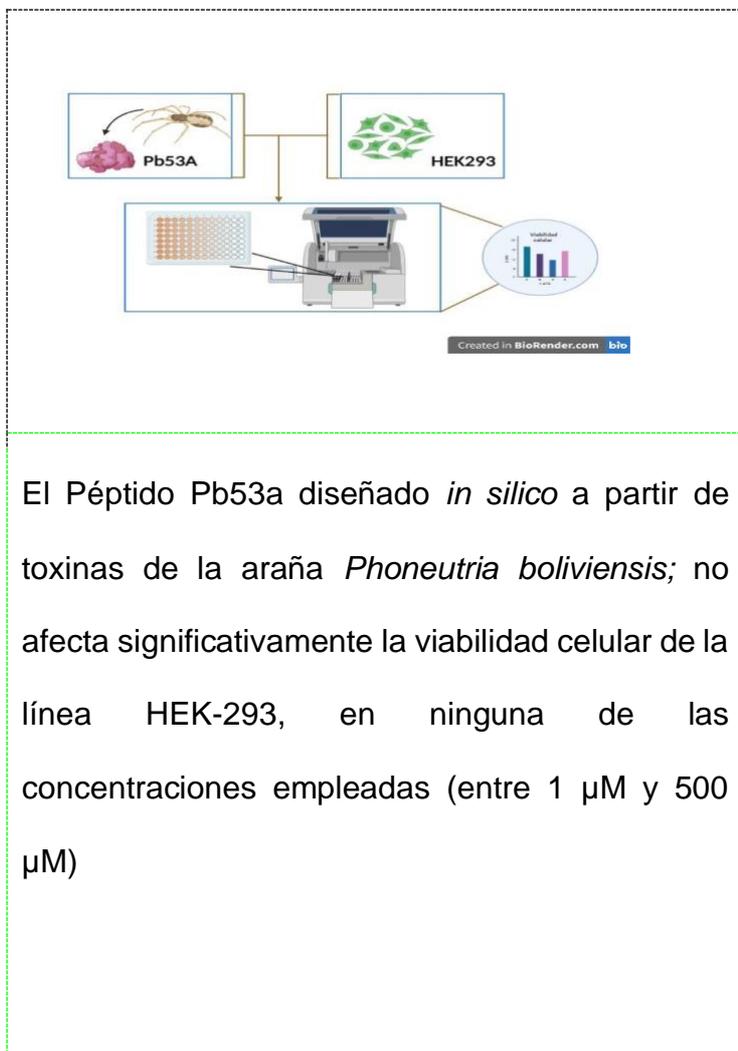


**Evaluación del efecto del péptido sintético Pb53a derivado de toxinas de la araña
Phoneutria boliviensis sobre la viabilidad celular de la línea HEK-293**

**Evaluation of the effect of the Pb53a a synthetic peptide obtained from toxins of the
spider *Phoneutria boliviensis* on the cell viability of the HEK-293 line**

Graphical Abstract (GA)



El Péptido Pb53a diseñado *in silico* a partir de toxinas de la araña *Phoneutria boliviensis*; no afecta significativamente la viabilidad celular de la línea HEK-293, en ninguna de las concentraciones empleadas (entre 1 μ M y 500 μ M)

**Evaluación del efecto del péptido sintético Pb53a derivado de toxinas de la araña
Phoneutria boliviensis sobre la viabilidad celular de la línea HEK-293**

**Evaluation of the effect of the Pb53a a synthetic peptide obtained from toxins of the
spider *Phoneutria boliviensis* on the cell viability of the HEK-293 line**

Yair Santiago Bermudez Urrego*

** Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

Dirigido por: Edwin Alfredo Reyes Guzman PhD.

Maria Elisa Forero Vivas PhD.

