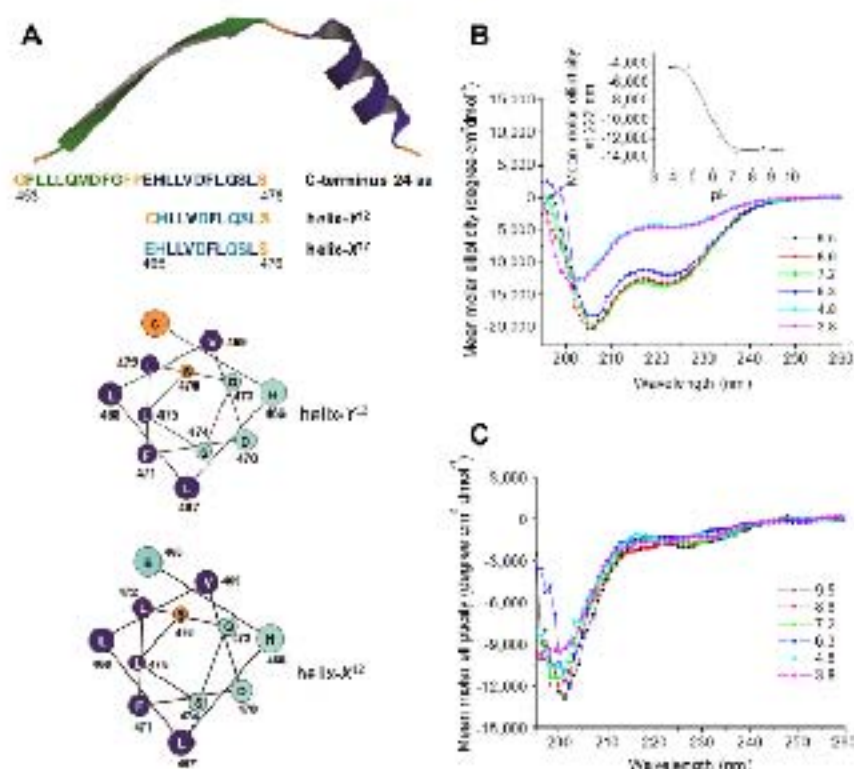


Fig. 2. Structural characterization of peptides derived from the C-terminus of CTFP. (A) Primary and secondary structures of the C-terminus region of CTFP, showing helical wheel representations for peptide helix-X¹² and for peptide helix-Y¹⁴ (PDB: 2ob6). (B) employing CD, pH effect upon secondary structure of peptide helix-Y¹⁴ in the presence of phosphatidylcholine and cholesterol-esters. Inset shows the change in mean molar ellipticity measured at 202 nm; (C) pH effect upon secondary structure of peptide helix-Y¹⁴ in the presence of same lipid.

our group (Mas Oliva et al., 2012; Mas-Oliva and Alonso, 2010, 2007a; Mas Oliva and Alonso, 2007b).

On the other hand, under the same pH range, when a mixture of phosphatidylcholine and cholesterol-esters are studied by dynamic light scattering (DLS), average aggregates of 30 nm are formed within a range that goes from 20 to 80 nm. This samples when studied by negative staining transmission electron microscopy (NS-TEM) confirmed the size of mostly large aggregates (Fig. 3A and B). It is interesting to observe that when peptide helix-Y¹⁴ is incubated together with the same lipid mixture at pH values close to 7.0, the formation of small homogeneous micelles with an average size of 6 nm is induced (Fig. 3C and D). As previously shown with CD experimentation, extreme pH values interfere with the formation of a well-defined peptide secondary structure and therefore the formation of only large aggregates is observed. This is consistent with previous results from our laboratory showing that electrostatic repulsions and a decrement of intramolecular hydrogen bonds induce the loss of secondary structure in peptides, and therefore aggregation is promoted as an initial step in the formation of amyloid like fibrils (Botafios-García et al., 1998; García-González and Mas-Oliva, 2011). One of the factors that determine electrostatic repulsion is the net charge of peptides directly related to the pI value of the solution. In this sense, at neutral pH, the net charge of peptide helix-Y¹⁴ is -1.1 , condition that optimally allows peptide interaction with lipid and therefore a complete micellization process takes place. In contrast, when pH 6.3 is tested, as shown in Fig. 3C part of the sample is maintained as large aggregates and part as small micelles. The explanation for this phenomenon is related to the fact that peptide helix-Y¹⁴ at pH 6.3 presents a net charge of -0.5 , far from an optimal condition for peptide/lipid

interaction. pI values close to the isoelectric points of both peptides helix-Y¹⁴ (5.05) and helix-X¹² (4.17) tend to form large aggregates.

Our results show that peptide helix-Y¹⁴ when tested close to physiological pH values, allows the stabilization of the amphipathic carboxy-terminal α -helix and therefore the ability to promote the organization of micelle-like lipid structures. Under the same conditions, although in a smaller degree, peptide helix-X¹² showing a random conformation in solution, in the presence of lipid aggregates is also able to perform the lipid ordering phenomenon (Fig. 3E and F).

When we employ specific lipids such as 1,3-bis(sn)-phosphatidylcholine (lysophosphatidylcholine (lyso-C₁₂PC) and lysophosphatidic acid (LPA), known by us to promote the formation of α -helices with amphipathic peptides, peptide helix-X¹² is able to keep a stable α -helical conformation (Figs. 4A and B; 5A and B) and when visualized by NS-TEM also able to promote a lipid ordering effect (Figs. 4C and D; 5C and D). Therefore, for this process to occur, we can conclude that the presence of a well-structured amphipathic α -helix seems to be one of the key factors to achieve the phenomenon described. In order to further characterize peptide/lipid interactions and the fact that peptides promote the micellization process, employing the same concentrations that range from 0 to 40 mM for lyso-C₁₂PC and 0–10 mM for LPA, peptide/lipid cosedimentation assays were performed. Spectroscopy of peptide bonds associated to pellets obtained after ultraspeed centrifugation showed that while peptide helix-X¹² in solution does not sediment, the presence of lipid in solution allows the formation of micelles, and only at this condition peptide sedimentation takes place (Figs. 4E and 5E). When a lower centrifugation speed known to sediment liposome-like

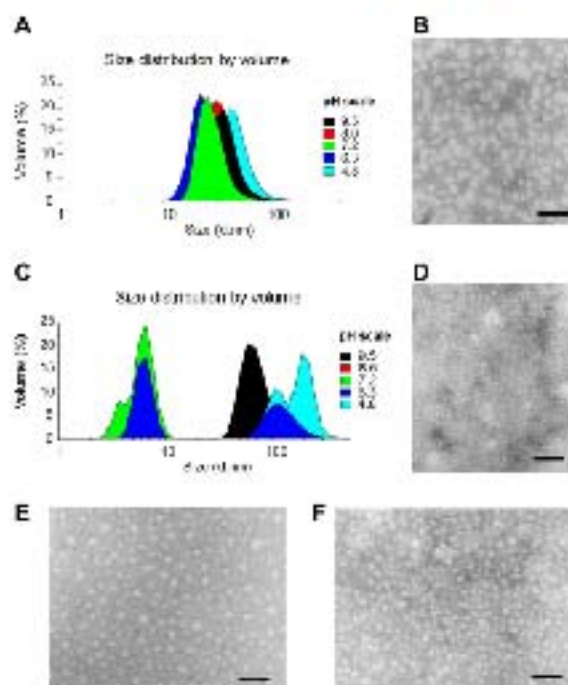


Fig. 3. Formation of micelle-like structures. (A) Particle size distribution of complex composed exclusively of phosphatidylcholine and cholesterol-esters measured by DLS using a pH range of 4.8–9.5; (B) same lipid sample at pH 7.2 studied by NS-TM; (C) same lipid mixture plus the addition of peptide helix-X¹² studied by DLS. Particle size distribution at pH 8.6 not shown since it exactly corresponds to result obtained at pH 9.5; (D) representative image of mixture lipid/helix-X¹² at pH 7.2 obtained with NS-TM employing the same experimental conditions; (E) electron microscopy image corresponding to the control mixture of phosphatidylcholine and cholesterol-esters studied at pH 7.2, and (F) plus the addition of peptide helix-X¹². For every EM image, bar indicates 300 nm.

structures was employed during experimentation with both lipids, either in the absence or the presence of peptide helix-X¹², negligible absorbance values were found associated with the almost non-existent pellets, indicating that the formation of liposomes is not a major factor to consider under the experimental conditions carried out throughout our study (Fig. 4F). Furthermore, non-denaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis support the view that micelle formation, promoted by the presence of peptide helix-X¹², initiates at low lipid concentrations as shown by the presence of bands only when the optimal association between lipid and peptide is achieved (Figs. 4F and 5F).

From these experiments, it is interesting to point out that the micellization process takes place precisely at the point when peptide helix-X¹² presents a structural transition from a disordered state to an α -helix when circular dichroism data is analyzed (Figs. 4A and B; 5A and B). Precisely at this point where secondary structure transitions and lipid ordering take place, the molar relationship between lipids tested and helix-X¹² corresponds to one order of magnitude difference with an average of 35 and 18 molecules of lyso-C₁₂PC and LPA, respectively, associated to one peptide. As shown in Fig. 5F, an increase in LPA concentration does not affect the amount of helix-X¹²/lipid micelles trapped in the gels, indicating that due to the fixed number of peptides placed in solution, practically all peptide units are found associated to lipid micelles independently of the fact that lipid concentration is being increased. Under these conditions, the physicochemical properties shown by the peptide such as high hydrophobicity and high hydrophobic moment (μ H) warranty a strong driving force towards micelle formation.

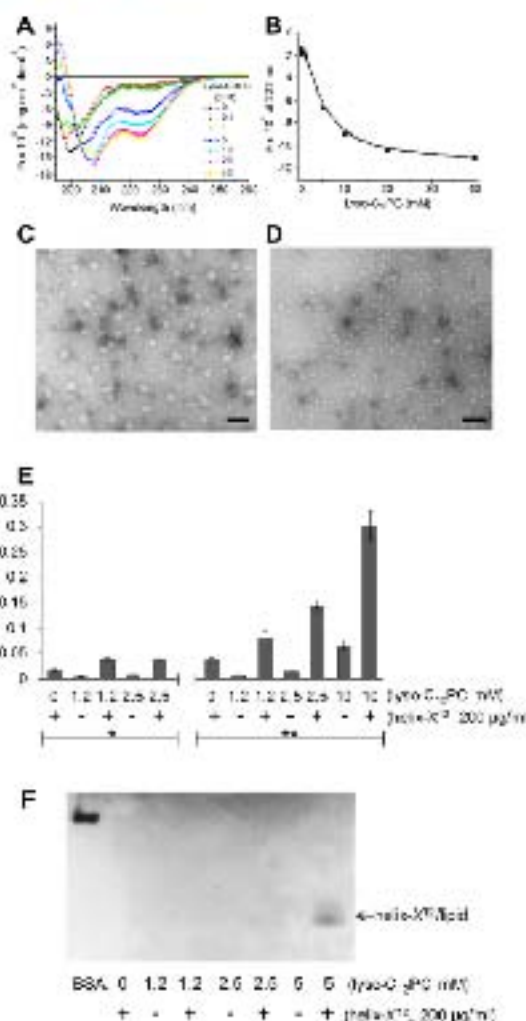


Fig. 4. Lyso-phosphatidylcholine promotes a stable α -helix conformation of peptide helix-X¹². (A) Circular dichroism and secondary structure changes observed in peptide helix-X¹² mediated by the presence of D-lysophosphatidylcholine; (B) mean molar ellipticity values at 222 nm revealed an increase in the α -helix content of peptide helix-X¹²; (C) lyso-phosphatidylcholine aggregates (10 mM) studied by NS-TM at pH 7.2; (D) effect of the presence of peptide helix-X¹² upon the same lipid mixture; for every EM image, bar indicates 300 nm; (E) lyso-phosphatidylcholine/peptide helix-X¹² cosedimentation assay and peptide band spectroscopy. Data shown are the mean \pm SEM of 3 experiments. Cosedimentation assays performed at 200,000g for 12 h (°) and 300,000g for 36 h (°°); (F) non-denaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis of pellets obtained from lyso-phosphatidylcholine/peptide helix-X¹² cosedimentation assays. The 7.5% gel was stained with Coomassie blue G-250.

Taking into account these considerations, molecular dynamics experimentation also allowed us to evaluate the behavior of peptide helix-X¹² in a well controlled lipid environment consisting of a relationship of 234 lipid molecules, ~93,700 water molecules and one peptide helix-X¹². As shown in Fig. 6A, the interaction of peptide helix-X¹² with 12-lysophosphatidylcholine aggregates promotes the formation of micellar-like structures with an average lower than 70 lipid molecules and one peptide per particle, showing diameters around 5 nm. It is interesting to observe that lipid particles that do not associate with a peptide molecule tend to associate between them, while peptide-associated micelles seem to be stable and stay in solution by themselves. The same lipid ordering phenomenon is observed when 16-lysophosphatidylcholine is

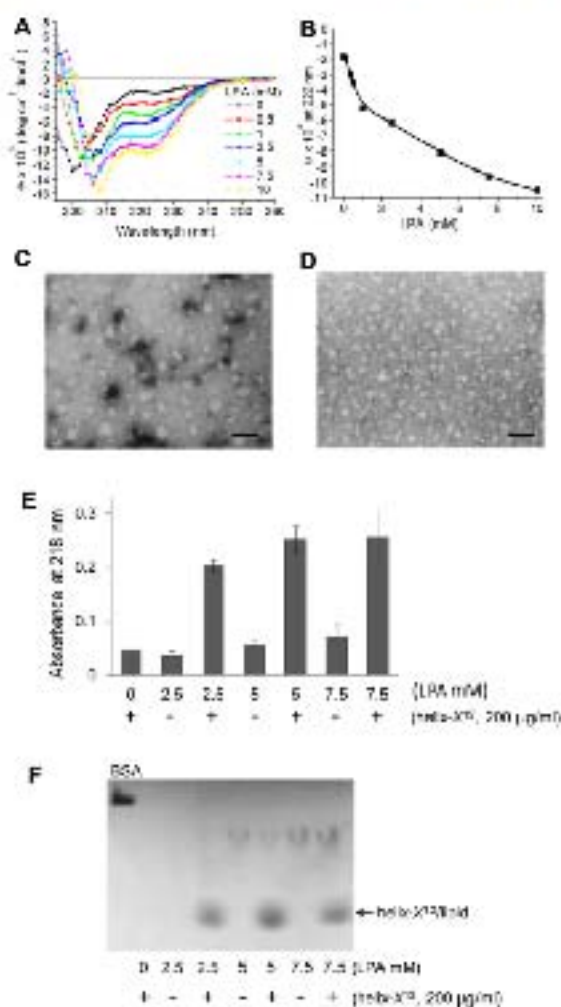


Fig. 8. Lysophosphatidic acid promotes a stable α -helix conformation of peptide helix- X^{12} . (A) Circular dichroism and secondary structure changes of peptide helix- X^{12} modulated by the presence of LPA; (B) mean molar ellipticity values at 222 nm revealed an increase in α -helix content of peptide helix- X^{12} while increasing lipid concentration; (C) LPA (10 μ M) aggregates studied by NS-TEM at pH 7.2; (D) effect of the presence of peptide helix- X^{12} on the same lipid mixture. For every EM image, bar indicates 100 nm; (E) LPA/peptide helix- X^{12} cocondensation assay and peptide band spectroscopy. Data shown are the mean \pm SEM of 3 experiments. Cocondensation assays performed at 100,000 \times for 5 h; (F) non denaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis of gels obtained from LPA/peptide helix- X^{12} cocondensation assays. The 3–40% gel was stained with Coomassie Blue G-250.

employed (Fig. 6B), lipids such as 6-lysophosphatidylcholine that presents a high cmc shows the tendency to effectively bind to peptide helix- X^{12} and organize peptide-associated micelles even before lipid molecules can form micelles by themselves (Fig. 6C). These results provide new evidence and further support the proposal that peptide helix- X^{12} located in CETP could facilitate the process of lipid ordering through the formation of micelle-like structures.

From this type of experiments and in order to prove that lipid ordering and the micellization concept might be also carried out by the complete protein, the need to perform a series of experiments employing native CETP became evident. As previously shown with peptides helix- Y^{12} and helix- X^{12} when incubated in a solution containing lipid aggregates, purified CETP isolated from human plasma (Fig. 7), shows the capability to induce a similar

phenomenon of lipid ordering as shown above for peptides (Fig. 8). We believe, as previously demonstrated by us employing a series of amphipathic peptides derived from several apolipoproteins (Mendoza-Espinosa et al., 2008; Bolaños-García et al., 2001), reordering of lipids from large non-homogenous to smaller more homogeneous particles could be accomplished due to the ability of CETP, through its amphipathic C-terminus domain, to promote an equilibrium shift and optimize the possibility for binding lipids in an aqueous solution.

The results presented in this study employing purified lipids and the use of artificial lipid structures, places us in an optimal position to experiment and better understand now the role for the C-terminus sequence of CETP during lipid transfer amongst human lipoproteins. According to our working hypothesis, present experimentation is being carried out by our group employing isothermal compression of binary Langmuir–Blodgett monolayers (Xicohtecatl-Cortez et al., 2004a,b) and interferometric surface force measurements (Ramos et al., 2008) in order to be able to elucidate and understand, for instance, lipid transfer and the role of surface pressure on HDL particles and its association to local disorder in proteins such as CETP and lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) (Aguilar-Espinosa et al., 2013).

4. Discussion

Since apparently lipoprotein stabilization is mostly based on a kinetic rather than a thermodynamic process, HDL particles for instance, can be considered unstable particles contained in a kinetic trap (Mehta et al., 2003). Due to this instability, several procedures that include thermal (Sparks et al., 1992) and chaotropic (Mehta et al., 2003) treatment, can easily release the particle from this trap. Our proposal presenting an alternative possibility that would explain the efficient lipid transfer activity carried out by CETP, could take advantage of this fact when the protein binds to an HDL particle releasing the lipoprotein from this kinetic trap (Guba et al., 2008). The release and further stabilization carried out at the surface of an HDL particle could be triggered by HDL lipids when binding around the amphipathic C-terminus domain of CETP. This new structural condition suggests that changes in the curvature present in CETP along its X-axis could be involved with the trigger mechanism that controls binding and release of CETP from the surface of a lipoprotein (Hall and Qiu, 2011; Mendoza-Espinosa et al., 2008), as well as to the phenomenon of HDL remodeling (Maugrals et al., 2013; Nieser et al., 2010).

