



BIOTOX

Toxinas para la Biomedicina
Red CYTED.212RT0467



CYTED

CIENCIA Y TECNOLOGIA PARA EL DESARROLLO

TEMAS SELECCIONADOS DE TOXINAS CON IMPLICACIONES BIOMÉDICAS Y MÉTODOS PARA SU ESTUDIO

UTILIDAD DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS EN ESTUDIOS DE ESTRUCTURA-FUNCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE EPITOPOS EN TOXINAS

Bruno Lomonte

Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología,
Universidad de Costa Rica, San José 11501, Costa Rica
e-mail: bruno.lomonte@ucr.ac.cr

RESUMEN

Los péptidos sintéticos han ganado un lugar relevante dentro de la “caja de herramientas” de la investigación bio-médica actual. Las técnicas de síntesis automatizada y el costo decreciente de los procesos, unidas a mejoras en su eficiencia y velocidad, hacen cada vez más accesibles a estas herramientas. Su aplicabilidad es muy amplia, desde la generación de moléculas farmacológicamente activas, hasta el desarrollo de vacunas, por ejemplo. En este resumen se presentan algunos ejemplos de las aplicaciones de péptidos sintéticos en el estudio de las fosfolipasas A2 miotóxicas, un grupo de proteínas responsables de la necrosis del tejido muscular que ocurre frecuentemente en los envenenamientos causados por serpientes de la familia Viperidae

INTRODUCCIÓN

Vincent Duvigneaud y colaboradores lograron sintetizar, en 1953, una pequeña hormona peptídica: el nonapéptido oxitocina. Tras un arduo trabajo de muchos meses con un equipo de expertos en síntesis orgánica, este avance fue reconocido en 1955 con el Premio Nobel de Química. En comparación, gracias a los avances que siguieron en las estrategias de síntesis de péptidos, esta meta ya se podía lograr en apenas unas horas de trabajo para la década de 1990. Como bien escribía el visionario novelista Jules Verne (1828-1905),

“...aquello que hoy puede catalogarse de fantástico, será lo cotidiano del mañana... es solo una cuestión de tiempo”.

Bruce Merrifield, otro galardonado con el Nobel de Química (1986), sentó las bases para la síntesis de péptidos moderna, al desarrollar métodos para efectuar las reacciones de acople secuencial de aminoácidos unidos a una fase sólida, junto con la introducción de diversas estrategias de protección de las cadenas laterales. La longitud de los péptidos sintetizados ha ido superando límites cada vez mayores, lográndose - por ejemplo - producir la fosfolipasa A2 humana (grupo IIA), de 124 aminoácidos, mediante la unión de dos segmentos sintéticos de 51 y 53 residuos (Hackeng et al., 1997).

El presente resumen presenta algunos ejemplos de las aplicaciones de péptidos sintéticos en el estudio de las fosfolipasas A2 miotóxicas, un grupo de proteínas responsables de la necrosis del tejido muscular que ocurre frecuentemente en los envenenamientos causados por serpientes de la familia Viperidae (Gutiérrez y Lomonte, 1995; Montecucco et al., 2008; Lomonte y Gutiérrez, 2011).

UTILIDAD DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS

Los péptidos sintéticos constituyen en la actualidad una herramienta muy útil en la investigación biomédica, con aplicabilidad en (a) la construcción de moléculas farmacológicamente activas, (b) el estudio de las relaciones estructura-función de proteínas, (c) la generación de anticuerpos contra sitios predeterminados de un antígeno proteico, (d) la identificación de epitopos lineales para linfocitos B y T en proteínas, (e) el desarrollo de vacunas, o (f) el refinamiento de pruebas de utilidad diagnóstica, entre muchos otros fines. En ciertos casos, la bioactividad de una proteína logra ser reproducida mediante un pequeño segmento, el cual puede ser sintetizado con relativa facilidad y eficiencia, a un costo cada vez más accesible.