Resumen

La isquemia cerebral es causada por la obstrucción de un vaso sanguíneo en el cerebro y se ve generada por una despolarización hipóxica resultado del influjo y elevación de calcio libre intracelular proveniente del espacio extracelular y del retículo endoplasmático. Este influjo excesivo de calcio hacia las células en hipoxia induce la activación de procesos apoptóticos que acaban con la actividad neuronal. El uso de toxinas peptídicas de origen animal reviste gran importancia en la modulación de la actividad del receptor NMDA, el cual se encuentra asociado con el fenómeno excitotóxico producto del aumento de la concentración de calcio intracelular; un ejemplo son las toxinas peptídicas de *Phoneutria boliviensis* que presentan gran homología con toxinas peptídicas de *Phoneutria nigriventer* que interactúan con la subunidad GluN2B del receptor NMDA. En este documento presentamos el estudio del efecto citotóxico que ejercen dichos péptidos sobre la línea celular eucariótica adherente HEK-293, por medio del ensayo de la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetilazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), como un ensayo preliminar para la evaluación de este péptido en la regulación de la actividad del receptor

NMDA. Los resultados obtenidos permiten sugerir que el péptido ensayado (Pb53a) no tiene un efecto significativo sobre la disminución de la viabilidad celular de la línea HEK-293 en un rango de concentraciones desde 1 μM hasta 500 μM y por tanto se puede usar en ensayos de la evaluación funcional del receptor NMDA.

Palabras clave: citotoxicidad, MTT, péptido, viabilidad celular, espectrofotometría, ELISA.

Abstract

Cerebral ischemia is caused by the obstruction of a blood vessel in the brain and is generated by a hypoxic depolarization resulting from the influx and elevation of intracellular free calcium from the extracellular space and the endoplasmic reticulum. This excessive influx of calcium into hypoxic cells induces the activation of apoptotic processes that kill neuronal activity. The use of peptide toxins of animal origin is of great importance in modulating the activity of the NMDA receptor, which is associated with the excitotoxic phenomenon resulting from the increase in intracellular calcium concentration; an example is the *Phoneutria boliviensis* peptide toxins that show high homology with *Phoneutria nigriventer* peptide toxins that interact with the GluN2B subunit of the NMDA receptor. In this document we present the study of the cytotoxic effect that these peptides exert on the adherent eukaryotic cell line HEK-293, by means of the assay of the metabolic reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-bromide diphenyltetrazolium (MTT), as a preliminary assay for the evaluation of this peptide in the regulation of NMDAR receptor activity. The results obtained allow us to suggest that the peptide tested (Pb53a) does not have a significant effect on the decrease in cell viability of the HEK-293 line in a concentration range from 1 μM to 500 μM and therefore it can be used in assays of the functional evaluation of the NMDA receptor.

Keywords: cytotoxicity, MTT, peptide, cell viability, spectrophotometry, ELISA.

Introducción

El aminoácido L-glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio durante la comunicación neuronal. Desde que se propuso al L-glutamato como agente neuro excitatorio en 1957 y hasta la última década han habido avances significativos en el estudio de los aminoácidos excitadores, desde la identificación de los falsos neurotransmisores, hasta establecer cuán importante son las subfamilias de receptores en el desarrollo, el aprendizaje y las neuropatologías asociadas (Lucas DR et al., 1957).

Las neuronas son células especializadas muy sensibles a una variedad de cambios en el medio circundante. Uno de estos agentes neurotóxicos es el L-glutamato. A partir de los años 50 se empezó a establecer el estudio de la transmisión glutamatérgica en el Sistema Nervioso Central (SNC); desde allí surgieron las diferentes clasificaciones para los receptores que median este tipo de procesos teniendo en cuenta los agonistas que activan estos receptores con mayor afinidad y sensibilidad, siendo categorizados como receptores NMDA y no NMDA (luego clasificados como receptores AMPA y de Kainato) (Watkins JC et al., 2006). Los receptores de glutamato se pueden clasificar en dos familias (receptores ionotrópicos y receptores metabotrópicos). En ese orden de ideas, dentro de los receptores ionotrópicos se encuentran otras tres subfamilias de receptores que actúan como canales de cationes. Esas subfamilias son los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA); los de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA); y los de kainato (receptores de kainato). Por su parte los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G, y modifican la respuesta de los canales de membrana y las concentraciones de segundos mensajeros como el diacilglicerol o el AMP cíclico (C. F. Bigge., 1999).