Although recently Zhang et al. (2012) based on electron microscopy images have proposed that lipid transfer might be carried out through the formation of ternary complexes between two lipoprotein particles and CETP, their interpretation does not take into account the fact that the C-terminus amphipathic α -helix, proven to be essential for the transfer process, is not involved in their model. Moreover, molecular dynamics simulation studies have recently shown that CETP is not able to penetrate further than the phosphate groups of a phospholipid monolayer (Kuivaniemi et al., 2012). Also, there is no mention as to how triglycerides and phospholipids together with cholesteryl-esters might be transferred. Although two cholesteryl-ester molecules have been tightly associated to the tertiary structure of CETP, the presence of neutral lipids in the core space of the protein could be directly associated to the maintenance of its structural stability. In this respect, it has been reported that the bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) that shows a potent antimicrobial action and binds to lipopolysaccharides, presents a striking structural similarity with CETP. It is suggested that despite this close similarity, BPI presents a more open structure and a completely different C-terminus sequence in comparison to CETP, phenomenon must probably related

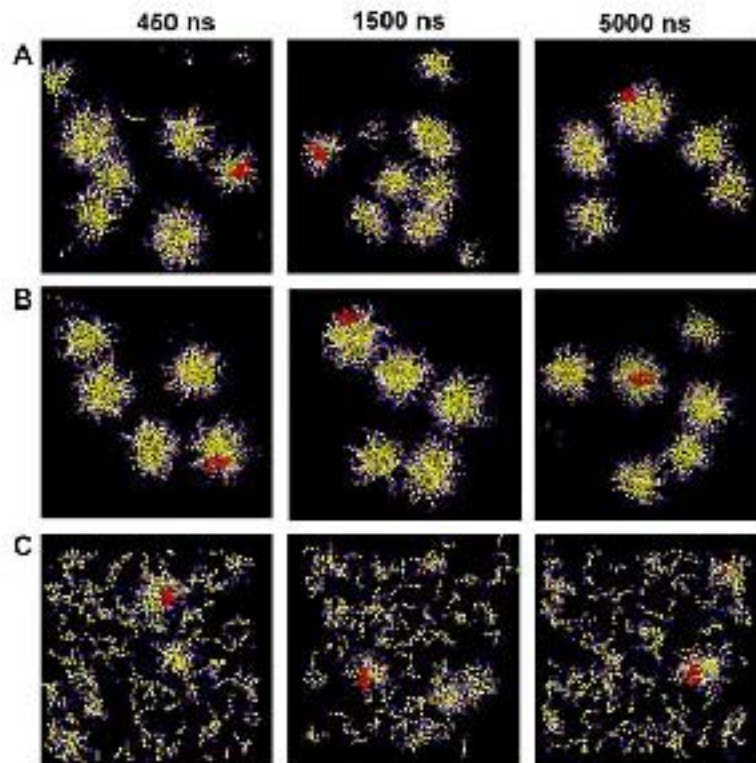


Fig. 6. Molecular dynamics simulations of lipids in the presence of peptide helix-2^{WT}. Snapshots were taken at 460, 1500 and 5000 ns. Peptide helix-2^{WT} incubated with 12-lysophosphatidylcholine (A), and 16-lysophosphatidylcholine (B). (C) Under incubation with 6-lysophosphatidylcholine monomers, peptide helix-2^{WT} promotes the organization of micelles around itself. Peptide molecules are represented in red and water molecules are not shown for clarity.

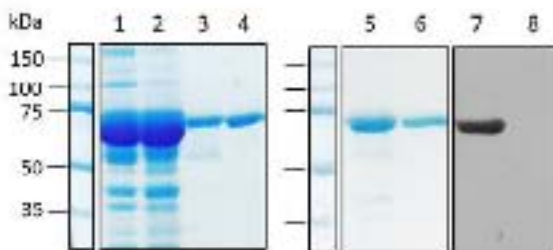


Fig. 7. Purification of CETP from human plasma: (1) lipoprotein-free plasma, (2) hydrophobic interaction chromatography fraction obtained with water dilution, (3) anionic exchange chromatography fraction eluted with a 0–1 M sodium chloride gradient (750–850 mM), (4) bovine serum albumin (BSA), (5) purified CETP, (6) BSA. Lanes (7) and (8) show the Western-blot analysis of fractions 5 and 6, respectively, employing an anti-CETP monoclonal antibody.

to the fact that BPI apparently does not bind cholesteryl-esters (Scamer, 2003). If we take into account that the amphipathic C-terminus α -helix of CETP might be considered as an orienting force region in the same fashion as detergents do (Tanford, 1978), the proposal we describe in this study could support an efficient transference of lipid molecules within energetically suitable parameters.

The presence of conformational transitions associated to the thermodynamics of the process similar to the one described here for the C-terminus domain of CETP, has been documented for other lipid-binding proteins such as apolipoprotein A-I (Kono et al., 2009; Oda et al., 2003). Since the C-terminus domain of CETP maintains a high intramolecular flexibility with a high factor- β associated to the interaction with lipids, this property must be directly

associated to the type and concentration of specific lipids that would allow or prevent shifts in secondary structure (García-González and Mas-Oliva, 2013; Koivuniemi et al., 2012). For instance, it has been described that LPA at *cis*, when placed in contact with β 2-microglobulin, promotes the formation and extension of amyloid fibrils (Pál-Gábor et al., 2009; Oukoshi et al., 2008). However, we found that employing a wide range of concentrations above *cis*, LPA and to a lesser extent lysophosphatidylcholine, promote a shift towards α -helical structures and prevent the formation of amyloid fibrils when peptide helix-2 (D₁₄N mutation) derived of the C-terminus domain of CETP is studied (García-González and Mas-Oliva, 2013). Therefore, the control of conformational changes at specific sites of proteins given by specific lipids might be taken as the basis for the design of lipid-like molecules which could maintain or stabilize the native state of proteins prone for aggregation (García-González and Mas-Oliva, 2013).

In conclusion, the type of molecular organization described in our study carried out by the C-terminal segment of CETP following disorder-to-order secondary structure transitions controlled by the presence of specific lipids, in our view might be understood as an example of a molecular switch (García-González and Mas-Oliva, 2013; Mendoza-Espinoza et al., 2009). This would allow CETP to control function under specific metabolic conditions and keep its transfer activity associated to a minimum entropy change related to the formation of micelle-like structures at the C-terminal segment of the protein, process that would dramatically lower the energy barrier for lipid transfer to occur through aqueous media.

Acknowledgments

We thank Dianca Delgado for technical assistance, Rodolfo Paredes for technical support during NS-TEM experimentation

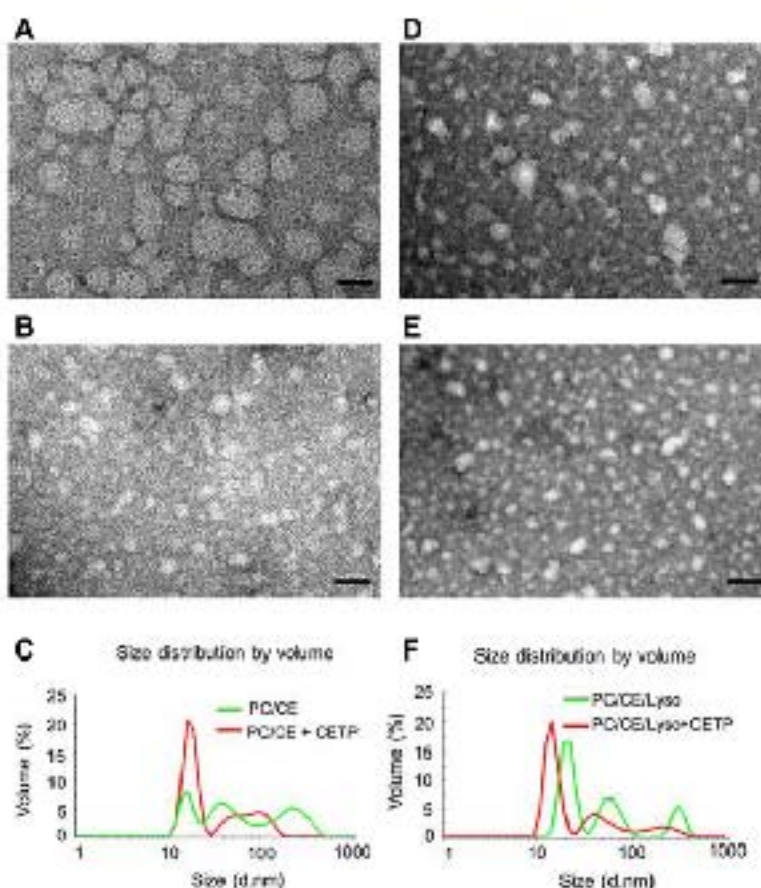


Fig. 8. Lipid reorganization induced by CETP. (A) Lipid aggregates composed of phosphatidylcholine and cholesterol-esters analyzed by cryo-TEM; (B) modification of the same lipid sample plus the addition of CETP generates better organized lipid particles; (C) particle size distribution of both samples evaluated through DLS; (D) lipid aggregate composed of phosphatidylcholine, cholesterol-esters (CE) and lipophosphatidylcholine (lyso); (E) effect of CETP upon the same lipid mixture and (F) sample evaluated by DLS. Protein used at 0.11 μ M and lipids at 12.7 μ M. Bar indicates 100 nm.

and Paula Toledo-Ishelles for help with PAGE. This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACYT grant 083673) and DGAPA/UNAM (grant IN206711), both awarded to J.M.-O., V.G.-G., N.G.-Q., P.M.-E. are recipients of a studentship from CONACYT.

References

- Aguilera-Espinosa, S.I., Mendez-Espinosa, F., Delgado-Correa, R.A., Mas-Oliva, J., 2013. Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) activity in the presence of Apo-AI-derived peptides exposed to disorder-order conformational transitions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.089>.
- Antonson, F.A.G., Wall, S.N., Almgren, M., Hoffmann, H., Holmman, J., et al., 1976. Theory of the kinetics of micellar equilibria and quantitative interpretation of chemical relaxation studies of micellar solutions of ionic surfactants. *J. Phys. Chem.* 80, 505–522.
- Beamer, L.J., 2007. Structure of human HAI (haemagglutinating-increasing protein) and implications for related proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 791–794.
- Beninko, H.J.C., Postma, J.P.M., Van Genderen, W.P., Dirksz, A., Haak, J.R., 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81, 3683–3692.
- Belante-García, V.M., Ramos, S., Castillo, R., Riechmann-Cortés, J., Mas-Oliva, J., 2003. Microclases of apolipoproteins at the interface. *J. Phys. Chem. B* 105, 5757–5765.
- Belante-García, V.M., Santos-García, M., Mas-Oliva, J., 1988. Stability of the C-terminal peptide of CETP mediated through an (L1,14) array. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 7–15.
- Belante-García, V.M., Serrano-García, M., Mas-Oliva, J., 1990. CETP and exchangeable apoprotein common features in lipid binding affinity. *Mol. Cell. Biochem.* 175, 1–10.
- Brodus, P., Mendez-Espinosa, F., Castillo, R., Mas-Oliva, J., Fréchet, Á., 2012. Multiscale molecular dynamics simulations of micelles: coarse-grain for self-assembly and atomistic resolution for Free energy. *Soft Matter* 8, 9055–9064.
- García-González, V., Mas-Oliva, J., 2013. Amphiphilic lipid formation of peptides derived from the C-terminal of CETP mediated by lipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 433, 54–58.
- García-González, V.G., Mas-Oliva, J., 2012. El Consejo de Universidad Asociada a la Conferencia de Proteínas. Text ed. Universidad Nacional Autónoma de México and El Manual Moderno, México.
- García-González, V., Mas-Oliva, J., 2011. Amphiphilic properties of a 12 amino acid fragment of the C-terminal domain of the cholesterol-ester transfer protein (CETP). *Int. J. Mol. Sci.* 12, 2019–2035.
- Guba, M., Cao, X., Pyzerhen, S., Gursky, O., 2008. Correlation of structural stability with functional remodeling of high-density lipoproteins: the importance of being disordered. *Biochemistry* 47, 11303–11307.
- Hall, J., Qiu, X., 2011. Structural and biophysical insight into cholesterol ester-transfer protein. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1000–1005.
- Kivimäki, A., Vuorio, T., Kivinen, P.T., Vuorimäki, J., Hyötyläinen, M.T., 2012. Lipid exchange mechanism of the cholesterol ester transfer protein clarified by atomistic and coarse-grained simulations. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002998.
- Kono, M., Okamoto, Y., Tanaka, M., Noyori, D., Ohtsuzakami, P., et al., 2008. Conformational flexibility of the N-terminal domain of apolipoprotein A-I bound to spherical lipid particles. *Biochemistry* 47, 11340–11347.
- Martick, S.J., Roodhala, H.J., Yofanov, S., Tsalamanis, D.P., De Vries, A.H., 2007. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J. Phys. Chem. B* 111, 7833–7839.
- Mas-Oliva, J., García-González, V., Delgado-Correa, R.A., Pérez, A., 2012. Fabricación de una Vacuna Terapéutica de Apolipoproteína Nasal contra el Desequilibrio de la

- Atherosclerosis y el Hígado Graso. MX patent application number MX/02/007582.
- Mas-Oliva J, Alonso A.L. 2010. System for the quantification of the cholesterol ester transfer protein in biological and synthetic samples. US patent 7 798 721.
- Mas-Oliva J, Alonso A.L. 2007a. System for the quantification of the cholesterol ester transfer protein in biological and synthetic samples. EP patent 1 242 446.
- Mas-Oliva J, Alonso A.L. 2007b. Sistema para la Cuantificación de la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol en Muestras Biológicas y Sintéticas. MX patent 246 945.
- Maugesle C, Pems A, van der Mark P, Megg C, Pflieger F, et al. 2011. Evidence for a role of CETP in HDL remodeling and cholesterol efflux: role of cysteine 12 of CETP. *Biochim Biophys Acta* 1831, 1644–1650.
- McLean I.R, Phillips M.C. 1984. Kinetics of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine exchange between unilamellar vesicles. *Biochemistry* 23, 4074–4076.
- Mehta R, Coma BL, Gordy G. 2005. Human plasma high-density lipoproteins are stabilized by kinetic barriers. *J Mol Biol* 350, 187–192.
- Mendoza-Espinosa F, García-González V, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J. 2009. Disorder-to-order conformational transitions in protein structure and its relationship to disease. *Mol Cell Biochem* 310, 105–117.
- Mendoza-Espinosa F, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J. 2008. Lipid dependent disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein B derived peptides. *Biochim Biophys Res Commun* 365, 8–13.
- Nichols J.W. 1985. Thermodynamics and kinetics of phospholipid monomer-vesicle interaction. *Biochemistry* 24, 6390–6398.
- Nisam F.J, Megg C, Ogawa N, Okamoto H, van der Mark P, et al. 2010. Mutating cholesterol ester transfer protein activity maintains efficient pre- β -HDL formation and increases reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 51, 3443–3454.
- Oda M.N, Forte T.M, Ryan R.O, Vess J.C. 2008. The C-terminal domain of apolipoprotein A-I contains a lipid-sensitive conformational trigger. *Nat Struct Biol* 15, 453–460.
- Okouchi T, Hirogawa K, Ohbashi Y, Kimura H, Takahashi N, et al. 2008. Lysophospholipids induce the nucleation and extension of beta2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Mol Biol Cell* 19, 3247–3255.
- Pal-Celis H, Guillouf I, Miranville A, Krakis F, Potik F, et al. 2009. Mechanism of lysophosphatidic acid-induced amyloid fibril formation of beta(2)-microglobulin in vitro under physiological conditions. *Biochemistry* 48, 5539–5548.
- Palmer S.M, Hayford M.P, Craig S.W, Schaller M.D, Campbell S.L. 2000. Lipid binding to the tail domain of stx2alin, specificity and the role of the N and C termini. *J Biol Chem* 275, 7271–7276.
- Qin X, Miery A, Amritt M.J, Chmielek B.A, Clark S.W, et al. 2007. Crystal structure of cholesterol ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Nat Struct Mol Biol* 14, 106–113.
- Ramos S, Campos-Tejada J, Mas-Oliva J, Nylander T, Castillo R. 2008. Forces between hydrophilic surfaces adsorbed with apolipoprotein AII alpha helices. *Langmuir* 24, 8558–8575.
- Rico-Negrete M, Siles-Cabrero J, Delgado-Castillo B, Zentella-Delera A, Mas-Oliva J, et al. 1994. Membrane bound CETP mediates the transfer of free cholesterol between lipoproteins and membranes. *Biochim Biophys Res Commun* 202, 1322–1328.
- Sporko D, Lind-Katz S, Phillips M.C. 1992. The charge and structural stability of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high-density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 267, 25019–25027.
- Talbot C. 1973. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* 202, 1012–1018.
- Tejada-Bellés P, García-Sánchez C, Avila-Vazquez R, Carolina-Fernes E, Pineda-Romero C, et al. 2010. Enzymatic assessment of cholesterol in electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *J Lipid Res* 51, 1610–1617.
- Van Der Spoel D, et al. 2005. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 26, 1701–1715.
- Wang S, Kusko P, Deng L, Tall A. 1995. Defective binding of neutral lipids by a carboxyl-terminal deletion mutant of cholesterol ester transfer protein. Evidence for a carboxyl-terminal cholesterol ester binding site essential for neutral lipid transfer activity. *J Biol Chem* 270, 512–518.
- Wang S, et al. 1998. Point mutagenesis of carboxyl-terminal amino acids of cholesterol ester transfer protein: Opposite faces of an amphipathic helix important for cholesterol ester transfer or for binding neutralizing antibody. *J Biol Chem* 273, 1055–1059.
- Xocherena-Cortes J, Castro R, Mas-Oliva J. 2005a. In search of new structural sites of exchangeable apolipoproteins. *Biochim Biophys Res Commun* 334, 467–470.
- Xocherena-Cortes J, Mas-Oliva J, Castillo R. 2005b. Phase transitions of phospholipid nanodiscs promoted by apolipoproteins. *J Phys Chem B* 109, 7707–7715.
- Zhang L, Yan F, Zhang S, Lei D, Charles M.A, et al. 2012. Structural basis of transfer between lipoproteins by cholesterol ester transfer protein. *Nat Chem Biol* 8, 312–318.

10.3 Manuscrito en redacción: “The C-terminus Domain of CETPI Defines its Function as a New Plasma Lipopolysaccharide-Binding Protein”

The C-terminus Domain of CETPI Defines its Function as a New Plasma Lipopolysaccharide-Binding Protein.

Victor García-González, Nadia Gutiérrez-Quintanar & Jaime Mas-Oliva*

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. 04510 México, D.F. México.

*Correspondence should be addressed to J.M-O (jmas@ifc.unam.mx).

Abstract

The cholesteryl-ester transfer protein isoform exclusively expressed in the small intestine (CETPI) and present in human plasma, although described by our group a few years ago, it had been waiting for a functional description and a plausible role of physiological relevance. Now, the present study introduces CETPI as a new protein with the potential capability to recognize, bind and neutralize lipopolysaccharides (LPS) in circulation during septic shock. Employing several peptides derived from the C-terminus domain of CETPI containing an important density of positively charged residues and prolines, we demonstrate their property not only to interact with several LPS serotypes but also to displace LPS bound to the surface of cells. Peptide VSAK derived

from the last 18 residues of CETPI protects against the cytotoxic effect of LPS upon macrophages, at high concentrations when macrophages, hepatocytes and microglial cells are tested in culture, it does not show cytotoxicity by itself, and prevents against the expression of pro-inflammatory cytokines and the generation of oxidative stress. Employing a septic shock model in rabbits, we demonstrate that the infusion of peptide VSAK *in vivo* presents the ability to protect against the deleterious effects of LPS and the property of reducing the presence of TNF α in plasma. CETPI presents itself as a new protein that undoubtedly will advance the possibilities to better understand and treat the dangerous effects of LPS present during the treatment of sepsis caused by Gram-negative bacteria and its common consequence, a septic shock condition.