PÉPTIDOS SINTÉTICOS EN EL ESTUDIO

DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE MIOTOXINAS

En un ejemplo de nuestra propia experiencia, las actividades biológicas de una familia de miotoxinas presente en los venenos de muchas especies de serpientes de la familia Viperidae, denominadas “fosfolipasas A2 tipo Lys49”, pueden ser reproducidos por un segmento de apenas 13 aminoácidos, ubicados cerca de su extremo carboxilo-terminal (secuencia 115-129, en la nomenclatura convencional de Renetseder et al. [1985]). Estos péptidos C-terminales de las miotoxinas Lys49 son capaces de inducir citotoxicidad y actividad bactericida in vitro, así como mionecrosis y edema en animales de experimentación (Lomonte et al., 1994, 2003a, 2003b; Calderón y Lomonte, 1998; Páramo et al., 1998; Núñez et al., 2001; Angulo y Lomonte, 2005; Lomonte y Rangel, 2012). Lo anterior ha servido de base para proponer que el mecanismo de toxicidad de estas proteínas, que poseen estructura de fosfolipasa A2, pero que carecen de actividad catalítica, se basa en la existencia de un sitio bioactivo que comprende los aminoácidos 115-129 (Figura 1), el cual es capaz de interactuar con membranas y desestabilizarlas (Lomonte et al., 1994; Lomonte y Rangel, 2012).

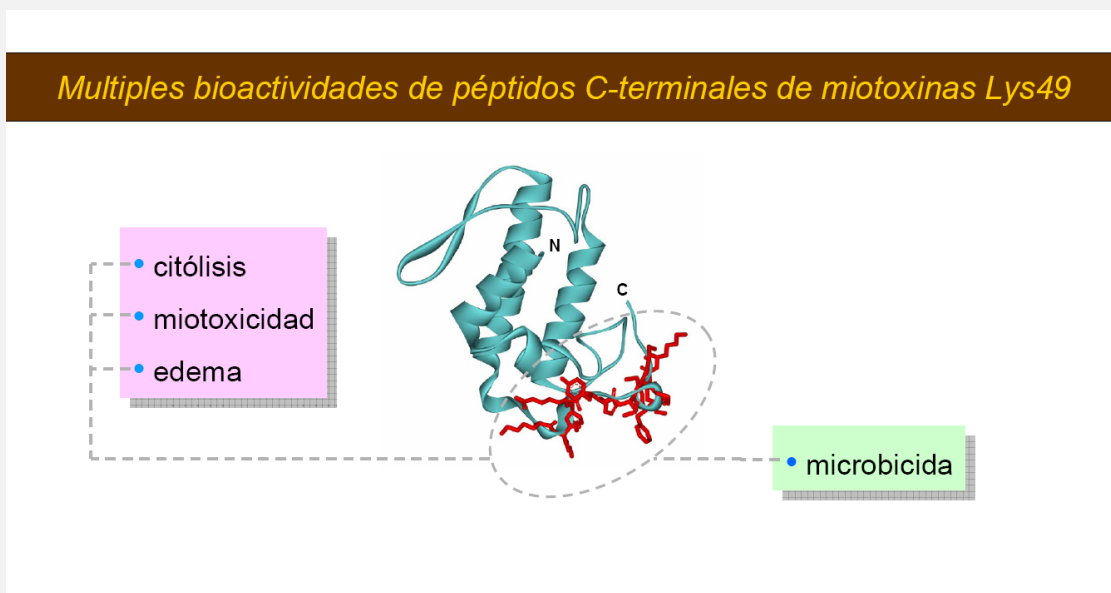


Figura 1: Las diversas actividades biológicas de muchas miotoxinas tipo Lys49 (variantes catalíticamente inactivas de fosfolipasa A2) pueden ser reproducidas empleando un segmento (115-129) de su región C-terminal (señalado en rojo), en la forma de péptido sintético.

A través del uso de péptidos sintéticos, también se ha podido ubicar el sitio de las miotoxinas tipo-Lys49 que media su fuerte interacción con el receptor 2 para el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF-R2), con una constante de disociación (K_d) en el orden de los 5×10^{-9} M (Yamazaki et al., 2005; Fujisawa et al., 2008). Al igual que las bioactividades anteriormente mencionadas, la unión a este receptor celular depende del segmento C-terminal 115-129 (Figura 2), cuyo péptido sintético interactúa con una afinidad nanomolar en ensayos de unión realizados mediante análisis de resonancia de plasmones de superficie (SPR) en BIAcore®.