Las Enfermedades Cardiovasculares (ECV) son un grupo de alteraciones fisiológicas que afectan al sistema circulatorio. Dentro de este grupo podemos encontrar patologías

importantes como lo son la hipertensión arterial (HTA), infarto agudo de miocardio (IAM), insuficiencias cardíacas, accidentes cerebrovasculares (ACV), entre otras. Las ECV son la principal causa de muerte en todo el mundo. Se calcula que en 2012 murieron por esta patología 17.7 millones de personas, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo. De estas muertes, 7.4 millones se debieron a la cardiopatía coronaria, y 6.7 millones, a los Accidentes Cerebrovasculares. Más de tres cuartas partes de las defunciones por ECV se producen en los países de ingresos bajos y medios (World Health Organization. 2015 ; Alfonso, C. G. et al., 2019). Dentro de las ECV se encuentran los ACV, que puede ser isquémico o hemorrágico, en el isquémico (obstrucción del flujo sanguíneo) la depleción de las reservas energéticas como glucosa y oxígeno generan daño y lisis neuronal (Puentes Madera, I. C. 2014), el resultado de esto es la liberación excesiva de diferentes moléculas incluido el neurotransmisor glutamato, el cual causa una sobre estimulación de receptores ionotrópicos específicos ubicados en membranas pre y postsinápticas creando una reacción en cadena de daño neuronal; dicho esto el ACV isquémico se establece como la patología neurológica que constituye mayor incapacidad y acompañamiento interinstitucional para el paciente, y según la Organización Mundial de la Salud (OMS) solamente en el año 2014, 6,9 millones de personas fallecieron a causa de los accidentes cerebrovasculares.

Los receptores neuronales son blanco de una gran variedad de sustancias químicas secretadas por diversas especies animales como mecanismos de defensa o cacería (R.L.Kotpal 2012). Dentro de este amplio grupo cabe destacar a los arácnidos, los escorpiones, peces y víboras de mar, las víboras terrestres, ranas, invertebrados marinos y mamíferos (Whittington, C 2007 ; Auerbach, P. S. 2005). Estas sustancias químicas se suelen caracterizar como venenos, luego de que sean capaces de provocar algún tipo de modificación puntual o sistémica en sus presas o víctimas (Denson, K. W. E. 1969). Casi en todos los casos el objetivo de estos venenos o toxinas altamente tóxicos es inmovilizar

o paralizar a la presa o víctima, esto con la finalidad de evitar que puedan causar alguna lesión al atacante o que puedan huir definitivamente del ataque, y que no le sea posible al atacante digerir a la presa (Jiménez, J. A. P 2009). Estas toxinas animales pueden desencadenar diferentes alteraciones sobre la fisiología de las víctimas; como procesos inflamatorios e infecciosos, alteraciones renales, cardiovasculares y del sistema nervioso entre otras (Otero, R. et al., 1992; Ortiz Prado, E. et al., 2015). Es importante mencionar que históricamente las toxinas animales han sido usadas en diferentes culturas con fines terapéuticos, así mismo, han tenido otros usos como en la cacería, algo tradicional en las tribus indígenas Amazónicas (Russell, F. E. 1988 ; I. Bácskay .,et al 2018).

La caracterización del potencial farmacológico de las toxinas de origen animal y específicamente de péptidos ha tenido avances tecnológicos importantes. Desde el enfoque del descubrimiento tradicional basado en la bioactividad, en el que las fracciones de veneno crudo se analizan frente a blancos conocidos, seguido de purificaciones y secuenciación para dilucidar la secuencia de péptidos específicos. Hoy en día una gran variedad de venenos han permitido el desarrollo de nuevos fármacos con el fin de tratar afecciones prioritarias, que pueden relacionarse con el Sistema Nervioso Central (SNC) dentro de las cuales se puede mencionar el Parkinson, Huntington, Alzheimer, Enfermedades Cardiovasculares (ECV), entre otras (Rabelo Padua, G. et al., 2012). Sobre los potenciales fármacos derivados de venenos animales se han desarrollado pruebas computacionales y de laboratorio que permiten predecir los efectos tóxicos de estos compuestos y establecer las concentraciones de dosis efectivas.