Author Summary

Septic shock as a clinical condition secondary to sepsis, commonly causes multiple organ failure and frequently presents fatal outcomes. Although intensive care units worldwide nowadays offer the best known available treatments, the mortality rate from septic shock is still very high. Therefore new possibilities for the treatment of this condition are imperative. When septic shock is caused by Gram-negative bacteria, endotoxins mostly associated to lipopolysaccharides (LPS) located at the outer membrane of bacteria and commonly released during treatment with antibiotics, are responsible for most of the deleterious signs caused by these molecules in the clinic. Our study, for the first time places the cholesteryl-ester transfer protein isoform (CETPI) as a new plasma protein able to bind LPS in circulation. A series of peptides derived from the last amino acids of CETPI, show the ability to bind LPS *in vitro* as well as *in vivo* where experimentation

in rabbits demonstrate the potential use of these peptides to counteract the negative action of LPS in the clinic.

Introduction

CETPI (cholesteryl-ester transfer protein isoform) has been demonstrated to be only expressed in the small intestine and it is present in plasma under basal conditions [1]. Unlike CETP (cholesteryl-ester transfer protein), CETPI does not present exon 16 and 54 bases contained in intron 15 form part of the new mRNA replacing the 24 C-terminus residues present in CETP with a sequence of 18 residues containing a high concentration of prolines and positively charged amino acids [1].

Based on phylogenetic studies, a family of proteins denominated PLUNC (palate, lung, and nasal epithelium clone) has been described, including proteins associated to immunomodulation, as well as lipid transport and LPS binding. Members of this family include proteins such as CETP, BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and LBP (lipopolysaccharide binding protein) [2].

Although BPI and LBP share the most important structural elements and show high tridimensional structure similarities with CETP, they only present respectively a 19 and a 21 % homology in primary structure. In this respect, it is interesting to point out that in terms of primary structure, CETP and CETPI show an exact amino acid sequence with the only exception of 18 residues at their C-terminus region and therefore showing a 98 % homology [1]. Given the presence of LBP and BPI in human plasma associated to a LPS binding activity, the present study exploring the C-terminus domain of CETPI, investigates the potential ability of the newly described

protein to bind LPS, as well as its potential interaction with the cell membrane of bacteria and modulation of LPS-induced cellular oxidative stress.

An essential component of the outer membrane in Gram-negative bacteria are LPS, phosphorylated glycolipids unique to each bacterial species. In general, LPS consist of four components: lipid A, the inner core, the outer core and the O-antigen. However, most of the variations found between LPS reside on lipid A, the hydrophobic lipid moiety that anchors LPS to the outer leaflet membrane of bacteria. Lipid A is also considered an important element, since it represents the toxic moiety of these molecules [3]. In the bloodstream, when lipid A is exposed, the immune response is activated and a series of cytokine mediators of inflammation released into circulation. In this regard, LPS-mediated dysregulation of the innate immune response following an infection, could result in an exacerbated systemic inflammation, leading to hemodynamic pathogenesis and metabolic derangement that could trigger the development of septic shock [4,5].

During an infection event and therefore the establishment of an inflammatory condition, it has been reported that the main function of CETP in the reverse cholesterol transport system mobilizing cholesteryl-esters from high density lipoproteins (HDL) to very low density lipoproteins (VLDL) rich in triglycerides, is decreased. This phenomenon also leads to a lower synthesis of hepatic CETP mRNA [6,7]. Moreover, it has been shown that low serum HDL concentrations might be considered a risk factor in the initiation of septic shock, an even associated to an increased mortality [8]. Since a high HDL serum concentration and the capacity of these lipoproteins to bind LPS, they have been taken as a protective factor against sepsis [8], the LPS inhibitory action upon CETP in plasma might have the consequence to displace the equilibrium towards an adequate formation of HDL particles. An optimal formation of HDL particles would neutralize LPS and effectively direct these particles to the liver. Taking into consideration this mechanism together

with the LPS binding activity of LBP and BPI, our study places CETPI as a new molecule involved in the neutralization of deleterious effects of LPS in circulation.

Through experimentation with chemically synthesized peptides derived from the C-terminus domain of CETPI, we demonstrate that the LPS binding properties of the protein reside on this region. Based on these results and the tridimensional structure similarities between CETPI and other LPS binding proteins, we suggest that the new protein discovered in our laboratory shows key physicochemical features that might lead to improved LPS binding characteristics in comparison to the rest of members of the PLUNC family. Since CETPI is overexpressed in small intestine cell cultures in the presence of LPS and proved to be present in plasma [1], based upon *in vivo* experimentation employing experimental animals undergoing septic shock, the efficacy of the administration of peptide VSAK upon the acute pathological state was studied. The recovery of a normal body temperature together with a decrease in the presence of plasma pro-inflammatory molecules such as TNF- α observed after treatment, suggest that peptides derived from the C-terminus domain of CETPI and therefore CETPI by itself might represent a new group of molecules designed to block LPS action in circulation [9].

Results and Discussion

Secondary structure of the C-terminus domain of CETPI and CETP

Considering that CETPI does not present the key α -helix C-terminus lipid binding domain as it is present in CETP (helix-X domain), we initially performed the structural characterization of the last 18 residues of the CETPI C-terminus. Circular dichroism (CD) spectroscopy of several C-terminus domain derived peptides, indicates that peptide VSAK (V₄₇₄-P₄₉₁) is maintained in a disordered

conformation independent of pH-related secondary structure transitions (Figure 1A), in contrast to peptides derived from the C-terminus domain of CETP [10].

Previous work from our laboratory has described the presence of conformational changes in the secondary structure of CETP dependent on the specific lipid microenvironment associated to the protein. It has been demonstrated that micelles composed of lysophosphatidylcholine or lysophosphatidic acid (LPA) [11] prepared with peptides derived from the C-terminus domain of CETP, show structural transitions coupled to a lipid-ordering phenomenon [12]. In contrast, this type of lipid dependent structural transitions do not occur when CETPI peptides are evaluated (Figure 1B). These experiments show that the disordered structure present in peptide VSAK is maintained independent of the use of increasing LPA concentrations where ellipticity values at 222 nm (α -helix signal) are maintained constants. In contrast, CETP-helix-X shows a response associated to the presence of two transitional states (Figure 1C). These results show a clear difference in the way secondary structure transitions at the C-terminus domain of CETP and CETPI are regulated by a lipid related microenvironment.

Following a methodology developed in our laboratory to characterize peptide-lipid interactions employing cosedimentation assays coupled to peptide bond spectroscopy [12], we demonstrate that peptide VSAK derived from CETPI does not interact with lipids such as LPA. Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis confirms that lipid binding does not occur when peptide VSAK is evaluated (Figure 1D). In comparison to CETP, the CETPI C-terminus domain peptide VSAK, is a less flexible sequence, presents a positive electrostatic charge, hydrophilic characteristics and the presence of prolines, that as a whole show secondary structural disorder and point out towards an entirely new non-lipid related function for CETPI.

Sequence analysis of the CETPI C-terminus domain indicates that in a condition close to neutral pH, the net electrostatic charge for peptides ARS is +2 and VSAK +3, charge that is maintained employing a broad pH range (Figure 2). An increase in size of the CETPI derived peptides allow positive electrostatic charges to decrease, like in the 27 residues peptide denominated INPE (I₄₆₅-P₄₉₁) with a charge of +1, or in peptides EII (29 aa/E₄₆₃-P₄₉₁), SKG (36 aa/S₄₅₆-P₄₉₁) and SRL (48 aa/S₄₄₄-P₄₉₁) where the net electrostatic charge corresponds to 0. In this way, the highest net positive charge is specifically associated to peptide VSAK containing the last 18 residues (Figure 2). This characteristic points out to the potential function of CETPI, most probably related in contrast to CETP, with the interaction to negatively charged molecules such as LPS [13].

Therefore, disordered secondary structures such as the CETPI C-terminus region showing a high positive isoelectric point, could represent an important feature that facilitates the interaction of a localized region of the protein with negative charged surfaces. Since structural rigidity generally hinders activity [14], in accordance to several authors working with antimicrobial peptides and proteins [15,16], our results are consistent with the possibility that CETPI might have an important function against Gram-negative bacteria or molecules derived from them, for instance, by binding to their membrane and/or neutralizing *in vivo* the dangerous effects of free circulating LPS.

Functional characterization of peptides

Based on protocols where PAGE electrophoresis has been used for the characterization of LPS lipid A and O-antigen [17], we developed a protocol employing native polyacrylamide gradient gels to characterize LPS-peptide interactions.

When LPS are submitted to electrophoresis, it is common to observe a smearing pattern instead of well-defined bands [17]. Under our experimental conditions, when the CETPI C-terminus peptides are submitted to electrophoresis, no signal bands are observed (Figure 3A). Nevertheless, peptides previously incubated with LPS are retained in the gels as shown by Western blot analysis (Figure 3B). When the experiment is performed in the presence of peptides helix-X and helix-Z, both derived from CETP, LPS are not able to bind to these peptides and therefore not retained in the gel matrix (Figure 3C). These results show the strong interaction achieved between CETPI derived peptides and LPS, observation supported by peptide bond spectroscopy after cosedimentation experiments, where peptide VSAK is principally detected in samples incubated with LPS (Figure 3D).

Additional experiments to analyze LPS binding specificity were performed employing three *E. coli* LPS serotypes. Peptide VSAK indistinctly presents LPS binding properties to O111:B4, O26:B6 and O55:B5 serotypes, confirmed by a smearing pattern observed when Sudan black stain is used (Figure 4A). Western blot analysis of this experiment shows that the anti CETPI antibody A481-P491 is able to recognize samples where LPS from different serotype are incubated with peptide VSAK (Figure 4B). An ELISA detection system has been also developed by our group to broaden the peptide VSAK-LPS interaction [9]. When LPS (0.032 μg) were coupled to the plate surface, a signal increase in optical density (OD) was identified only in samples incubated with peptide VSAK (0.004 μg), as an indicative that the binding process takes place (Figure 5A). Employing a constant concentration of peptide VSAK, a signal increase in OD is exclusively shown in samples incubated with LPS under a concentration range of 0.004-0.032 μg (Figure 5B). Complementary experimentation using an anti-lipid A IgG, peptide VSAK coupled to the plate surface was identified

only in the presence of LPS (Figure 5C). Altogether, this experimental evidence demonstrates the LPS binding capabilities of peptide VSAK.

Moreover, the use of 5 $\mu\text{g/ml}$ of the fluorescent conjugated LPS (LPS-BODIPY FL), shows an enhancement in fluorescence emission spectra under incubation with gradual peptide VSAK concentrations (Figure 6A), where the highest emission spectra was recorded at 531 nm. An evident increase in emission fluorescence for peptide VSAK was registered from 50 $\mu\text{g/ml}$ to the highest concentration of 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 6B). Fluorescence value increments in the presence of LPS have been also described in experiments employing BPI and LBP, a phenomenon that has been associated to an optimal exposure of specific binding sites for LPS [18]. Even more, when the secondary structure of peptide VSAK was evaluated in the presence of LPS, we did not find changes in peptide secondary structure, and therefore remaining in a disordered state (Figure 6C).

Although peptide VSAK presents a disordered structure, it maintains the capability to bind LPS, condition associated with electrostatic interactions at the lipid surface. In this sense, it has been described that the most important driving forces for peptide adsorption onto lipid membranes are hydrophobicity, electrostatic and hydrogen bonding [19]. Therefore, the electrostatic nature of the LPS binding activity of peptide VSAK was also evaluated under a range of ionic strength conditions. By Western blot analysis employing NaCl concentrations between 200 mM and 1.4 M, our results demonstrate a decrease on binding associated to an increase in ionic strength (Figure 7A). Under the same conditions, when binding is evaluated employing LPS-BODIPY FL, a significant reduction in fluorescence values at 531 nm were registered (Figure 7B). LPS-VSAK emission spectra under the same ionic strength conditions, overlap with LPS samples without peptide VSAK incubation (Figure 7C).

Previous studies have shown that the biological effects of LPS can be reduced if negative charges in the phosphate groups of lipid A are modified [20]. In this respect, alkaline phosphatase (AP) dephosphorylation experiments were performed. Our results show that after treatment, a decrease in peptide VSAK binding to LPS is observed (Figure 7D). Since several authors have proposed that a cluster of positive residues at the tip of N-domain of LBP corresponds to a critical site for LPS interaction [21,22], it is interesting to note that peptide VSAK shares similar peptide characteristics to the LBP N-domain. Our results suggest that the LPS binding properties of peptide VSAK could be determined by electrostatic interactions at the lipid surface, and considering that peptide VSAK covers the last 18 residues of C-terminus of CETPI, residues K₄₇₇, R₄₈₂ and R₄₈₇ could be key for this interaction (Figure 2). Therefore, peptide VSAK binding to LPS may be related to the potential neutralization of negative electrostatic charges of phosphate groups located in lipid A.

Cell culture experimentation

With the objective to broaden the LPS-CETPI relationship from a cellular perspective, protein expression of colon derived cells (Caco-2) was evaluated under the stimuli of gradual LPS concentrations. Whereas an increase in CETPI expression was found secondary to a LPS stimuli (1 and 10 ng/ml), CETP synthesis in this cell type was not detected (Figure 8A). CETPI expression studied in small intestine cell (FHs74Int) cultures was also evaluated. When these cells are treated with gradual LPS concentrations, an increase in CETPI expression is detected (Figure 8B). Interestingly, evaluating the expression of CETP under the same conditions, only LPS concentrations above 10² ng/ml switch on CETP synthesis (Figure 8B). As previously reported by our group [1], CETPI synthesis with or without LPS treatment is non-existent in the hepatocyte. In contrast, CETP normally synthesized by the hepatocyte is inhibited by high concentrations of LPS added to the culture medium (Figure 8C). Consequently, in order to discard the possibility that this

decrease in CETP synthesis could be associated to changes in HepG2 cells viability, MTT assays were performed. Independently of LPS concentration, no significant differences in viability were found with treatment (Figure 8D). Therefore, differences shown between the expression of CETP and CETPI in colon cells, small intestine cells and hepatocytes treated with LPS, give us a hint related to their well differentiated *in vivo* function independently of their notable structural similarities.

CETP and CETPI must probably are originated from the same single gene where alternative RNA splicing or DNA arrangement explain the structural differences amongst them. Nevertheless, if we take into consideration that CETP, for example, apparently is capable to perform two functions; cholesteryl-ester transfer activity together with LPS binding capability at high LPS concentrations, then the one gene encoding for CETP presents two entirely different function gene sharing and therefore can be considered as a moonlighting protein [23]. The same situation applies to CETPI, where in this case the protein has been mainly designed for LPS sequestration, must probably maintaining the property to bind lipids. As previously mentioned by Joram Piatigorsky and Graeme J. Wistow working with the moonlight family of proteins crystallins, “such a double constraint could significantly slow the evolutionary clock for parts of these genes while elsewhere leading to accelerated change in the selection of modifications beneficial to the more recent function” [23]. This could be just one of the reasons why from the evolutionary point of view, CETP, that places into a short circuit the removal of cholesteryl-esters and mostly considered a deleterious protein, is still amongst us.

Taking into account that macrophages represent a well-defined cellular model for the study of LPS biology [24], RAW 264.7 cells were incubated for 45 min with increasing concentrations of peptide VSAK and stimulated with LPS (10 ng/ml). While MTT assays show that LPS induce a 50 %

decrease in cell viability, the administration of peptide VSAK gradually reduces this effect (Figure 9A). The highest protective effect was observed with VSAK at 1 µg/ml, representing a relationship lipid-peptide of 1-100. Under these conditions, there were no cytotoxic effects produced by VSAK itself (Figure 9A). The use of probe LPS-BODIPY confirms under the same lipid-peptide relationship, the presence of an evident peptide VSAK effect upon LPS internalization (Figure 9B-E).

In order to test the ability of peptide VSAK to protect macrophages against the deleterious effect of LPS serotype 0111:B4, a set of experiments was designed where cells treated in culture for 0, 2, 4 and 12 h with LPS (10 ng/ml) were added of 3 different concentrations of peptide VSAK for an additional 20 h incubation (Figure 10). LPS 0111:B4 has been characterized as a serotype that activates an intracellular response that leads to activation of inflammatory caspase-11 [25,26]. It is interesting to observe that dependent on time, although the viability effect of LPS upon macrophages is important, treatment with peptide VSAK allow viability values to recover close to control experiments. From these experiments, it becomes clear that peptide VSAK not only exerts a protective effect upon macrophage viability, but suggests that it might be binding and probably displacing LPS bound from the plasma membrane of cells (Figure 10).

Control experiments performed with the hepatic cell line hepG2 and the microglial cell line EOC, previously reported to be very sensitive to toxic stimuli [27], were designed to evaluate the potential intrinsic sensitivity of these cells to treatment with peptide VSAK concentrations up to 56 µg/ml showing no deleterious effects of peptide VSAK upon viability (data not shown).

Considering a standardized macrophage lipoprotein binding assay [28], the presence of peptide VSAK in the culture media induces a decrease in the amount of LPS-Alexa Fluor that binds to the macrophage cell surface when a lipid-peptide relationship of 1-10, 1-100 and 1-400 is evaluated in parallel to standard polymyxin B (PmB) treated cells. Polymyxin B an antibiotic

primarily used against Gram-negative bacteria, has been shown to alter bacterial outer membrane permeability and to inactivate LPS [29]. Data obtained with a relationship of 1-400 employing LPS from *S. minnesota*, show a similar effect as PmB in the reduction of LPS bound to the cell membrane. This response is also found when LPS from *E.coli* are tested (Figure 11A). These results suggest that peptide VSAK binds to LPS in solution, and thereby blocks the interaction of LPS with the cell surface. With the purpose to continue testing the possibility that peptide VSAK apparently presents the capability to displace LPS already bound to the cell surface, LPS incubated macrophages for 2 h and added of peptide VSAK, show a decrease in LPS-Alexa Fluor associated to the cell membrane (Figure 11B). Interestingly, although polymyxyn B shows the ability to bind LPS in solution, it is apparently incapable to displace LPS already bound to the cell membrane (Figure 11B). It is also shown that a LPS stimulus upon macrophages induces the formation of reactive oxygen species (ROS) (Figure 12A), in a similar way to the effect produced by molecules such as peptide β -amyloid [30]. This oxidative stress event produced by a LPS stimulus is decreased when cell incubation takes place in the presence of peptide VSAK (Figure 12B-E).

We have previously shown that macrophages under oxidative stress induce changes in the expression of several adaptor proteins important in the organization of the endocytic machinery [27]. In this respect, we found that a diminished expression of proteins such as the endocytic adaptor β -adaptin is present under an oxidative stress event [10,27]. At that time, secondary to the establishment of an oxidative stress, this result was related to an impaired internalization of ligands as a consequence of the lack of organization of the endocytic machinery [27,31]. New experiments carried out in our laboratory now show that endocytic proteins such as β -adaptin and amphiphysin, present the ability to bind to transcription factors such as c-myc, process related to the control of the cell cycle and also affected by oxidative stress (personal communication).