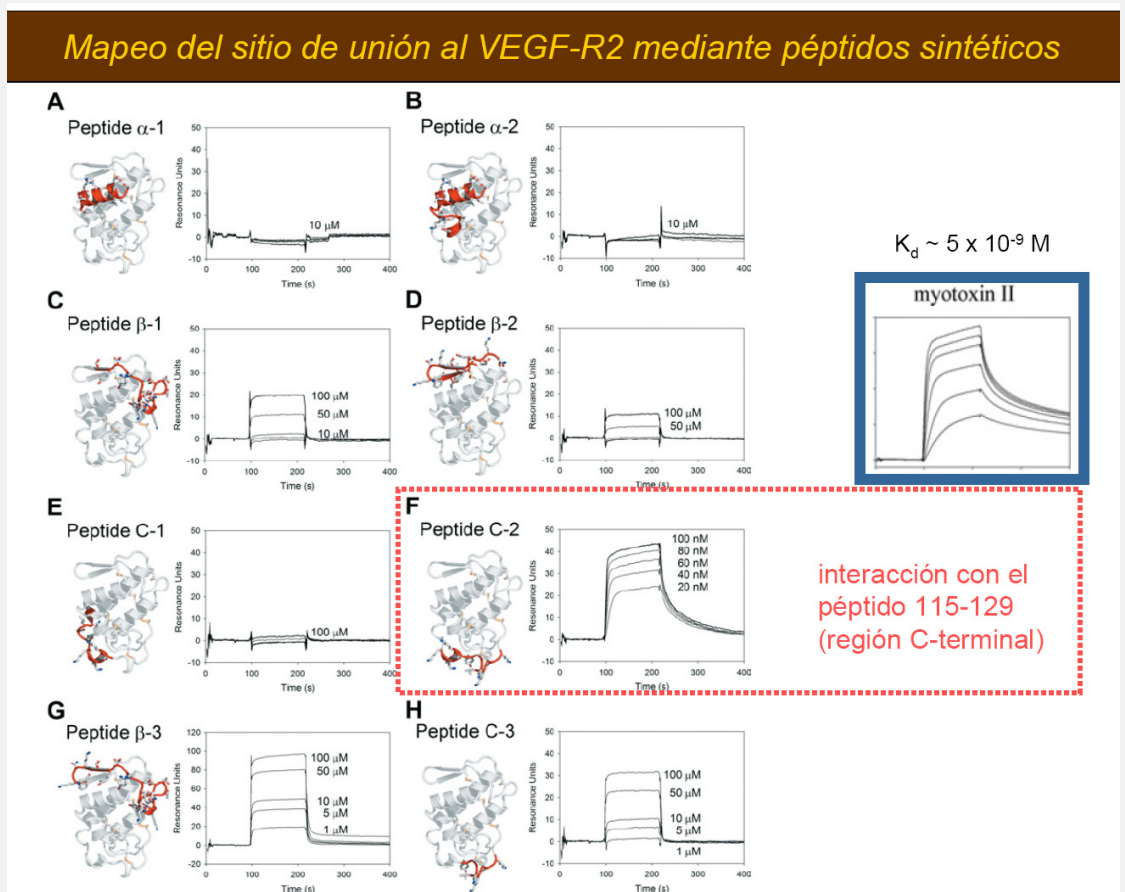


Figura 2: Evaluación de la interacción de diversos péptidos sintéticos que cubren la secuencia completa de aminoácidos de la miotoxina II de *Bothrops asper* de Costa Rica (paneles A-H) con el receptor VEGF-R2 inmovilizado sobre un chip de BIAcore®. El péptido 115-129 (panel F) reproduce la interacción que se observa al utilizar la toxina completa (recuadro inserto a la derecha). Adaptado de Fujisawa et al. (2008).