Para hacer una correcta evaluación del potencial con importancia biológica que puede tener una sustancia, se utilizan diversos ensayos de laboratorio que resultan imprescindibles para un registro o solicitud de ensayos clínicos; unos de los más usados son los ensayos de citotoxicidad, cuyos resultados permiten establecer si existen o no efectos negativos en el desarrollo y la viabilidad celular.

Estos ensayos comúnmente se orientan a determinar si existen problemas en la integridad de la membrana celular, alteraciones metabólicas, la síntesis, degradación de metabolitos celulares, flujo de iones y división celular (Repetto, M., 2002). Algunos de los ensayos más utilizados en estos estudios son el ensayo de exclusión celular por integridad de membrana o azul de tripan, el ensayo de captación del rojo neutro, y el ensayo fundamentado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a su sal de formazan (Fentem, J. H., 1994).

Por otra parte (Estrada-Gomez S. et al., 2015); mostraron un estudio de purificación y caracterización parcial del veneno de la araña colombiana *Phoneutria boliviensis* donde mediante espectrometría de masas hallaron la presencia de dos péptidos: Ctenitoxina-Pb48 y Ctenitoxina-Pb53 que tienen homología con la secuencia de toxinas de *Phoneutria nigriverter* que interactúan con el receptor NMDA, proponiendo preliminarmente que las toxinas Ctenitoxina-Pb48 y Ctenitoxina-Pb53 podrían tener algún efecto sobre el receptor NMDA (Rajendra W. et al., 2004 ; Rash LD. et al., 2002).

Más recientemente, Carvajal y Reyes-Guzmán., 2020 (tesis de pregrado) realizaron un estudio *in silico* en el que proponen las posibles secuencias completas de las toxinas peptídicas Ctenitoxina-Pb48 y Ctenitoxina-Pb53 de la araña colombiana *Phoneutria boliviensis* (Araneae: Ctenidae), y propusieron una librería de péptidos con potencial inhibidor de las interacciones que promueven la señalización apoptótica de la célula brindando péptidos candidatos a agentes terapéuticas en isquemia. De los péptidos propuestos por Carvajal y Reyes-Guzmán., 2020, se seleccionó el péptido Pb53a el cual fue obtenido por síntesis química y se propuso como objetivo de este estudio evaluar el efecto citotóxico de este péptido sobre la línea celular HEK-293. Ensayos de citotoxicidad por el método de MTT sugieren que el péptido Pb53a no tiene un efecto significativo sobre la viabilidad celular de la línea HEK-293.

1. Materiales y Métodos

- **Cultivo celular línea HEK-293**

Para el cultivo celular se usó la línea celular eucariótica adherente de riñón de embrión humano ó HEK-293 (*Human Embryonic Kidney cells*) por sus siglas en inglés. Los cultivos celulares se mantuvieron de forma rutinaria en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado (Thermo Fisher) soportado con antibiótico 1% Pen/strep y 10% de Suero fetal bovino (SFB). Las células se cultivaron en frascos de cultivo celular de cuello inclinado rectangular (flask) (Thermo Fisher Scientific) de 25 y 75 cm². Cultivos con una confluencia del 80% se tripsinizaron y se realizó el correspondiente pase celular según la relación de siembra haciendo conteo celular por el método de exclusión de azul de tripán y además se generó un banco de células por criogenización con el volumen de células restante al pase celular. Las células se mantuvieron en una incubadora de cultivo celular con una temperatura de 37 °C en 5% de CO₂ y aire humidificado. Una vez se llegó a confluencias del 90% se realizaron congelaciones de la línea celular usando medio de congelación. Los lotes producto del conteo celular, se mantuvieron en una cadena de frío, en primera instancia en ultracongelación a -72 °C por 24 horas y finalmente se trasladaron a tanque de nitrógeno líquido a -196 °C.