In order to test if the establishment of an oxidative stress event secondary to the presence of LPS in the incubation media of RAW 264.7 cells might also interfere with the organization of the endocytic machinery associated to transcription factor such as c-myc, a series of assays were set up. First of all we found that a fluorescence increase associated to the presence of ROS in the culture media of RAW 264.7 cells is directly connected to the presence of LPS in the media (Figure 13A). Viability assays performed in parallel show that a concentration of LPS of 10 ng/ml can be considered critical since the degree of cell damage starts to become an important one (Figure 13B).

When the same cells are employed and the presence of β -adaplin studied by a Western blot analysis, it is also shown that the critical concentration of LPS (10 ng/ml) dramatically affects the presence of c-myc (Figure 13C) and β -adaplin (13D) in the nucleus of these macrophages. Following immunoprecipitation assays of c-myc present in the nucleus associated to β -adaplin of LPS treated macrophages at the critical concentration of 10 ng/ml, it was found that although LPS treatment decreases the amount of the adaptor protein β -adaplin in the nucleus, the presence of peptide VSAK in the cell incubation media tends to restore the concentration of nuclear β -adaplin and in consequence of c-myc (Figure 13E).

These results for the first time show that the deleterious effect of LPS upon ROS production might be directly linked to a disarray of the cytoskeleton and the synthesis of transcription factors such as c-myc associated to the control of cell cycle. It is interesting to observe that peptide VSAK blocking the action of LPS, restores the normal cascade of events that control the synthesis of β -adaplin as well as c-myc.

For many years, the phenomenon of recognition of bacterial LPS as components of the cell membrane of Gram-negative bacteria carried out by the innate immune system was thought to involve simple pathways if compared to the acquired immune system. Nowadays this view has

dramatically changed since complex pathways involving multiple receptors and protein-protein interactions have been described [32]. The activity of LPS has been suggested to be carried out through its high affinity binding to LBP. The LPS/LBP complex carries out its action by associating to the CD14-toll like receptor located at the surface of monocytes and macrophages [33-35]. Activation of these cell types promotes the release of a network of proinflammatory molecules such as the tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukines (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-12) and other inflammatory molecules like the platelet-activating factor [36-38]. All these factors are directly involved in several well-known uncontrolled inflammatory responses from a localized area, all the way to the systemic level. This cascade of events might lead to multiple organ failure and a life-threatening condition known as septic shock [39], showing an exacerbated systemic reaction to an infection, nowadays recognized as one of the most general causes of death in intensive care units worldwide [40,41]. Despite the efforts made to counteract what it is known as the inflammatory disequilibrium syndrome and overall the outcome of septic shock, current therapeutic possibilities mainly involving inflammation and metabolic control and antibiotic treatment, have not changed for many years. Therefore, important attempts have been made to find new ways and new molecules to handle and treat sepsis and its consequent septic shock. In this direction, antimicrobial peptides (AMPs) mostly showing positively charged and amphipathic characteristics have been recently described as antimicrobial agents for clinical purposes [42,43]. AMPs synthesized by most living organisms and considered part of their immune system, carry out their antimicrobial action by forming pores disrupting the normal flux of nutrients and ions across the membrane of a large number of microorganisms [44,45]. These characteristics have also been reported to be the basis for several of the secondary effects and toxic events described when AMPs have been used in the clinic [46,47].

In vivo experimentation

In an attempt to test the potential use of peptide VSAK as a blockade molecule against the action of LPS *in vivo*, a pilot experiment was designed employing rabbits as the experimental animal model. Using four groups with three experimental animals each, our results demonstrate there is no raise in rectal temperature along 90 min with 30 min measurement intervals in the two groups of control animals injected in the marginal ear vein with vehicle or peptide VSAK alone (Figure 14A). In contrast, if LPS 0111:B4 are injected (0.3 µg/kg) using the same via, an immediate increase in temperature is recorded after 30 min, with an increase after 90 min treatment from 38.5°C to 40.2°C. However, if peptide VSAK is injected in the marginal vein of the right ear immediately followed by the injection of LPS 0111:B4 (0.3 µg/kg) in the marginal vein of the left ear, the increase in temperature is less pronounced along the 90 min duration of the experiment. The amount of peptide VSAK injected corresponds to a LPS-peptide VSAK relationship of 1-200, in the same fashion as the molecule relationship used along our *in vitro* cellular experiments. The complementary measurement of cytokine TNFα in the serum of the experimental animals at the end of the 90 min body temperature measurements, show that under control conditions TNFα is not found, whereas a significant quantity is measured in the group only treated with LPS 0111:B4. Again, the group of animals that received the infusion of peptide VSAK 5 min before the lipopolysaccharide injection, shows a significant decrease in plasma TNFα levels (Figure 14B).

Considering the nature of the LPS-peptide VSAK interaction, it is interesting to observe that peptide VSAK by itself does not show any secondary effects and exerts a protective effect in the group of experimental animals further injected with LPS. Although peptide VSAK under our experimental conditions does not show bacteriostatic or bactericidal activity (data not showed), its

function related with the blockade of LPS action contrasts with several AMPs that do not present lipid specificity and induce secondary toxic effects [48].

Taking into account that a high LPS concentration has been reported in the environment surrounding the intestinal epithelium in several pathological conditions [49,50], design made by nature through evolutionary processes most probably permitted, on the one hand, the existence of CETPI in order to control LPS cytotoxicity close to the enterocyte as a primary line of defense, as well as in plasma, and on the other, the existence of CETP as a key protein in the homeostasis of lipoprotein cholesterol, only by slightly modifying their generic protein structure at the carboxy-end region.

Since CETPI synthesized by intestine cells and found in circulation shares a 98% structural homology with CETP, it would not be unreasonable to think that molecules such as torcetrapib with CETP as target, might also be binding to CETPI and therefore impeding the proper recognition and binding of LPS by this newly described protein. This possibility emerges from the fact that torcetrapib, used in the near past to block the function of CETP in the fight against the development of atherosclerosis, had to be withdrawn from advanced clinical trials due, amongst other complications, to the fact that treatment showed the presence of an increased ratio of infections in comparison to control groups [51].

In this context, peptides such as VSAK forming part of the carboxy-end sequence of CETPI, emerge as potential agents to neutralize LPS in circulation, and therefore as a new generation of molecules in the therapeutic arsenal to overcome the negative action of LPS in septicemia and septic shock.

Materials and methods

Materials

L- α -Phosphatidylcholine (PC), 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate (LPA), 1-lauroyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso-C₁₂PC) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-1-glycerol were obtained from Avanti Polar Lipids. Cholesterol, MTT, LPS serotypes (O111:B4, O26:B6, O55:B5) and PmB were purchased from Sigma-Aldrich. Lipid polar extract from *E. coli* (ATCC 11303) composed by phosphatidylethanolamine 67 %, phosphatidylglycerol 23.2 % and cardiolipin 9.8 % was purchased from Avanti Polar Lipids. Fluorescent conjugates of LPS BODIPY FL and LPS Alexa-Fluor 488 from *E. coli* O55:B5, LPS Alexa Fluor 488 from *Salmonella minnesota*, and 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate were obtained from Invitrogen. Antibodies used in immunoprecipitation assays and anti-lipid A (26-5) antibody were from Santa Cruz Biotechnology. Alkaline phosphatase (AP) was purchased from New England Biolabs.

Peptide synthesis and preparation

Considering the amino acid sequence and physicochemical properties of the CETPI carboxy-end segment, several peptides were synthesized. Peptide VSAK corresponds to the last 18 residues (V₄₇₄-P₄₉₁), peptide ARS (A₄₈₁-P₄₉₁) the last 11 residues, while peptide INPE (I₄₆₅-P₄₉₁) corresponds to the last 27 residues (Figure 2). Lyophilized peptides were dissolved at 1 mg/ml and a further 1:5 dilution carried out. The effect of pH on peptide secondary structure was evaluated in a range of pH between 3.8-13, and the characterization of lipids evaluated only at pH 7.2.

Two peptides derived from the CETP C-terminus domain were used as a control: native peptide helix-X (E₄₆₅-S₄₇₆), and helix-Z (E₄₆₅-S₄₇₆) containing the D₄₇₀N mutation (Figure 2). Peptide purity greater than 98% was confirmed by mass spectrometry and HPLC analysis (GenScript).

Circular dichroism (CD) spectroscopy

CD spectra were recorded with an AVIV 62DS spectropolarimeter (AVIV Instruments) at 25°C employing far UV wavelengths (190–260 nm). Experiments were performed at a peptide concentration of 200 µg/ml in a 1 mm quartz path length cuvette, running AVIV software. Spectra were recorded with a 1 nm bandwidth, using 1 nm increments and 2.5 s accumulation time. CD results are reported as mean molar ellipticity (θ , deg cm² dmol⁻¹) considering the baseline correction.

***In silico* analysis**

In order to analyse the three-dimensional structure of CETP and BPI, the STRAP algorithm (Interactive Structure based Sequences Alignment Program) was used. Structures were obtained from the protein data bank (PDB), access codes 2obd and 1bp1 for CETP and BPI, respectively.

CETP and CETPI antibodies

CETP and CETPI antibodies that recognize specifically their respective C-terminus domains were obtained from chemically synthesized peptides corresponding to the last 11 residues of their C-terminus region. In order to allow coupling with Keyhole Limpet Hemocyanin, peptides included a cysteine at the amino-end. Peptides coupled to KLH were used in the production of anti-CETP IgY and anti-CETPI IgY employing white Leghorn chickens and using a standard protocol of 63 days as described by Alpha Diagnostic International. Antibody titers were determined by ELISA assays. Protocols used were based on methodology employed in the development of related patents carried out by our group [52-54].

The conditions used for the antibody anti-CETPI A481-P491 during the ELISA assays were established as previously described [9]. Using this technique it has been possible to devise a

method for the quantification of CETPI and set up the conditions for the development of a diagnostic kit [9].

Lipid/peptide cosedimentation assays and peptide bond spectroscopy

Cosedimentation experiments were performed using ultracentrifugation with an Optima TLX ultracentrifuge fitted with a TLA-100.2 rotor as described by us [12]. Supernatants were recovered and the remaining pellets resuspended in a phosphate buffer pH 7.2. Afterwards, peptide bond absorbance of supernatants and pellets measured at 205 and 218 nm.

Polyacrylamide gradient gel electrophoresis

LPA and lyso-C₁₂PC samples were processed employing 3-35, 3-38 and 3-40 % non-denaturing polyacrylamide gels [55]. Gradient gels were stained with Coomassie blue G-250 and Sudan black according to previous work [12]. For LPS sample characterization, we established a new methodology through the use of 0.8-25 % gradient gel electrophoresis. This method allows the study of lipid-peptide association under native conditions without modifying the properties of the molecules [9].

The influence of ionic strength upon peptide VSAK-LPS binding was also evaluated using increasing concentrations of NaCl by gradient gel electrophoresis and WB. The same type of experiment was evaluated after AP treatment and also through LPS-BODIPY FL fluorescence.

Particles formed by diverse lipid mixtures and LPS

PC and cholesterol particles were prepared with a molar relationship of PC 2 mM and cholesterol 0.1 mM (20:1). Lipids were mixed in chloroform and dried for 2 h under a gentle stream of N₂, with an additional period of 12 h in a Speed Vac concentrator (Savant). After drying,

lipids were resuspended in PBS and subsequently sonicated with 4 cycles of 10 min (15 s on/30 s off pulses) in an ice bath under a N₂ flow. Samples were left to equilibrate for 2 h and, then centrifuged 10 min at 13,000 rpm. For lipid polar extracts from *E. coli* (2 mg/ml), we employed the same methodology with 5 cycles of sonication. LPS were dissolved in ultrapure water (1 mg/ml) and sonicated in a water bath for 10 min. Micelles formed by lysophosphatidylcholine and lysophosphatidic acid were prepared following the same methodology as in reference [12].

Cell culture

FHs74Int (ATCC) epithelial cell cultures from small intestine were grown in Hybri-Care medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and 30 ng/ml of epidermal growth factor. Caco-2 cells from colon (ATCC) were maintained in MEM medium with the addition of 20 % FBS. RAW 264.7 cells (ATCC, macrophages) were grown in RPMI 1640 medium with 10 % FBS. HepG2 cells (ATCC) were grown in MEM medium with 10 % FBS and sodium pyruvate 1 mM. Penicillin (50 U/ml) and streptomycin (50 µg/ml) were added to the media. Cell viability determination at the different conditions used was evaluated through the MTT reduction assay, based on our previous work [10].

Macrophage cell cultures placed in 96 well plates (14000 cells/well) at 80 % confluence were treated by 45 min with increasing peptide VSAK concentrations, and further cultured for 24 h in the presence of LPS (10 ng/ml). After treatment, cell viability was measured through the MTT assay [10]. In another set of experiments, macrophages received LPS 10 ng/ml stimuli for 2, 4 and 12 h, previous to the addition of increasing gradual concentrations of peptide VSAK. These experiments were prolonged for additional 20 h and MTT assays performed according to previously used protocols [10].

Macrophages placed in black 96 well plates (Santa Cruz Biotechnology) were incubated for 2 h in serum-free media, washed twice with PBS and maintained for 30 min at 4°C. Afterwards, cells were incubated with peptide VSAK or PmB for 30 min. LPS-Alexa Fluor added and further incubated for 2 h at 4°C. Two washes with PBS were carried out and fluorescence measurements performed with a microplate reader Synergy HT (BioTek), employing an excitation wavelength of 495 nm and an emission of 519 nm with a 120 gain value.

Likewise, the peptide VSAK-LPS binding was characterized in the supernatant of culture media. RAW cells were treated with peptide VSAK for 45 min before the LPS-BODIPY FL addition under a relationship of 1 LPS molecule per 100 of peptide VSAK, and incubation continued for 4 h. Extracellular media were recovered and concentrated using a centricon step. Fluorescence was followed using an Olis spectrofluorimeter and samples resolved by gradient gel electrophoresis (0.8-25 %) and visualized using a Typhoon 9400 device.

Macrophages placed on black 96 well plates were incubated for 1 h in serum-free media, before being treated with peptide VSAK (10 µg/ml) for 45 min. A LPS stimulus (100 ng/ml) was added and maintained for 4 h at 37°C. At the end of this evaluation period, the fluorescent probe 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (11 µM) was added to the culture medium and further incubated for 45 min. Cells were washed and fluorescence measured in a microplate reader Synergy HT (Biotek).

Western blot analysis and immunoprecipitation assays

With a plate confluence of 90 %, Caco-2, FHs74Int and HepG2 cells were treated under different lipid conditions for 16 h. Afterwards, cells were lysed for 45 min at 4°C, and samples processed according to protocols used in a previous work [10]. For CETP and CETPI detection,

primary antibodies anti-CETP IgY and anti-CETPI IgY were used following protocols previously established by us [9,52-54].

Macrophages were treated with peptide VSAK (1 µg/ml) and LPS (10 ng/ml) for 4 h. Nuclei separation was carried out using a buffer containing sucrose (250 mM)/imidazole (3 mM) pH 7.4 supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Cells were scraped from culture dishes and 21 passages were performed through a 22G syringe. For nuclei recovery, lysates were centrifuged at 3400 rpm for 15 min. The two fractions (supernatant and pellet) were lysed for 25 min at 4 °C, and both fractions (20 µg/lane) analysed by SDS-PAGE, and transferred to PVDF membranes. For c-myc detection, the rabbit polyclonal anti-c-myc (1:600) was used, and for β-adaptin a goat polyclonal anti-β-adaptin (1:3000). Membranes were incubated with primary antibodies and after successive washes, membranes incubated with their respective secondary antibodies (1:5000) and horseradish peroxidase activity detected.

For immunoprecipitation assays, cytoplasm (400 µg) and nucleus (300 µg) fractions were incubated with an anti-c-myc antibody (1:400) for 2 h at 4°C. Immune complexes were precipitated with Protein G agarose Fast Flow (Millipore) ON at 4 °C. Immunoprecipitated proteins were washed 3 times and resuspended in Laemmli buffer, separated by SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes for WB analysis. Detection of β-adaptin was performed based on previous protocols [10].

Fluorescence assays

LPS (O55:B5) coupled to BODIPY FL and Alexa Fluor 488 probes were evaluated under the effect of peptide VSAK incubation. Fluorescence emission spectra were recorded at 25 °C from 520 to 575 nm. An excitation wavelength of 503 nm was used for LPS-BODIPY FL, and 519 nm for LPS-

Alexa Fluor. LPS-peptide mixtures were incubated for 3 h at 30°C and readings performed in a spectrofluorimeter Olis DM45.

Alkaline phosphatase assays

LPS O111:B4 (24 µg) were treated with AP (5 U) for 1 h at 37°C. AP activity was inactivated with a 5 min step at 70°C. Peptide VSAK (6 µg) was added to dephosphorylated LPS, and further incubated at 25°C. Treated samples were evaluated by gradient gel electrophoresis (0.8-25 %) and WB analysis.

Confocal microscopy

For the cellular localization of LPS-BODIPY FL and the effect of peptide VSAK treatment, a confocal scanning biological microscope FV1000 (Olympus) was employed. After 3 h treatment, cell images were obtained with the use of an excitation wavelength of 503 nm. Likewise, ROS localization in cells was followed employing the 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate probe.

Experimental animal protocol

Male New Zealand rabbits (2 kg) were maintained in a controlled temperature and humidity location, under *ad libitum* feeding conditions and free access to water. Four experimental groups with three experimental animals each were evaluated: group one was administered with vehicle. Group 2 administered with peptide VSAK (60 µg/kg) and group 3 with LPS (0.3 µg/kg). Group 4 was administered with peptide VSAK and LPS. 24 h fasting animals were injected in the marginal vein of the ear and every 30 min the rectal temperature registered. After 90 min, the animals were sacrificed following the administration of sodium pentobarbital, and every effort was made to minimize suffering.

Ear blood samples were obtained from animals after experimentation and serum recovered and stored in aliquots at -70°C. For the quantitative measurement of TNF α an ELISA Kit was employed according to the manufacture's indications (Cloud-Clone Corp).

Ethics Statement

This study was performed in strict accordance with the recommendations in the Declaration of Helsinki and NOM-062-ZOO-1999. The protocol of experimentation in rabbits was approved by the Ethics Committee of Animal Experiments of the Institute of Cellular Physiology at the National Autonomous University of Mexico (JMO22-14).

Acknowledgements

We thank Blanca Delgado-Coello for expert technical assistance, Danai Montalvan-Sorrososa for discussions and technical support during TEM experimentation, Paola Toledo-Ibelles for helpful advice with PAGE and Héctor Alfonso Malagón-Rivero and Claudia Rivera-Cerecedo for excellent technical assistance and experimental animal management.

References

1. Alonso AL, Zentella-Dehesa A, Mas-Oliva J (2003) Characterization of a naturally occurring new version of the cholesterol ester transfer protein (CETP) from small intestine. *Mol Cell Biochem* 245: 173-182.
2. Beamer LJ (2003) Structure of human BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and implications for related proteins. *Biochem Soc Trans* 31: 791-794.
3. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J (2003) Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 16: 379-414.
4. Schmidtchen A, Malmsten M (2013) Peptide interactions with bacterial lipopolysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 18: 381-392.
5. Huet O, Chin-Dusting JP (2014) Septic shock: desperately seeking treatment. *Clin Sci (Lond)* 126: 31-39.