PÉPTIDOS SINTÉTICOS PARA GENERAR ANTICUERPOS HACIA SITIOS PREDETERMINADOS DE MIOTOXINAS

Mediante la inmunización de animales de experimentación con péptidos sintéticos que corresponden a segmentos particulares de un antígeno proteico (y acoplados covalentemente a una proteína inmunogénica que actúe como transportador), es posible obtener anticuerpos hacia sitios predeterminados del antígeno. Pese a su naturaleza policlonal, estos anticuerpos van a poseer una especificidad restringida, predefinida por el péptido empleado durante la inmunización. En ocasiones, tales anticuerpos son capaces de reconocer al epitopo correspondiente de la proteína completa en su estado nativo, lo cual los convierte en una herramienta muy útil para su caracterización inmunoquímica y funcional.

En el caso de la miotoxina II (Lys49) de *Bothrops asper*, se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos contra su segmento C-terminal 115-129 son capaces de reconocerla y neutralizar su acción lítica sobre células en cultivo, así como su acción miotóxica en animales (Calderón y Lomonte, 1998), en concordancia con el modelo que propone que este sitio es crucial para la toxicidad de las miotoxinas tipo Lys49. Además, se ha explorado el potencial del péptido sintético 115-129 como inmunógeno para la generación de anticuerpos que protejan de la mionecrosis causada por la miotoxina II, en un modelo de ratón. Dicho péptido sintético, acoplado al toxoide diftérico en una proporción molar de 3:1, indujo en los ratones inmunizados una protección cercana al 50% en términos de necrosis de fibras musculares, en comparación con el grupo de animales no inmunizados, luego de someter ambos grupos a la inyección intramuscular de una dosis de reto de la miotoxina (Calderón y Lomonte, 1999). Aunque la protección inducida mediante la inmunización con miotoxina completa fue superior a la observada al inmunizar con el péptido sintético de la región C-terminal, el estudio demostró en principio que es posible reducir el daño tisular ocasionado por miotoxinas, empleando como inmunógeno apenas un corto segmento sintético de su estructura.

Las actuales facilidades para la síntesis de péptidos y su costo decreciente hacen atractiva la opción de considerar a los péptidos sintéticos como potenciales inmunógenos, con aplicabilidad en la inducción de anticuerpos neutralizantes contra diversos tipos de toxinas de importancia médica.

PÉPTIDOS SINTÉTICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE EPITOPOS LINEALES EN MIOTOXINAS

Los epitopos, o sitios de un antígeno que son reconocidos por el sistema inmune adaptativo (B y T) de un individuo que es expuesto a él, pueden clasificarse en dos grupos generales. Unos, denominados secuenciales, lineales, o continuos, están formados por aminoácidos contiguos en la secuencia, en el caso de las proteínas. Los otros, llamados discontinuos o conformacionales, se forman por la yuxtaposición de aminoácidos que no son contiguos en la estructura primaria, pero que se aproximan entre sí gracias a los plegamientos que conforman la estructura secundaria y terciaria (o cuaternaria) de las proteínas. Aunque estos últimos epitopos son difíciles de reproducir empleando péptidos sintéticos, los epitopos lineales son fácilmente representables mediante esta estrategia.

Con la finalidad de ubicar cuáles son las regiones lineales de una proteína que el sistema inmune adaptativo humoral de un individuo reconoce, es posible preparar una colección de péptidos traslapados, que cubran la secuencia completa del antígeno, y enfrentarlos, mediante algún tipo de prueba inmunológica, contra el suero del individuo (o individuos) inmunizado. Esta estrategia de análisis provee información relevante para comprender las características moleculares de la respuesta de anticuerpos contra una determinada proteína inmunogénica, lo cual posee gran relevancia en el caso de toxinas, dado que la generación y administración de anticuerpos neutralizantes es la piedra angular para la terapia de muchos tipos de envenenamientos.