- **Péptidos sintéticos**

El péptido Pb53a fue sintetizado por la empresa Peptides Tech (Envigado, Antioquia, Colombia) mediante síntesis química en fase sólida. La pureza (> 95%) del péptido fue determinada mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por su sigla en inglés) y el peso molecular fue determinado por espectrometría de masas (1265.48 g/mol). El péptido Pb53a se disolvió en 3 mL de agua ultra pura de acuerdo con el análisis de solubilidad usando la herramienta Peptide Property Calculator (<https://pepcalc.com/>), siendo completamente hidrosoluble por lo que no se tuvo ningún inconveniente relacionado

con la solubilidad, se alicuoto en 6 tubos crioviales con un volumen de 0.5 mL los cuales se congelaron a -18 °C.

- **Medición de la viabilidad celular por ensayo MTT:**

El MTT que se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio a su sal (cristales de formazán), es un ensayo colorimétrico para evaluar la actividad metabólica celular en el que las enzimas oxidorreductasas celulares dependientes de NADH pueden, bajo condiciones definidas, reflejar el número de células viables presentes (Riss et al., 2013).

A partir de un cultivo de la línea celular HEK-293 con una confluencia del 80% se sembraron las células en una placa de 96 pozos a una densidad de 1.0×10^4 células/pozo. Las células se mantuvieron en incubadora a 37 °C, 5% CO₂ en atmósfera húmeda durante 24 horas en medio de cultivo suplementado. Posterior a la solubilización del péptido Pb53a descrita anteriormente en el análisis de solubilidad, se hicieron diluciones seriadas del estímulo (Pb53a) para tener concentraciones del péptido así: (500; 250; 125; 62.5; 31.3; 15.6; 7.8; 3.9; 2.0; 1.0 µM) y haciendo un triplicado con las mismas concentraciones en la misma placa. Como control negativo se dejaron células sin aplicación de péptidos. El cultivo fue incubado durante 24 horas en presencia del péptido Pb53a a 37 °C, 5% CO₂ en atmósfera húmeda. Transcurridas las 24 horas de interacción se adicionaron 10 µL de MTT (5 mg/mL en PBS) por cada pozo y se incubaron durante 4 horas a 37 °C y 5% CO₂ en atmósfera húmeda. Seguidamente se retiró el medio dejando los cristales de formazan formados en cada pozo y se adicionaron 100 µL de DMSO, se incubó por 30 minutos a 37 °C, 5% CO₂ en atmósfera húmeda. Después se llevó la placa a un agitador orbital a 300 rpm por 20 minutos y 37 °C. Una vez se evidenció la solubilización de los cristales de formazán se determinó la viabilidad celular con un espectrofotómetro UV-Vis (ThermoFisher Scientific) a una longitud de onda de 570 nm y usando como filtro de referencia 405 nm. Los valores

de absorbancia fueron normalizados usando la fórmula: Viabilidad (%) = (media OD de las células tratadas)/(media OD de las células control) × 100.

- **Análisis estadístico de los resultados de viabilidad celular.**

Los resultados se presentan como la media y el error estándar de la media (mean ± SEM). La significancia estadística se determinó mediante una prueba t-student pareada suponiendo varianzas desiguales cuando se compararon las diferentes concentraciones del péptido Pb53a, respecto al grupo control; y entre concentraciones del péptido Pb53a empleadas. Las diferencias entre grupos control y experimentales (con las concentraciones del péptido empleadas) fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$. El análisis estadístico se realizó usando el módulo de análisis de datos de microsoft excel versión 2013.

2. Resultados y Discusión

- **Obtención y mantenimiento de la línea celular HEK-293.**

El cultivo se mantuvo en condiciones estándar de medio suplementado *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM COMPLETE), enriquecido con antibióticos penicilina/estreptomina (Pen/Strep) al 1% y Suero fetal bovino (SFB) al 10%; a 37°C y 5% CO₂ en atmósfera húmeda (**Figura 1**).