6. Hardardóttir I, Moser AH, Fuller J, Fielding C, Feingold K, et al. (1996) Endotoxin and cytokines decrease serum levels and extra hepatic protein and mRNA levels of cholesteryl ester transfer protein in syrian hamsters. *J Clin Invest* 97: 2585-2592.
7. Masucci-Magoulas L, Moulin P, Jiang XC, Richardson H, Walsh A, et al. (1995) Decreased cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA and protein and increased high density lipoprotein following lipopolysaccharide administration in human CETP transgenic mice. *J Clin Invest* 95: 1587-1594.
8. Grion CM, Cardoso LT, Perazolo TF, Garcia AS, Barbosa DS, et al. (2010) Lipoproteins and CETP levels as risk factors for severe sepsis in hospitalized patients. *Eur J Clin Invest* 40: 330-338.
9. Mas-Oliva J, Gutiérrez-Quintanar N, García-González V (2014). Péptidos derivados del dominio C-terminal de CETPI como moléculas bloqueadoras del efecto citotóxico inducido por lipopolisacáridos en septicemia y choque séptico. Patent application: PCT/MX2014/000087.
10. García-González V, Mas-Oliva J (2011) Amyloidogenic Properties of a D/N Mutated 12 Amino Acid Fragment of the C-Terminal Domain of the Cholesteryl-Ester Transfer Protein (CETP). *Int J Mol Sci* 12: 2019-2035.
11. García-González V, Mas-Oliva J (2013) Amyloid fibril formation of peptides derived from the C-terminus of CETP modulated by lipids. *Biochem Biophys Res Commun* 434: 54-59.
12. García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mendoza-Espinosa P, Brocos P, Piñeiro A, et al. (2014) Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity. *J Struct Biol* 186: 19-27.
13. Gutiérrez-Quintanar N, García-González V, Mas-Oliva J (2014) Nuevos Péptidos y Proteínas con la Capacidad de Unión a Lipopolisacáridos como Potenciales Agentes Terapéuticos contra el Choque Séptico. *Academia Nacional de Medicina de México*. In press.
14. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ (2011) The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol* 29: 464-473.
15. Schmidtchen A, Malmsten M (2013) Peptide interactions with bacterial lipopolysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 18: 381-392.
16. Mohanram H, Bhattacharjya S (2014) Resurrecting inactive antimicrobial peptides from lipopolysaccharide trap. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 1987-1996.
17. Marolda CL, Lahiry P, Vinés E, Saldías S, Valvano MA (2006) Micromethods for the characterization of lipid A-core and O-antigen lipopolysaccharide. *Methods Mol Biol* 347: 237-252.
18. Yu B, Wright SD (1996) Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein. Transfer of LPS to soluble CD14. *J Biol Chem* 271: 4100-4105.
19. Seelig J (2004) Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim Biophys Acta* 1666: 40-50.

20. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, et al. (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458: 1191-1195.
21. Lamping N, Hoess A, Yu B, Park TC, Kirschning CJ, et al. (1996) Effects of site-directed mutagenesis of basic residues (Arg 94, Lys 95, Lys 99) of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein on binding and transfer of LPS and subsequent immune cell activation. *J Immunol* 157: 4648-4656.
22. Eckert JK, Kim YJ, Kim JI, Gürtler K, Oh DY, et al. (2013) The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity. *Immunity* 39: 647-660.
23. Piatigorsky J, Wistow GJ (1989) Enzyme/crystallins: gene sharing as an evolutionary strategy. *Cell* 57: 197-199.
24. Schilling JD, Machkovech HM, He L, Diwan A, Schaffer JE (2013) TLR4 activation under lipotoxic conditions leads to synergistic macrophage cell death through a TRIF-dependent pathway. *J Immunol* 190: 1285-1296.
25. Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA (2013) Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science* 341: 1250-1253.
26. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, et al. (2013) Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* 341: 1246-1249.
27. Manzano-León N, Delgado-Coello B, Guaderrama-Díaz M, Mas-Oliva J (2006). Beta-adaptin: key molecule for microglial scavenger receptor function under oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 588-594.
28. Montano EN, Boullier A, Almazan F, Binder CJ, Witztum JL, et al. (2013) Development and application of a nonradioactive binding assay of oxidized low-density lipoprotein to macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res* 54: 3206-3214.
29. Cardoso LS, Araujo MI, Góes AM, Pacífico LG, Oliveira RR, et al. (2007) Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb Cell Fact* 6: 1.
30. Manzano-León N, Mas-Oliva J (2006) Oxidative stress, beta-amyloide peptide and Alzheimer's disease. *Gac Med Mex* 142: 229-238.
31. Aguilar-Gaytan R, Mas-Oliva J (2003) Oxidative stress impairs endocytosis of the scavenger receptor class A. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 510-517.
32. Triantafilou M, Triantafilou K (2005) The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J Endotoxin Res* 11: 5-11.
33. Haziot A, Tsuberi BZ, Goyert SM (1993) Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 150: 5556-5565.

34. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-1433.
35. Sang Hoon Rhee (2014) Lipopolysaccharide: Basic Biochemistry, Intracellular Signaling, and Physiological Impacts in the Gut. *Intestinal Research* 12: 90-95.
36. Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, et al. (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395: 284-288.
37. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F (1999) Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 274: 10689-10692.
38. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, White M, Carroll SF, et al. (1999) Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 180: 1584-1589.
39. Zweigner J, Gramm HJ, Singer OC, Wegscheider K, Schumann RR (2001) High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. *Blood* 98: 3800-3808.
40. Fisher CJ Jr, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, et al. (1996) Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 334: 1697-1702.
41. Van Oosten M, Rensen PC, Van Amersfoort ES, Van Eck M, Van Dam AM, et al. (2001) Apolipoprotein E protects against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality. A new therapeutic approach to treat gram-negative sepsis. *J Biol Chem*. 276: 8820-8824.
42. Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.
43. Giuliani A, Pirri G, Nicoletto S (2007) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent Eur J Biol* 2: 1-33.
44. Shai Y (2002) From innate immunity to de-novo designed antimicrobial peptides. *Curr Pharm Des* 8: 715-725.
45. Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA (2010) Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog* 6: e1001067.
46. Iwagami M, Yasunaga H, Doi K, Horiguchi H, Fushimi K, et al. (2014) Postoperative polymyxin B hemoperfusion and mortality in patients with abdominal septic shock: a propensity-matched analysis. *Crit Care Med* 42: 1187-1193.
47. Bhavnani SM, Rubino CM, Ambrose PG, Drusano GL (2010) Daptomycin exposure and the probability of elevations in the creatine phosphokinase level: data from a randomized trial of patients with bacteremia and endocarditis. *Clin Infect Dis* 50: 1568-1574.

48. Domingues MM, Inácio RG, Raimundo JM, Martins M, Castanho MA, et al. (2012) Biophysical characterization of polymyxin B interaction with LPS aggregates and membrane model systems. *Biopolymers* 98: 338-344.
49. Leaphart CL, Cavallo J, Gribar SC, Cetin S, Li J, et al. (2007) A critical role for TLR4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair. *J Immunol* 179: 4808-4820.
50. Sodhi CP, Shi XH, Richardson WM, Grant ZS, Shapiro RA, et al. (2010) Toll-like receptor-4 inhibits enterocyte proliferation via impaired beta-catenin signaling in necrotizing enterocolitis. *Gastroenterology* 138: 185-196.
51. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, et al. (2007) Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med* 357: 2109-2122.
52. Mas-Oliva J, Alonso AL (2010) System for the Quantification of the Cholesterol Ester Transfer Protein in Biological and Synthetic Samples. US patent 7,749,721.
53. Mas-Oliva J, Alonso AL (2007) System for the Quantification of the Cholesterol Ester Transfer Protein in Biological and Synthetic Samples. EP patent 1,242,446.
54. Mas-Oliva J, Alonso AL (2007) Sistema para la Cuantificación de la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol en Muestras Biológicas y Sintéticas. MX patent 246,945.
55. Toledo-Ibelles P, García-Sánchez C, Avila-Vazzini N, Carreón-Torres E, Posadas-Romero C, et al. (2010) Enzymatic assessment of cholesterol on electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *J Lipid Res* 51: 1610-1617.

Figure legends

Figure 1. Structural characterization of CETPI C-terminus domain. (A) CD spectra of peptide VSAK obtained at a pH range of 3.8-13. (B) CD spectra of peptide VSAK under increasing LPA concentrations. (C) Using the same conditions, ellipticity values at 222 nm of peptide VSAK and helix-X. (D) Non-denaturing polyacrylamide gradient gels (3-40 %) of samples processed through cosedimentation assays. Coomassie blue stain and Sudan black stain were performed.

Figure 2. Sequence analyses of the last 48 residues of the CETPI C-terminus domain. (A) Amino acid sequences of several peptides derived from the C-terminus domain; Residues with a positive

charge (green), negative charge (yellow). (B) Electrostatic charge distribution of peptides under different pH conditions. Helix-X was used as a reference.

Figure 3. LPS-binding properties of the CETPI C-terminus domain. (A) Electrophoresis in native polyacrylamide gradient gels (0.8-25%) employing LPS, peptides ARS, VSAK and mixtures of LPS and peptide. Coomassie blue stained gel. (B) Western blot analysis employing the anti-CETPI A481-P491 antibody that recognizes the C-terminus domain. (C) Peptide-LPS binding detected when peptide VSAK is incubated with LPS serotype 0111:B4. (D) Peptide bond absorbance of pellet samples obtained after cosedimentation experiments.

Figure 4. LPS binding properties of peptide VSAK using several LPS serotypes. LPS-peptide VSAK binding identified employing serotypes 0111:B4, O26:B6, O55:B5 and evaluated by Sudan black stain (A) and Western blot analysis using the anti-CETPI A481-P491 antibody (B).

Figure 5. Characterization of LPS-peptide VSAK binding by ELISA. (A) ELISA plates coupled with LPS maintaining constant peptide VSAK concentration. (B) Peptide VSAK concentration maintained constant with LPS concentration increments. (C) ELISA plates coupled with peptide VSAK incubated with LPS, lipid A antibody (26-5) was employed.

Figure 6. LPS binding characterization of peptide VSAK using a fluorescence probe. (A) Effect of the peptide VSAK treatment on LPS-BODIPY FL probe. Emission spectra in a 520-575 nm range were registered, employing an excitation wavelength of 513 nm. (B) Fluorescence emission values at 531 nm (maximal value) under increasing peptide VSAK concentrations. (C) Peptide VSAK (200 µg/ml) secondary structure analysis evaluated by CD after incubation with LPS.

Figure 7. LPS-peptide VSAK binding determined by electrostatic interactions with lipid A. (A) Effect of ionic strength on LPS-VSAK binding, evaluated through increasing NaCl concentrations

and visualized by WB on native polyacrylamide gradient gels. (B) Emission fluorescence values registered at 531 nm. (C) Emission spectra generated under the same conditions. (D) Alkaline phosphatase dephosphorylation effect on LPS-peptide VSAK binding evaluated by WB.

Figure 8. Differential expression of CETPI and CETP under a LPS stimulus. (A) CETPI and CETP expression in Caco2 cells under LPS treatment. Specific antibodies for each protein respective C-terminus domains were employed. (B) CETPI and CETP expression in small intestine FHs74Int cells after 12 h treatment of gradual increased LPS concentrations. (C) CETPI and CETP expression in HepG2 cells treated with LPS. (D) Cell viability measured by MTT under the same experimental conditions. β -actin was used as loading control.

Figure 9. Peptide VSAK prevents cytotoxic effects in macrophages. (A) Cell viability evaluated by MTT in macrophages treated for 45 min with increasing doses of peptide VSAK, previous to the stimuli with LPS 10 ng/ml. Mean values are presented ($n=6$, $X \pm$ S.E.M.), * $p<0.05$, ** $p<0.001$ compared to control group. (B), (C) Confocal microscopy of macrophages stimulated with LPS-BODIPY (0.5 $\mu\text{g/ml}$) for 4 h. (D), (E) Effect of peptide VSAK treatment (50 $\mu\text{g/ml}$) under the same LPS-BODIPY conditions.

Figure 10. VSAK treatment protects macrophages against LPS cytotoxicity. (A) Control experiment with peptide VSAK incubation for 45 min before a LPS 10 ng/ml stimuli. (B) Effect on cellular viability produced by LPS treatment 2 h previous to the peptide VSAK addition, likewise for 4 h (C) and 12 h (D). In all conditions after peptide VSAK administration, cells were incubated for 20 h. Mean values are presented ($n=6$, $X \pm$ S.E.M.), * $p<0.05$, ** $p<0.01$, # $p<0.001$, ¶ $p<0.0001$ compared to control the group.

Figure 11. Peptide VSAK incubation interferes with LPS binding to macrophage receptors. (A)

Inhibition of LPS binding to the cell surface by peptide VSAK incubation. LPS of *S. minnesota* and *E. coli* 055:B5, both coupled to Alexa probe were used. PmB was used as a control. (B) Displacement of LPS from the cell membrane by peptide VSAK. Mean values are presented (n=5, X ± S.E.M.), *p<0.1, ***p<0.01 #p<0.005, ¶p<0.001 compared to control groups.

Figure 12. VSAK treatment attenuates macrophage ROS production caused by LPS. (A) ROS

production evaluated using dihydrofluorescein diacetate. Mean values are presented (n=6, X ± S.E.M.), *p<0.05 compared to control groups. (B), (C) ROS identification by confocal microscopy under a stimulus of LPS 100 ng/ml for 4 h. (D), (E) Effect of the addition of peptide VSAK (10 µg/ml) under the same LPS stimuli.

Figure 13. Reactive oxygen species induced by LPS stimuli promote a decrease in expression of c-

myc and β-adaptin. (A) Flow cytometry measurements were performed for the detection of ROS in macrophages treated with increasing doses of LPS by 12 h. (B) MTT viability assays were performed. Western blot detection of c-myc (C) and β-adaptin (D). (E) Western blot from an immunoprecipitation of c-myc from macrophages incubated with LPS (10 ng/ml) and peptide VSAK (1 µg/ml). In all cases, β-actin was used as control.

Figure 14. Peptide VSAK protection against LPS in a septic shock model established in rabbits. (A)

Rectal temperature measurements in all experimental animal groups throughout 90 min. As dosage a LPS-peptide VSAK relationship of 1-200 was employed. Mean values are presented (n=3, X ± S.E.M.), *p<0.05, **p<0.01 were obtained in the analysis of LPS group with respect to LPS plus peptide VSAK group. (B) TNFα serum values obtained at the end of the 90 min experiment.