La miotoxina II de *Bothrops asper* ha sido recientemente estudiada mediante esta estrategia, con el fin de identificar cuáles son sus principales epitopos lineales reconocidos por anticuerpos en una respuesta inmune. Para ello se evaluó el reconocimiento por parte de animales inmunizados con la toxina purificada, empleando conejos, así como el reconocimiento por parte de los equinos que son sometidos a inmunización con venenos completos (incluyendo a la especie cuyo veneno contiene dicha toxina). Una serie de 56 péptidos dodecaméricos que cubre la secuencia completa de la miotoxina II, con un desplazamiento o traslape de 2 residuos, se enfrentó a los distintos tipos de sueros (tres lotes de antivenenos equinos de uso terapéutico, o un lote de suero de conejo anti-miotoxina II) empleando un ensayo inmunoenzimático basado en la captura de los péptidos biotinilados mediante estreptavidina acoplada a una fase sólida (Lomonte, 2012). Algunos de los epitopos lineales identificados fueron compartidos en las dos especies evaluadas, mientras que otros fueron únicos, como se muestra en la Figura 3. Además, se observó ciertas diferencias entre los lotes de antiveneno equino, en cuanto a su reconocimiento a nivel de epitopos. El conocimiento sobre la manera en que los antivenenos de uso terapéutico reconocen a las toxinas ofídicas, por ejemplo, es muy limitado. Sin embargo, su comprensión podría tener implicaciones importantes para mejorar en este tipo de medicamentos, mediante estrategias de inmunización con toxinas recombinantes, epitopos sintéticos, o segmentos génicos codificantes por toxinas, por ejemplo.