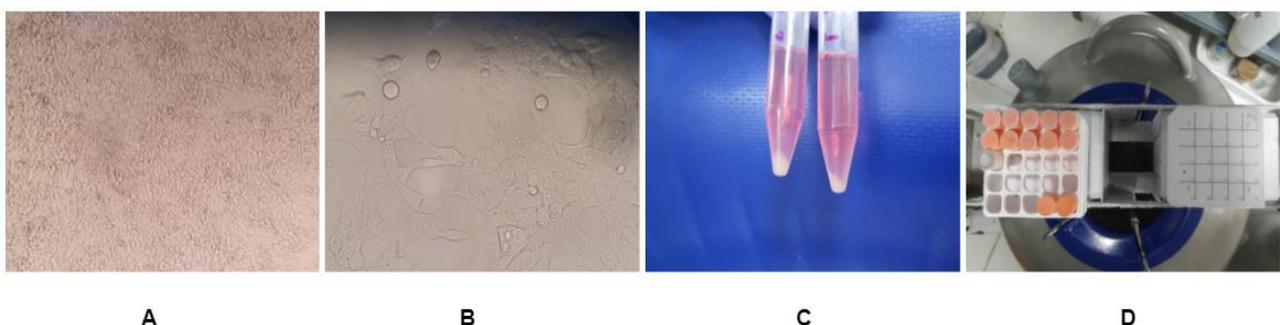


Figura 1: Cultivo y mantenimiento de la línea celular HEK-293. **A)** Confluencia celular de aproximadamente 80% vista en microscopio invertido con un objetivo de 10X. **B)** Morfología celular vista a un aumento de 40X

(4 días de cultivo). **C)** Tubo falcon de 15 mL con un agregado celular (pellet) producto de la centrifugación. **D)** Lotes de la línea celular HEK-293 guardados en tubos crioviales a una densidad de 2.2×10^6 células/mL en nitrógeno líquido.

El cultivo celular durante todo el proceso de expansión y mantenimiento mostró una morfología y fisiología correspondiente al tipo celular (Figura 2).

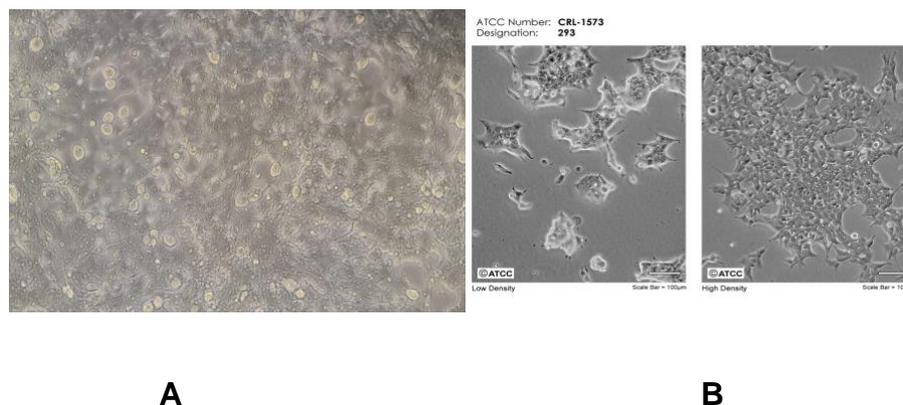


Figura 2. Correlación morfológica entre la línea celular cultivada y la American Type Culture Collection (ATCC). **A.** Vista al microscopio invertido de la línea celular HEK-293 (aumento 40X) cultivada en el laboratorio de cultivo celular y proteínas de la UAN. **B.** Imagen de microscopía electrónica del archivo de la base de datos ATCC de la línea celular HEK-293, vista en el objetivo de 40X (escala 100µm).

Se realizaron al menos 6 pases antes de hacer el congelamiento de las células como se describió en la metodología. El proceso de descongelación fue exitoso con cultivos celulares viables libres de contaminación. Una vez se estandarizó el mantenimiento celular de la línea HEK-93 se iniciaron los ensayos de viabilidad celular usando el ensayo de MTT.

- **Determinación de la viabilidad celular: Ensayo de MTT.**

Siendo el MTT un ensayo que mide la actividad enzimática, la cual se evidencia en un cambio colorimétrico, la actividad enzimática es directamente proporcional a la intensidad del color producto de la solubilización de los cristales de formazán, es decir, mientras más intenso sea la coloración (púrpura), mayor viabilidad celular, la cual es proporcional a los

valores de absorbancia a 570 nm. Como control se tuvieron pozos con células sin estímulo (péptidos) en los que el resultado colorimétrico se tomó como el máximo de viabilidad celular para el ensayo y normalizando al 100%.