Figures and Tables

Figure 1

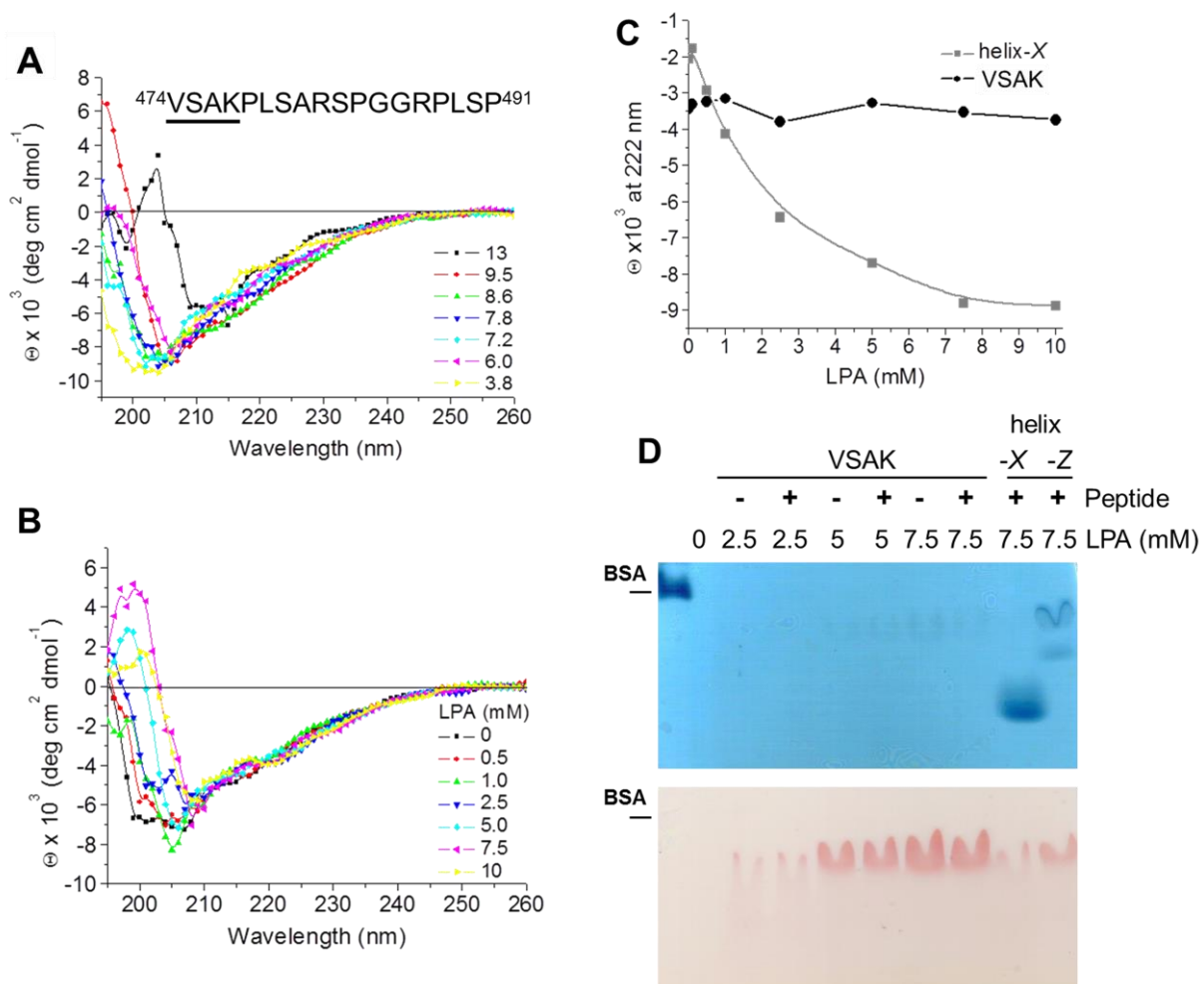


Figure 2

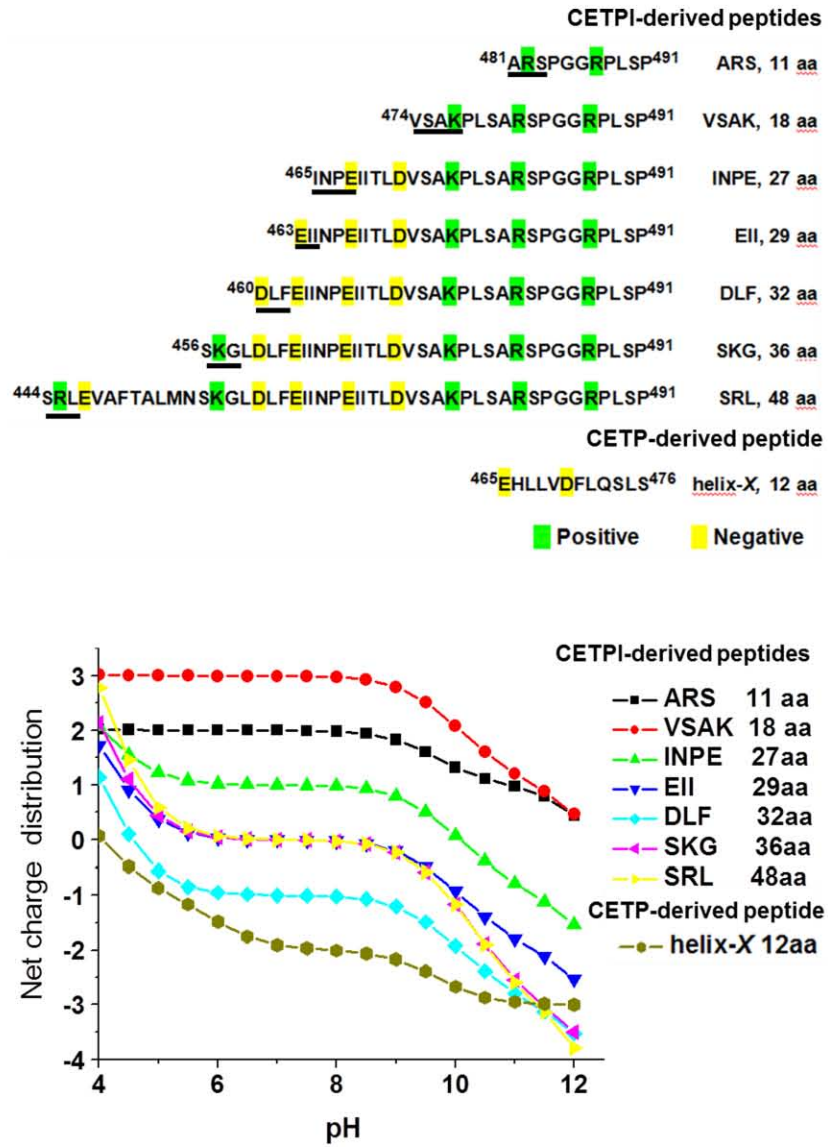


Figure 3

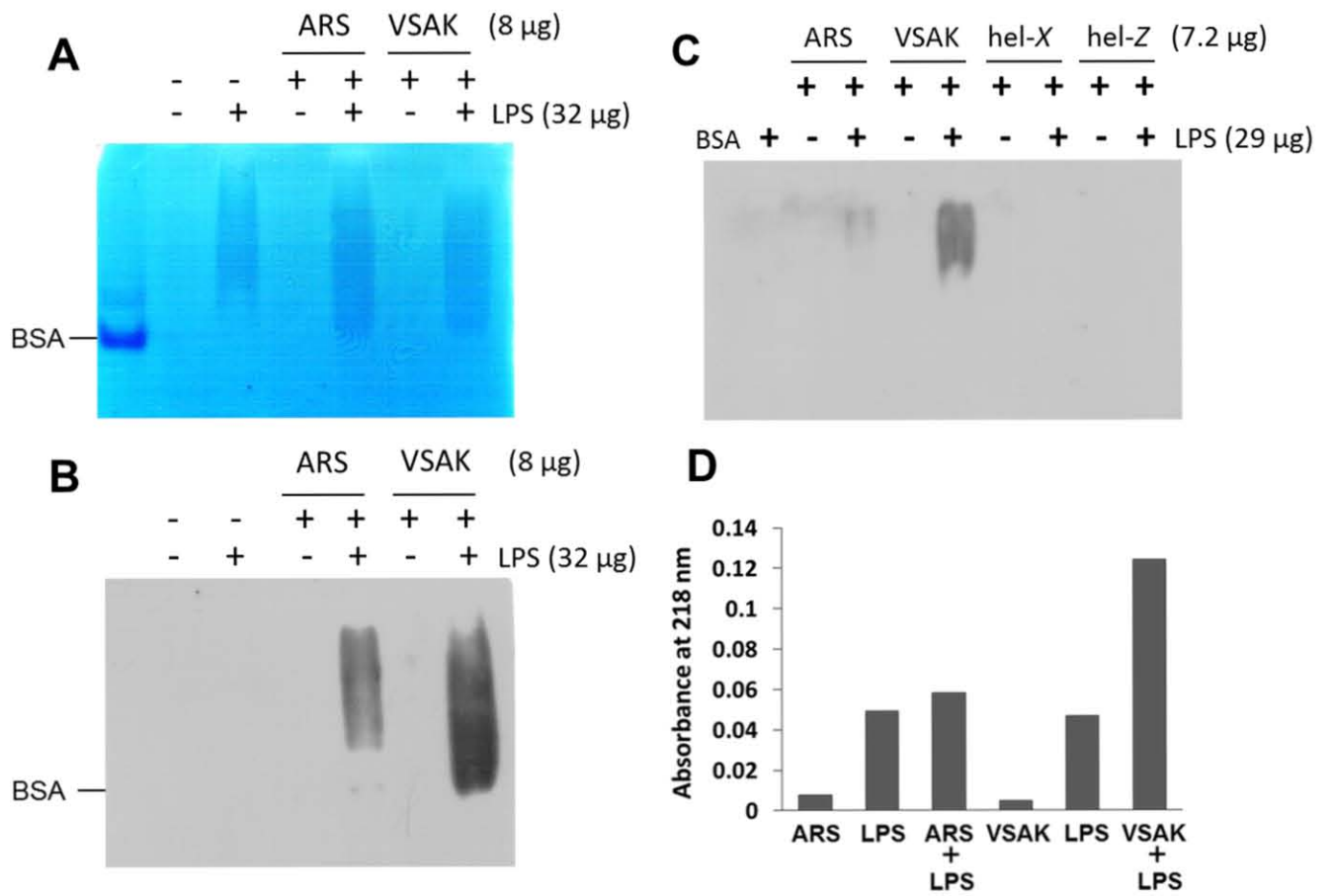


Figure 4

A

		O111:B4		O26:B6		O55:B5		LPS (29 μ g)
		-	-	+	+	+	+	+
BSA		-	+	-	+	-	+	+

VSAK (7.2 μ g)