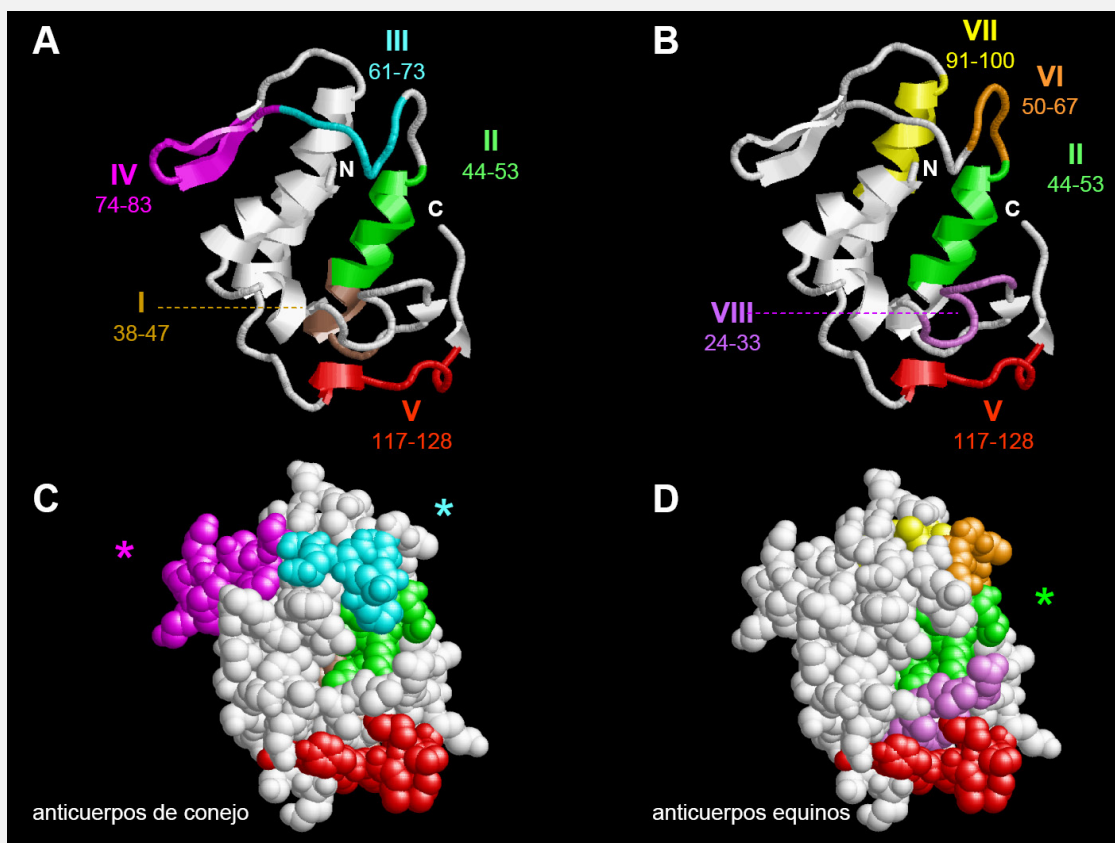


Figura 3: Identificación de epitopos lineales de la miotoxina II de *Bothrops asper* de Costa Rica, reconocidos por anticuerpos de conejo anti-miotoxina II (paneles A y C) o por anticuerpos presentes en el antiveneno terapéutico de origen equino (paneles B y D) utilizado en los envenenamientos ofídicos en Centroamérica. Los asteriscos señalan a los epitopos más intensamente reconocidos en el ensayo inmunoenzimático. Adaptado de Lomonte (2012).

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece la colaboración de numerosos colegas y estudiantes en las investigaciones citadas en el presente resumen, así como el apoyo económico de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, del International Center of Genetic Engineering and Biotechnology, del Programa CYTED, y de la red NeTropica de colaboración Suecia-Centroamérica.

BIBLIOGRAFÍA

- Angulo Y, Lomonte B, 2005. Differential susceptibility of C2C12 myoblasts and myotubes to group II phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms. *Cell Biochem. Funct.* 23, 307-313.
- Calderón L, Lomonte B, 1998. Immunochemical characterization and role in toxic activities of region 115-129 of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. *Archs. Biochem. Biophys.* 358, 343-350.
- Calderón L, Lomonte B, 1999. Inhibition of the myotoxic action of *Bothrops asper* myotoxin II in mice by immunization with its synthetic peptide 115-129. *Toxicon* 37, 683-687.
- Fujisawa D, Yamazaki Y, Lomonte B, Morita T, 2008. Catalytically inactive phospholipase A2 homologue binds to vascular endothelial growth factor receptor-2 via C-terminal loop region. *Biochem. J.* 411, 515-522.
- Gutiérrez JM, Lomonte B, 1995. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33, 1405-1424.
- Hackeng TM, Nounier CM, Bon C, Dawson PE, Griffin JH, Kent SBH, 1997. Total chemical synthesis of enzymatically active human type II secretory phospholipase A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7845-7850.
- Lomonte B, Moreno E, Tarkowski A, Hanson LÅ, Maccarana M, 1994. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a Lys-49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J. Biol. Chem.* 269, 29867-29873.
- Lomonte B, Angulo Y, Calderón L, 2003a. An overview of Lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 42, 885-901.
- Lomonte B, Angulo Y, Santamaría C, 2003b. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. *Toxicon* 42, 307-312.
- Lomonte B, Gutiérrez JM, 2011. Phospholipases A2 from Viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle

damage? *Acta Chim. Slovenica* 58, 647-659.

- Lomonte B, Rangel J, 2012. Snake venom Lys49 myotoxins: from phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon* 60, 520-530.
- Lomonte B, 2012. Identification of linear B-cell epitopes on myotoxin-II, a Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 60, 782-790.
- Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B, 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2897-2912.
- Núñez CE, Angulo Y, Lomonte B, 2001. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A2 from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. *Toxicon* 39, 1587-1594.
- Páramo L, Lomonte B, Pizarro-Cerdá J, Bengoechea JA, Gorvel JP, Moreno E, 1998. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. *Eur. J. Biochem.* 253, 452-461.
- Renetseder R, Brunie S, Dijkstra BW, Drenth J, Sigler PB, 1985. A comparison of the crystal structures of phospholipase A2 from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J. Biol. Chem.* 260, 11627-11634.
- Yamazaki Y, Matsunaga Y, Nakano Y, Morita T, 2005. Identification of vascular endothelial growth factor receptor-binding protein in the venom of Eastern cottonmouth: a new role of snake venom myotoxic Lys49-phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 280, 29989-29992.