- **Péptido Pb53a.**

Estrada-Gómez et al., en 2015, hicieron un estudio de caracterización del veneno de la araña colombiana *Phoneutria boliviensis* donde mediante espectrometría de masas hallaron la presencia de la toxina peptídica Ctenitoxina-Pb53 que tienen homología con la secuencia de toxinas de *Phoneutria nigriventer* que interactúan con el receptor NMDA, proponiendo preliminarmente que la toxina Ctenitoxina-Pb53 podría tener algún efecto sobre el receptor NMDA. Sin embargo, en la secuencia reportada como Ctenitoxina-Pb53 hacía falta determinar la identidad de los aminoácidos de las posiciones 6 y 10. En el trabajo de grado de Carvajal y Reyes-Guzmán., 2020, propusieron los dos aminoácidos faltantes mediante un análisis *in silico*, de esta forma la secuencia propuesta es ESNFKIGMAIR denominada Pb53a, en la que se incluye los aminoácidos isoleucina (Ile) en las posiciones 6 y 10.

Preliminarmente para los resultados de viabilidad celular (Tabla 1 y Figura 3) el péptido Pb53a no presentó efecto significativo sobre la viabilidad celular de la línea HEK-293. Para la concentración de 500 μ M la media de la absorbancia fue de 0.72 ± 0.19 (n=3), a pesar de que en ésta medición se aprecia error en los triplicados (intervalo de confianza de 0.19), el análisis estadístico mediante la prueba *t* indica que no hay diferencia entre el efecto que causa 500 μ M de péptido Pb53a respecto al grupo control.

Tabla 1. Valores de absorbancia y datos del análisis estadístico del ensayo de viabilidad celular usando el péptido Pb53a. Se representan los valores de absorbancia a 570 nm. Se estimó la media y el error (SEM) asociado a la media para cada concentración (triplicado).

	Concentraciones de péptido Pb53a en μM										
	control	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	2,0	1,0
Media de la Absorbancia	0,885	0,722	0,690	0,637	0,737	0,686	0,628	0,578	0,682	0,798	0,639
Tamaño de la muestra (n)	6	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Intervalo de confianza	0,12	0,19	0,03	0,20	0,05	0,02	0,18	0,02	0,01	0,10	0,04
Desviación estándar	0,15	0,16	0,03	0,17	0,04	0,02	0,16	0,02	0,01	0,09	0,04

En el caso del grupo control la media de absorbancia fue de 0.88 ± 0.12 ($n=6$); para la concentración de $7.8 \mu\text{M}$, la media de la absorbancia fue de 0.58 ± 0.02 ($n=3$), y para la concentración de $1 \mu\text{M}$, fue de 0.64 ± 0.04 ($n=3$). El análisis estadístico mediante la prueba *t* indica una diferencia significativa entre el grupo control y las concentraciones empleadas del péptido Pb53a ($1 \mu\text{M}$ y $7.8 \mu\text{M}$). Sin embargo, al comparar los dos grupos experimentales (péptido Pb53a $1 \mu\text{M}$ y $7.8 \mu\text{M}$) no se observaron diferencias significativas.