B

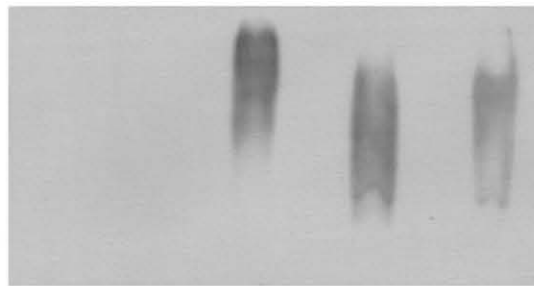


Figure 5

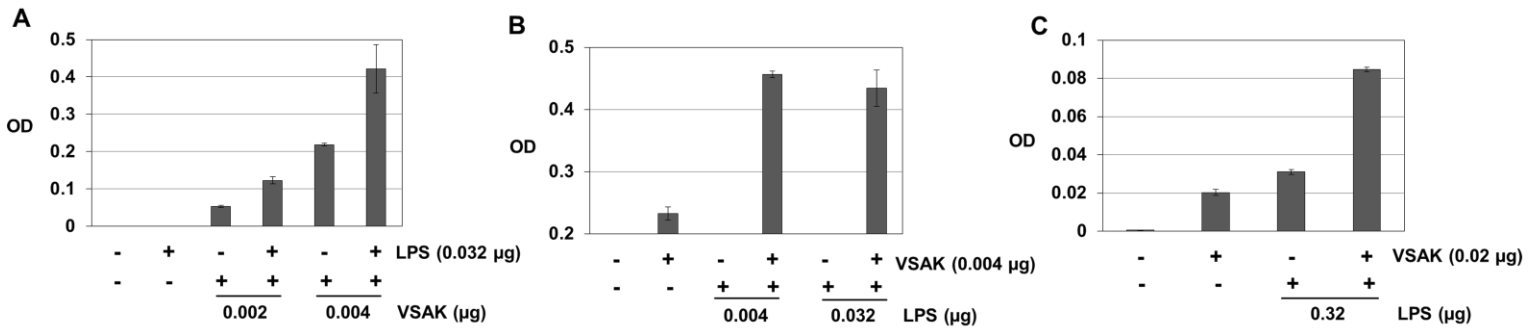


Figure 6

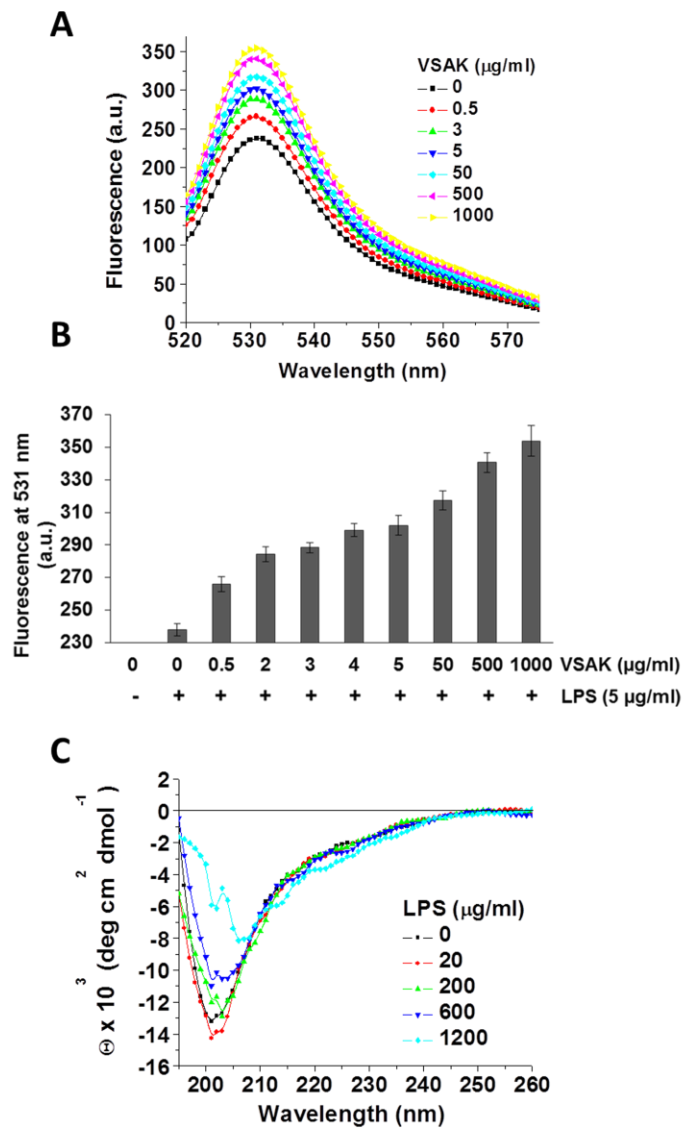


Figure 7

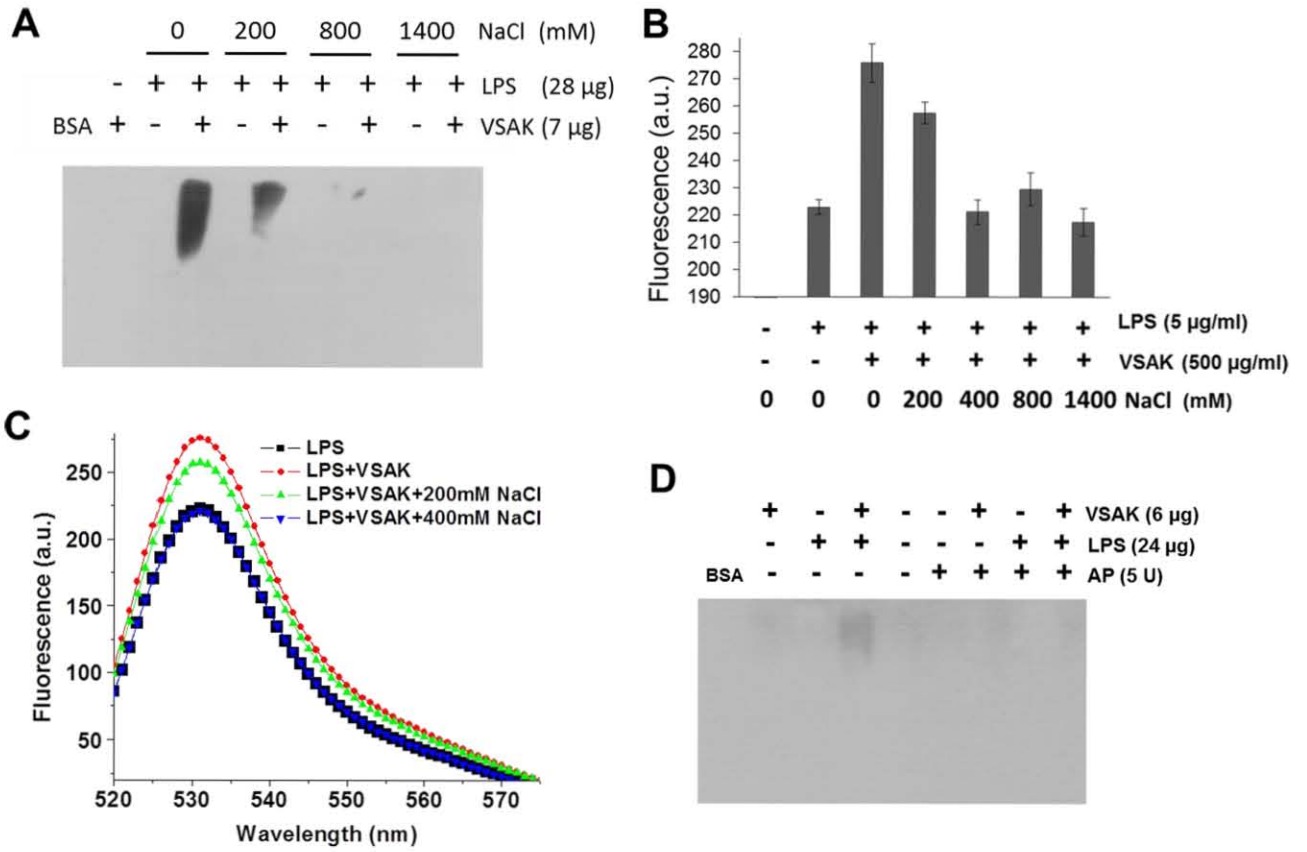


Figure 8

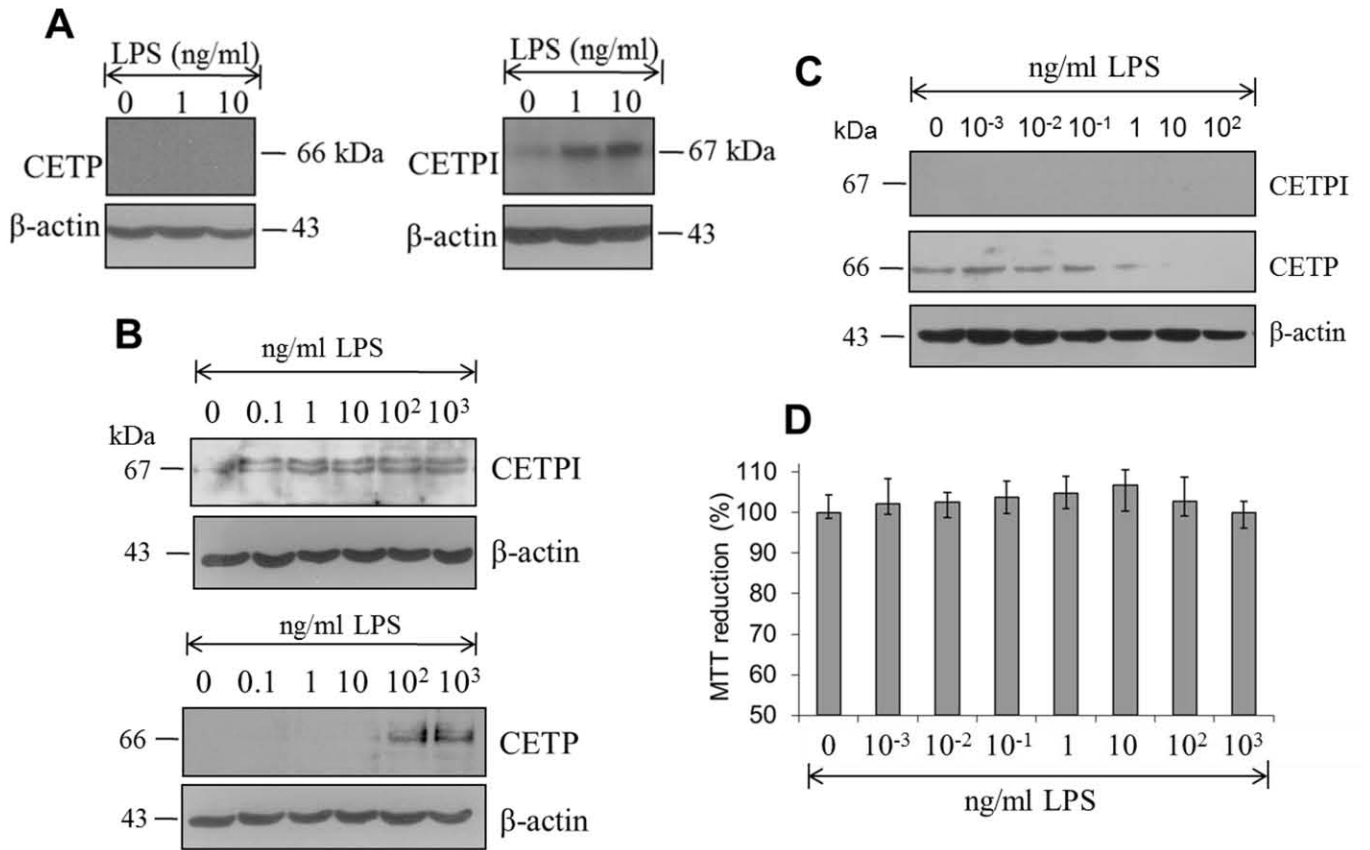


Figure 9

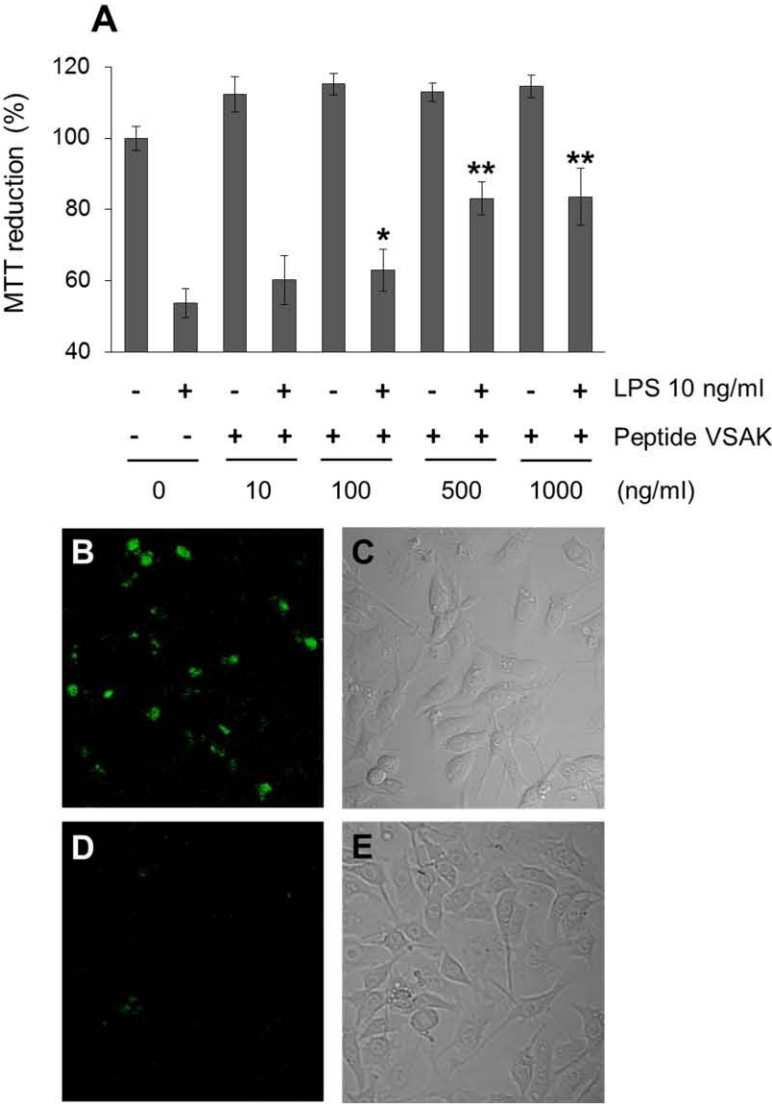


Figure 10

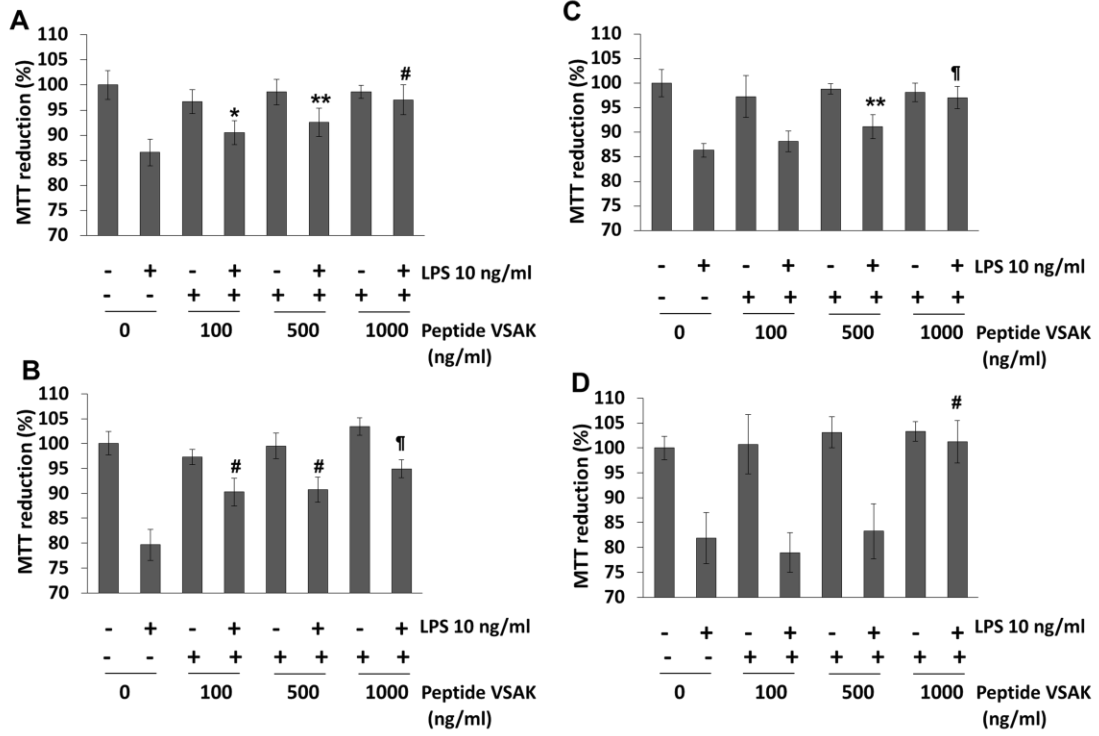


Figure 11

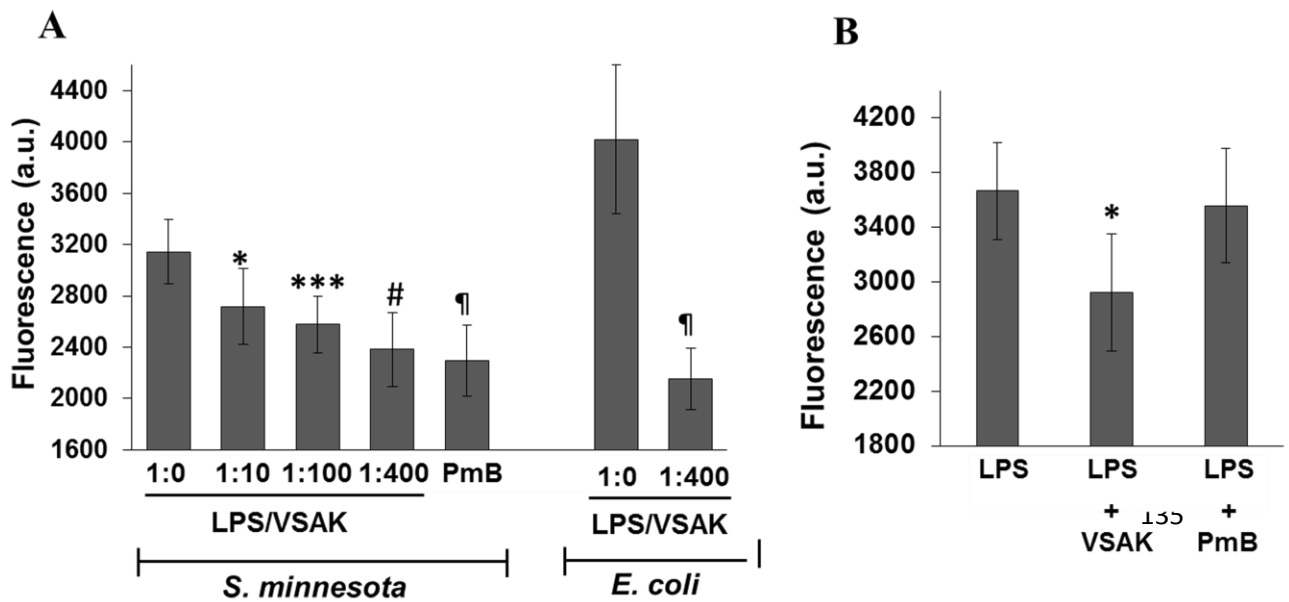


Figure 12

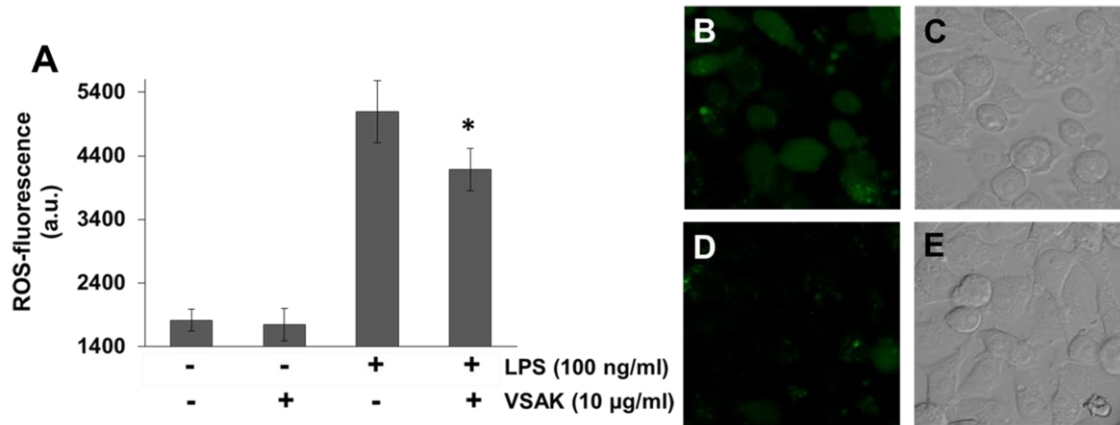


Figure 13

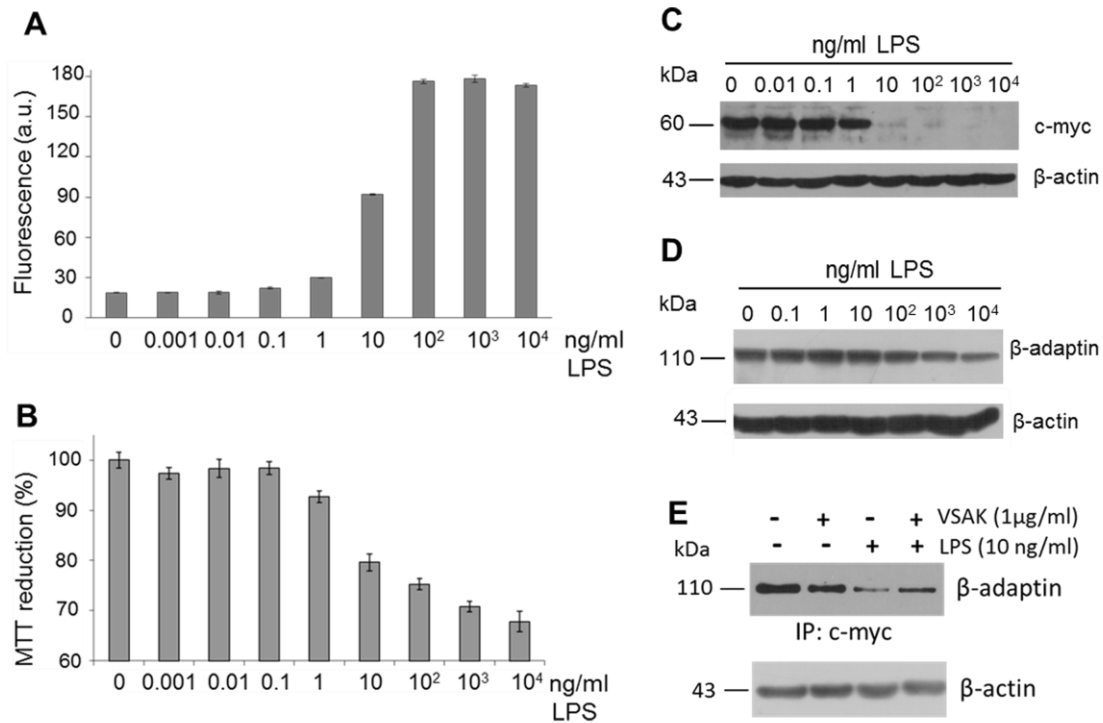
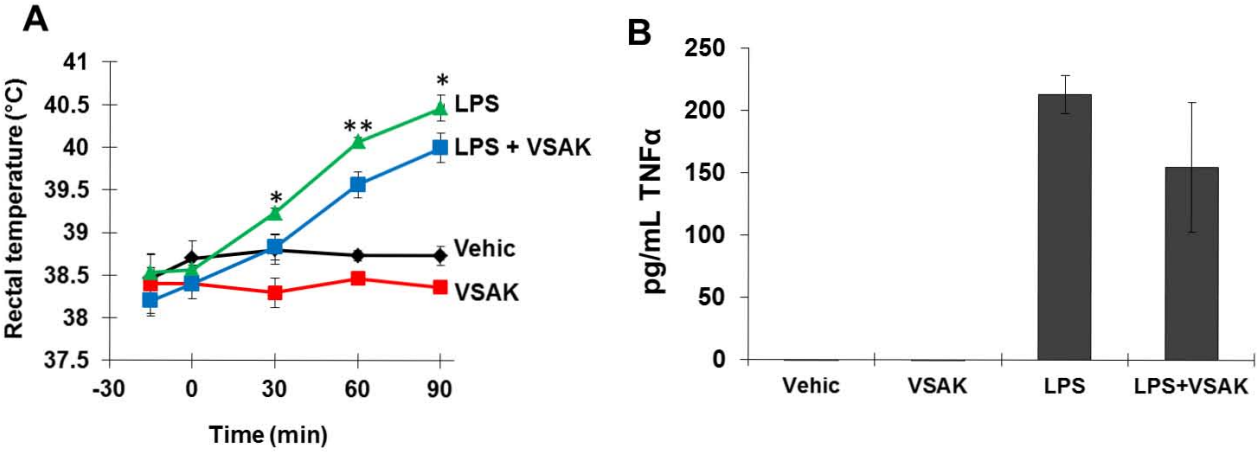


Figure 14



11. PATENTE

PCT/MX2014/000087

PÉPTIDOS DERIVADOS DEL DOMINIO C-TERMINAL DE CETPI COMO MOLÉCULAS BLOQUEADORAS DEL EFECTO CITOTÓXICO INDUCIDO POR LIPOPOLISACÁRIDOS EN SEPTICEMIA Y CHOQUE SÉPTICO.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Campo de la invención:

La presente invención se relaciona con el diseño y uso de péptidos derivados del dominio C-terminal de CETPI como moléculas bloqueadoras del efecto citotóxico inducido por lipopolisacáridos, para formular un medicamento para el tratamiento de la septicemia y choque séptico causado por bacterias Gram-negativas.

PCT

PETITORIO

El abajo firmante pide que la presente solicitud internacional sea tramitada con arreglo al Tratado de Cooperación en materia de Patentes.

Formulario de la Oficina nacional receptiva	
MEX/INT 2013 / 000078	
Solicitud Internacional N°	
(26-06-2013) 26 JUN. 2013	
Fecha de presentación internacional	
SOLICITUD INTERNACIONAL PCT E.O.MX	
Número de solicitud internacional	
Evaluación al momento del depósito o del depósito (en caso de depósito) / (en caso de depósito, 12 meses)	

Resumen N° I TÍTULO DE LA INVENCIÓN	
VACUNA DE APLICACIÓN NASAL CONTRA EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD ATROSCLERÓTICA Y EL HIGADO GRASO	
Resumen N° II SOLICITANTE <input type="checkbox"/> Esta persona también es inventor.	
Nombre y dirección (incluido según sea posible el número de una oficina postal) de la dirección oficial receptiva. No se debe incluir el número del código postal ni el código de dirección postal de la dirección receptiva en una solicitud que se presente al depósito de una patente internacional o al depósito de una patente en un país de destino.	
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO 9º Piso de la Torre de Rectoría, Ciudad Universitaria S/N, C.P. 04510 Distrito Federal MX	
N° de teléfono (52+55) 56 22 63 29	
N° de fax (52+55) 56 55 48 44	
N° de registro del solicitante en México	
Autorización a utilizar el nombre. Al presentar una solicitud que figura el nombre de la Oficina receptiva, la Oficina receptiva de la Oficina internacional y la Administración de Patentes de México, el solicitante autoriza a la Oficina receptiva de la Oficina internacional y a la Administración de Patentes de México a utilizar el nombre del solicitante en las publicaciones de la Oficina receptiva, de la Oficina internacional y de la Oficina receptiva de la Oficina internacional, así como en el expediente de la solicitud.	
<input type="checkbox"/> como propietario de los derechos exclusivos de la invención en el país de destino <input type="checkbox"/> por otros derechos exclusivamente (no se controla ningún territorio en papel).	
País de nacionalidad (según los Estados)	
MX	
País de nacionalidad (según el país)	
MX	
Esta persona es el/la inventor/a: <input checked="" type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No. Si no, indicar en el expediente de la solicitud.	
Resumen N° III OTROS SOLICITANTES Y/O OTROS INVENTORES	
<input checked="" type="checkbox"/> Los demás solicitantes y/o demás inventores se indican en las hojas de continuación.	
Resumen N° IV MANDATARIO O REPRESENTANTE COMÚN, O DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA	
La persona designada para recibir comunicación por correo en nombre del/los solicitante/s o inventor/es en el expediente de la solicitud internacional que se presenta al depósito de una patente internacional o al depósito de una patente en un país de destino.	
<input checked="" type="checkbox"/> mandatario <input type="checkbox"/> representante común.	
Nombre y dirección (incluido según sea posible el número de una oficina postal, la dirección oficial receptiva y el número del país) de la dirección para el representante común.	
FIGUEROA PÉREZ, Martha Edificio B, 3er Piso, Zona Cultural Ciudad Universitaria, C.P. 04510 Distrito Federal MX	
N° de teléfono (52+55) 56 22 63 29	
N° de fax (52+55) 56 55 48 44	
N° de registro del solicitante en México	
Autorización a utilizar el nombre. Al presentar una solicitud que figura el nombre de la Oficina receptiva, la Oficina receptiva de la Oficina internacional y la Administración de Patentes de México, el solicitante autoriza a la Oficina receptiva de la Oficina internacional y a la Administración de Patentes de México a utilizar el nombre del solicitante en las publicaciones de la Oficina receptiva, de la Oficina internacional y de la Oficina receptiva de la Oficina internacional, así como en el expediente de la solicitud.	
<input checked="" type="checkbox"/> como propietario de los derechos exclusivos de la invención en el país de destino <input type="checkbox"/> por otros derechos exclusivamente (no se controla ningún territorio en papel).	
Dirección de correo electrónico: martha@unam.mx	
<input type="checkbox"/> Dirección para la correspondencia: Indique una dirección postal que proporcione la mejor manera de recibir comunicación por correo y el número de correo electrónico si se desea proporcionar una dirección postal.	

Formulario PCT/INT/11 (Guía de Hojas) / 6 de septiembre de 2012

Ver las Normas al depositar la solicitud

Recurso N° 02 OTROS(S) SOLICITANTE(S) Y/O OTROS(S) INVENTORES:	
Si se ha de utilizar ninguno de estos antecedentes, esta hoja no debe ser incluida en el recurso.	
Nombre y dirección (pública) según el estado, en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección debe figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recurso es el Estado de domicilio del solicitante o de la persona que debe recibir el Estado de domicilio del solicitante. MAS O IVA, Jalma Laja 103 Colonia Jardines del Pedregal, C.P. 01900 Distrito Federal MX	Esta persona es: <input type="checkbox"/> solicitante titular <input type="checkbox"/> solicitante e inventor <input checked="" type="checkbox"/> inventor independiente (si se conoce esta condición, se debe indicar la que aplica). N° de registro del solicitante en la Oficina:
Estado de nacionalidad (según del Estado):	Estado de domicilio (según del Estado):
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	
Nombre y dirección (pública) según el estado, en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección debe figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recurso es el Estado de domicilio del solicitante o de la persona que debe recibir el Estado de domicilio del solicitante. DELGADO COELLO, Blanca Alicia 1er Cerrada de Flor Silvestre No. 3, Casa 1° Colonia San Andrés Totoltepec, C.P. 14400 Distrito Federal MX	Esta persona es: <input type="checkbox"/> solicitante titular <input type="checkbox"/> solicitante e inventor <input checked="" type="checkbox"/> inventor independiente (si se conoce esta condición, se debe indicar la que aplica). N° de registro del solicitante en la Oficina:
Estado de nacionalidad (según del Estado):	Estado de domicilio (según del Estado):
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	
Nombre y dirección (pública) según el estado, en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección debe figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recurso es el Estado de domicilio del solicitante o de la persona que debe recibir el Estado de domicilio del solicitante. GARCIA GONZALEZ, Victor Guadalupe Alvaro Obregon No. 118 San Luis Mexitacco, C.P. 51355 Estado de México MX	Esta persona es: <input type="checkbox"/> solicitante titular <input type="checkbox"/> solicitante e inventor <input checked="" type="checkbox"/> inventor independiente (si se conoce esta condición, se debe indicar la que aplica). N° de registro del solicitante en la Oficina:
Estado de nacionalidad (según del Estado):	Estado de domicilio (según del Estado):
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	
Nombre y dirección (pública) según el estado, en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección debe figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recurso es el Estado de domicilio del solicitante o de la persona que debe recibir el Estado de domicilio del solicitante. PEREZ TORRES, Armando Nezaxa 108, B40° Colonia Purlales, C.P. 03300 Distrito Federal MX	Esta persona es: <input type="checkbox"/> solicitante titular <input type="checkbox"/> solicitante e inventor <input checked="" type="checkbox"/> inventor independiente (si se conoce esta condición, se debe indicar la que aplica). N° de registro del solicitante en la Oficina:
Estado de nacionalidad (según del Estado):	Estado de domicilio (según del Estado):
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	
<input type="checkbox"/> Los demás solicitantes y/o (inventores) se indican en otra hoja de confirmación	

Formulario N.º V DESIGNACIONES

Según la Regla 9.2a) la presentación de un pedido constituye la designación de todos los Estados, con excepción de aquellos que se designan por el PCT en la forma de presentación internacional, a menos que el diseño de notificación disponiera o permita otra cosa, de lo contrario, tanto el patrón regional, se como se aplicará automáticamente.

Si embargo:

DE Alemania no se designa para ningún tipo de protección nacional

JP Japón no se designa para ningún tipo de protección nacional

KR República de Corea no se designa para ningún tipo de protección nacional

Se puede solicitar un pedido de prioridad para cualquier tipo de designación en cuestión, a condición de que la solicitud internacional, en la fecha de presentación o retroactivamente según la Regla 9.2a) (1), contenga en el Documento Nº PCT la prioridad de una solicitud anterior al estado presentada en el diseño de notificación para estos que, en el caso de las solicitudes, sepan los efectos de esta solicitud anterior.

Recuadro N.º VI REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD Y DOCUMENTO DE PRIORIDAD

Se reivindica la prioridad de las siguientes solicitudes anteriores:

Fecha de presentación de la solicitud anterior (Anexo 2001)	Número de la solicitud anterior	Si la solicitud anterior es:		
		oficial que cual país o entidades de la OMC	oficial regional Oficina regional	oficial internacional Oficina regional
Punto (1) 25 Junio 2012 (25-06-2012)	MX/2012/037662	MEX		
Punto (2)				
Punto (3)				

En el presente suplemento a se incluyen reivindicaciones de prioridad adicionales

Presentación del (de los) documento(s) de prioridad:

Se pide a la Oficina receptora que proporcione y presente la Oficina Internacional una copia certificada de la o las solicitud(es) anterior(es) presentada(s) en el país (países) en cuestión con el número de la Oficina que, a las fines acordados en el Anexo 2001, se le Oficina receptora, indicando entre otros:

todos los puntos Punto (1) Punto (2) Punto (3) todos los documentos que se refieren

Se pide a la Oficina Internacional que obtenga en una Oficina Estatal una copia certificada de la o las solicitudes anterior(es) indicando entre, entre el código o los números de acceso, si los hay, indicados a continuación de la Oficina Internacional que se accede a uno o más de los datos anteriores en sus Archivos Regionales

Punto (1) código de acceso _____ Punto (2) código de acceso _____ Punto (3) código de acceso _____ otros, ver formulario suplementario

Reivindicar el derecho de prioridad: Se solicita a la Oficina receptora que presente el derecho de prioridad respecto a las solicitudes anteriores, indicando(s) más arriba o en el formulario suplementario como punto(s): (_____) (Si se reivindica la fecha del Documento Nº PCT, se debe indicar una vez más arriba que aparece la prioridad de conformidad del Anexo 2001).

Incorporación por referencia: Cuando en el momento de la presentación, la solicitud anteriorizada en el Anexo 11 (IBID) o (C) o una parte de la solicitud, de las solicitudes o de un diseño manuscrito en la Regla 20.5 al no ser conocido en otro lugar en esta solicitud internacional) que figura íntegramente en una solicitud anterior cuya prioridad se reivindica en la fecha en que una o varias solicitudes anteriores en el Anexo 11 (1) (2), se incorporan inicialmente por la Oficina receptora, una solicitud o una parte o partes de la misma se confirmará según la Regla 20.6, se incorporará posteriormente en esta solicitud internacional a los efectos de la Regla 20.5.

Recuadro N.º VII ADMINISTRACIÓN ENCARGADA DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL

El titular de la Administración encargada de la Búsqueda Internacional garantiza que los datos de identificación de la búsqueda anterior en el presente formulario son correctos y completos para efectos de la búsqueda internacional, tal como se indica en la información siguiente, se puede añadir el código de la Oficina:

USA / ES

Resumen N° IX LISTA DE VALIDACIÓN para las presentaciones en PAPIE - 199, 20 & 42 aplicas en formato para las solicitudes internacionales presentadas en PAPIE			
La presente solicitud internacional contiene lo siguiente:	Número de hojas	La presente solicitud internacional va acompañada de (con) siguiente(s) documento(s) (marcar las casillas que correspondan) entre otros la columna de la derecha al número de cada documento:	Número de documentos
a) solitario (PCT/RO/11)		1. <input type="checkbox"/> hoja de estado de cosas	
(incluidas las hojas de descripción y reclamos)	4	2. <input type="checkbox"/> poder separado original	
b) descripción (proporcionada a parte de la descripción reservada a la lista de reclamos)	48	3. <input type="checkbox"/> poder general original	
c) reivindicaciones	3	4. <input type="checkbox"/> copia del poder general (forma de reclamación)	
d) resumen	1	5. <input type="checkbox"/> declaración de prioridad (distintivo) en el formato N° VI como parte o anexo	
e) dibujos (en su caso)	3	6. <input type="checkbox"/> declaración de la solicitud internacional (distintivo)	
f) parte de la descripción reservada a la lista de reclamos (en su caso)	1	7. <input type="checkbox"/> indicaciones referentes relativas a marcas y nombres depositados o a otros material "noting"	
		8. <input type="checkbox"/> copia en formato electrónico (Anexo "VII" de formato "xml") en 1 copia en la lista de presentaciones que de forma separada a solicitud internacional, entregada inicialmente a los fines de la búsqueda internacional en relación a Regla 17bis (1) del Reglamento y el artículo 5, parágrafo Especial	
Número total de hojas:	66	9. <input type="checkbox"/> una declaración confirmatoria que "la información registrada en formato electrónico en virtud de la Regla 17bis del Reglamento y el artículo 5 del mismo se presentará por medio de medios electrónicos"	
		10. <input type="checkbox"/> copia en formato electrónico, búsqueda preliminar (Regla 17bis (1) d)	
		11. <input type="checkbox"/> otros (especificar)	
Figura de las Hojas del documento al receptor:	Fig. 12	Idioma de presentación de la solicitud internacional:	Español
Resumen N° X FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL MANIPULARIO O DEL REPRESENTANTE COMÚN Junto a cada firma, indicar el nombre del presentador y la capacidad en un idioma que sea el preferido.			
 FIGUEROA PÉREZ Martha Manipuladora			
Firma en la Oficina Internacional de Ginebra			
1. Fecha efectiva de recepción de la presente solicitud internacional:	(26-06-2013) 28 JUN. 2013	2. Hojas:	<input type="checkbox"/> electrónicas
3. Fecha efectiva de recepción, realizada en caso de recepción ulterior, para el caso de peticiones, no documentadas o de dibujos que completen la presente solicitud internacional:			<input type="checkbox"/> en papel
4. Fecha de recepción, dentro de plazo, de las reivindicaciones reservadas según el Artículo 1.13 del PCT:			
5. Administración responsable de la búsqueda internacional, especificada por el solicitante: ISA/		6. <input type="checkbox"/> Entregado en la copia por la búsqueda, el fondo base, que no pagó la tasa de búsqueda.	
Firma en la Oficina Internacional de Ginebra			
Fecha de recepción del receptor del PAPIE por la Oficina Internacional:			

12. ANEXOS

12.1 Esquema para la secuenciación de pIRESpuro3-CETP

ctggcttatgaaattaatacgaactcactatagggagaccaagcttggtagcagctcggatcgatatctcggcctagctagcgcttaagg
cctgttaaccggctgtagctctccggattcgAATTC(ATGCTGGCTGCTACTGTCT)GACTCTGGCACTGCTGGGTAACGC
TCACGCCTGTCCAAAAGGGGCTTCTACGAGGCTGGGATTGTGTGCCGCATCACCAAGCCAGCTCTGCTGG
TGCTGAACCAGGAGACTGCAAAAGTGGTCCAGACCCTTTTCAGCGAGCTGGGTACCCCGATGTCTCCGGT
GAACGAGCAGTGATGCTGCTGGGGCGTGTCAAGTATGGTCTGCACAATCTGCAGATCTCACATCTGTCCAT
TGCTCCAGCCAGGTCGAGCTGGTGGATGCCAAGACCATTGACGTGGCTATCCAGAACGTGAGCGTGGTCT
TTAAAGGCACACTGAATTACAGCTATACTTCTGCTGGGGCCTGGGAATCAACCAGTCTGTGGACTTCGAGA
TTGATAGTGCCATCGACCTGCAGATTAACACAGAAGTACTGCGATGCTGGATCTGTGCGAACAAATGCA
CCCGACTGTTACCTGGCCTTCCACAAGCTGCTGCTGCATCTGCAGGGCGAGCGTGAACCTGGATGGCTGAA
ACAGCTGTTACCAACTTTATCAGCTTCACTGAA(GCTGATTCTGAAAAGACAGG)TGTGCAACGAGATCAA
TACAATCTTAACATCATGGCTGATTTCTGTCAGACTCGCGCCGCTAGTATCCTGTGACAGCGGGGATATCGG
TGTCGACATTTCCGTGACTGGGGCACCTGTGATTACTGCCACCTACCTGGAGAGCCACCATAAGGGTCACTT
CACCCATAAAAAAGTGTCTGAAGCTTTTCCACTGCGAGCATTCCCCCTGGCCTGCTGGGAGATTCCCGTAT
GCTGATTTTCTGGTTTTCCGACCAGGTGCTGAATAGCCTGGCAAGGGCAGCATTTCAGGAGGGCCGGCTGG
TGCTGTCCCTGACAGGAGATGAGTTCAAGAAAGTCTGGAAACCCAGGGCTTTGACACAAACCAGGAGATC
TTCCAGGAAGTGAAGTGGGGCCTGCCTACTGGACAGGCACAGGTGCGCCGTGCACTGCCTGAAGGTGCCAA
AAATCTTTGTGAGAATCGGGGGTGGTCTGTCTAGTTGATGCTGTGACTTTTCAGGTTTCCACGGCCCCG
ATGGCAGAGAGGCTGTGGCATACCGCTTTGAGGAAGACATCATTACCACAGTCCAGGCCTCATATTTCCAG
AAGAAAC(TGTTTCTGCATCTGCTGGAC)TTCCAGTGCCTGCCAGCATCAGGAAGGGCAGGTTCCCTCCGCCAA
CCTGTCCGTGGCTGCGGACTGAAGCCAAGGCTGTGAGCAATCTGACCGAGAGCAGATCTGAAAGTCTGC
AGTCTAGTCTGCGCAGTCTGATCGCCACCGTCCGCAATCCCGAAGTGTGCAAGACTGGAAGTGGCTTTTA
CAGCACTGATGAACTCCAAGGGCCT(GGATCTGTTTCGAGATCATT)ATCCTGAAATCATTACACTGGACGGAT
GTCTGCTGCTGCAGATGGACTTCGGGTTCCAAAACACCTGCTGGTTCGATTTCCTGCAGAGCCTGTCATAGG
gatccgcccgcgatagataactgatccagtgctggaattaattcgtgctgagggccagctgttggggtgagtactcctctcaaaa
gcgggcatgactctgctgaagattgtagtttcaaaaaagaggagattgatattcacctggcccgggtgatcctttgagggtggcgg
cgtccatctggtcagaaaagacaatctttttgttcaagcttgaggtgagcagctgagatctggccatacactgagtgacaatgacatc
cacttgctttctctccacaggtgtccactcccaggtccaactgagctcagcatctagggcggccaattccgcccctctccctcccc
ccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgctgttctctatgtgattttccacatattgcttctttggcaatgtg
agggcccggaaacctggccctgtctttgacgagcattctaggggtcttcccctctgccaaggaaatgcaaggtctgttgatgtcgtga

Oligonucleótido T7 (F)

Oligonucleótido 5608 (F)

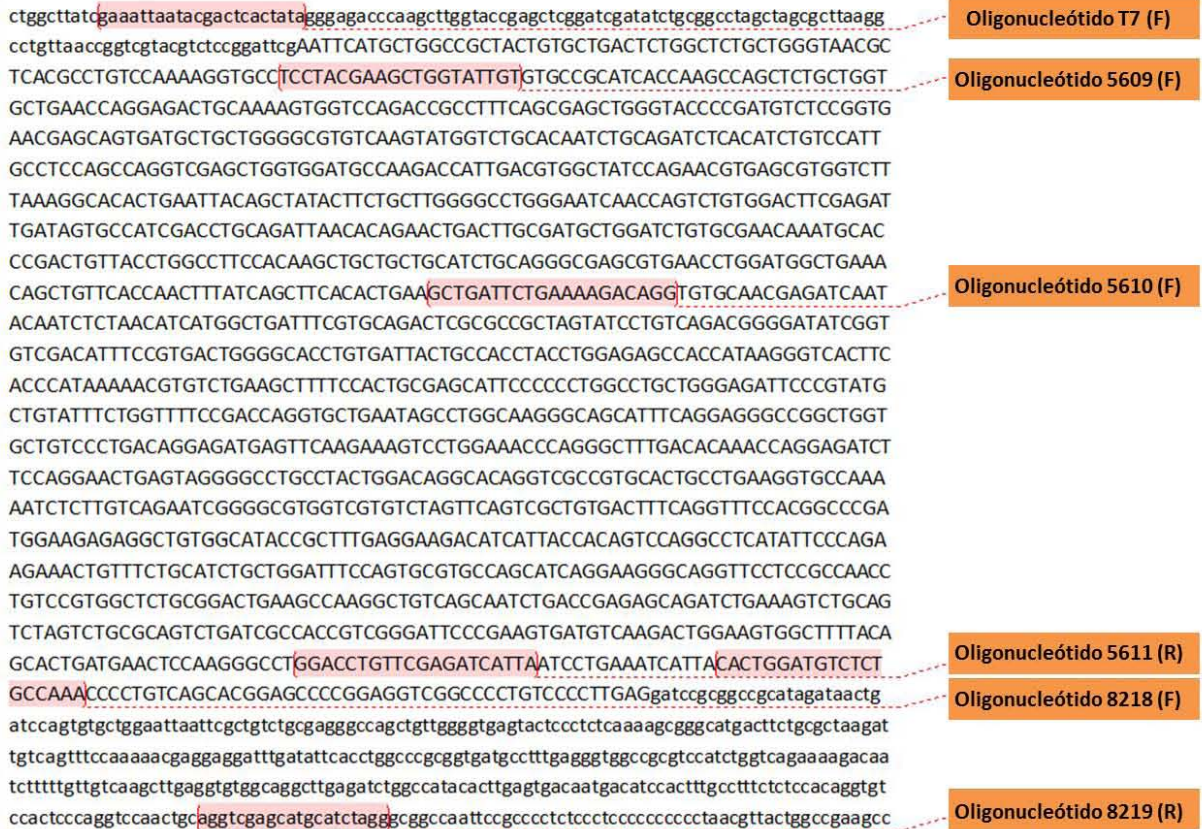
Oligonucleótido 5610 (F)

Oligonucleótido 8216 (F)

Oligonucleótido 5611 (R)

Oligonucleótido 8217 (R)

12.2 Esquema para la secuenciación de pIRESpuro3-CETPI



12.3 Tabla de oligonucleótidos

Clave interna	Clave IBT	Secuencia	Contenido C+G (%)	Tm°C
M13F(-20)	OLIGO: 5606	5'->3': GTAAAACGACGGCCAG	56.25	50.00
CETPr1F	OLIGO: 5608	5'->3': ATGCTGGCTGCTACTGTC	55.55	56.00
CETPi F73	OLIGO: 5609	5'->3': TCCTACGAAGCTGGTATTGT	45.00	58.00
CETPri F585	OLIGO: 5610	5'->3': GCTGATTCTGAAAAGACAGG	45.00	58.00
CETPri R1450	OLIGO: 5611	5'->3': TAATGATCTCGAACAGGTCC	45.00	58.00
T7 Forward	OLIGO: 313	5'->3': TAATACGACTCACTATAGGG	40.00	56.00
CETPr 2169F	OLIGO:8216	5'->3': TGTTTCTGCATCTGCTGGAC	50.00	60.00
CETPr 2824R	OLIGO:8217	5'->3': ACCTGTGGAGAGAAAAGGCAA	50.00	60.00
CETPi 2436F	OLIGO:8218	5'->3': CACTGGATGTCTCTGCCAAA	50.00	60.00
CETPi 2848R	OLIGO:8219	5'->3': CCTAGATGCATGCTCGACCT	55.00	62.00

12.4 Digestión con enzimas KpnI y EcoRV

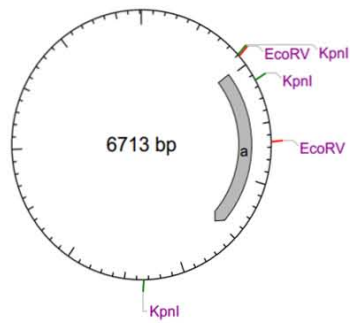
Reacción con enzimas de restricción

Posición dentro de la secuencia

pIRESpuro3: 1-971

CETP: 972-2519

pIRESpuro3: 2520-6713



Coordenadas KpnI	Longitud (pb)
3341-899	4272
1148-3340	2193
900-1147	248

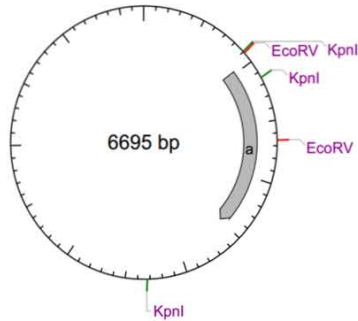
Coordenadas EcoRV	Longitud (pb)
1658-914	5970
915-1657	743

Posición dentro de la secuencia

pIRESpuro3: 1-971

CETPI: 972-2501

pIRESpuro3: 2502-6695



Coordenadas KpnI	Longitud (pb)
3323-899	4272
1148-3322	2175
900-1147	248

Coordenadas EcoRV	Longitud (pb)
1658-914	5952
915-1657	743