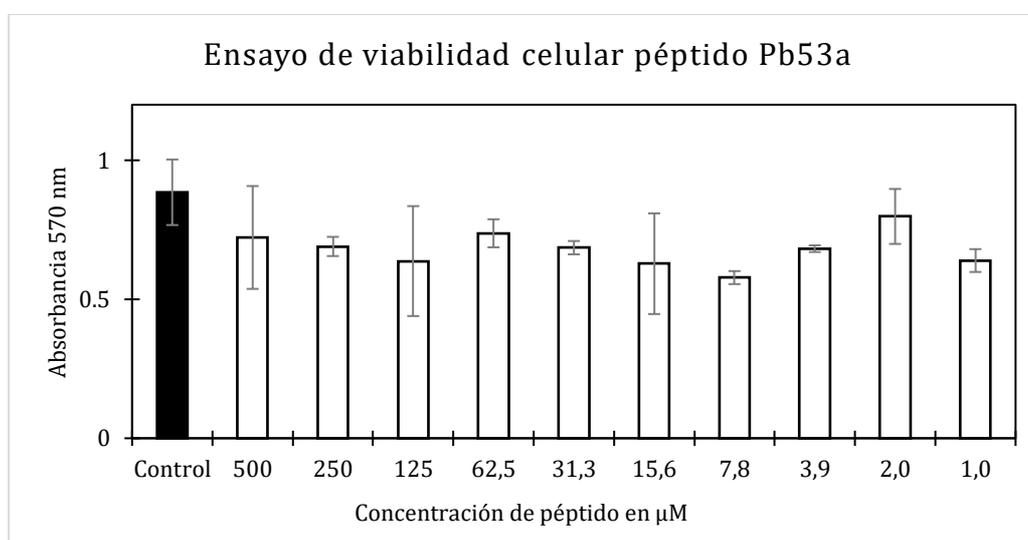


Figura 3. Ensayo del efecto del péptido Pb53a sobre la viabilidad celular de la línea HEK-293. Se representan los valores de absorbancia a 570 nm de acuerdo con 10 concentraciones diferentes del péptido. Las medidas que tuvieron menor error asociado a la media fueron 250, 31.3, 7.8 y 3.9 μM .

Con base en el análisis estadístico realizado, se observó que en el caso de las comparaciones del control vs experimentales se presentaron diferencias estadísticamente significativas en 5 de las 10 concentraciones empleadas (control vs 250 μM ; control vs 31.3 μM ; control vs 7.8 μM ; control vs 3.9 μM ; control vs 1.0 μM) (Tabla 2). En el caso de las comparaciones entre los grupos experimentales, se presentaron diferencias estadísticamente significativas en 3 de las 9 comparaciones para la concentración de 7.8 μM (250 vs 7.8 μM ; 62.5 vs 7.8 μM y 3.9 vs 7.8 μM) (Tabla 2) y para la concentración de 1.0 μM (62.5 vs 1.0 μM) (Tabla 2); es importante mencionar que en todas las comparaciones, la diferencia fue considerada estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$.

Nuestros resultados indican que en dichas comparaciones el valor estadístico de t es mayor que el valor crítico de t (t estadístico $>$ t crítico) y el valor de p efectivamente es menor que 0.05 ($p < 0.05$) por lo que la hipótesis nula de que no existe una diferencia entre los triplicados comparados para cada muestra se rechaza.

Tabla 2: Resumen de los casos donde hay diferencias estadísticamente significativas, donde se muestra que 9 de las 200 comparaciones que se realizaron son diferentes entre sí.

TABLA RESUMEN ANALISIS ESTADISTICO (CASOS DONDE SI HAY DIFERENCIA)		
COMPARACION	VALOR ESTADISTICO t	VALOR CRITICO DE t
Control Vs 250 μM Pb53	3,10	2,44
Control Vs 31,3 μM Pb53	3,24	2,57
Control Vs 7,8 μM Pb53	5,00	2,57
Control Vs 3,9 μM Pb53	3,35	2,57
Control Vs 1,0 μM Pb53	3,85	2,44
250 Vs 7,8 μM Pb53	5,26	2,77
62,5 Vs 7,8 μM Pb53	5,62	3,18
62,5 Vs 1,0 μM Pb53	2,95	2,77
3,9 Vs 7,8 μM Pb53	7,75	3,18

Finalmente, luego de interpretar los resultados experimentales y el análisis estadístico no se puede establecer una clara correlación entre las concentraciones y su efecto sobre la viabilidad celular; la afirmación anterior concuerda con los resultados de la predicción de

toxicidad para el péptido Pb53a usando el predictor ToxinPred y que reporta Carvajal y Reyes-Guzmán, 2020, el cual indica que no es tóxico. Este resultado de predicción de toxicidad el programa lo hace por medio de un algoritmo de clasificación de datos de análisis predictivo llamado máquina de soporte vectorial (SVM), que tiene en cuenta consideraciones de secuencia y posiciones específicas de aminoácidos presentes en péptidos que han sido validados experimentalmente como tóxicos. Específicamente ToxinPred usa 1805 péptidos tóxicos y 12541 péptidos no tóxicos para entrenar su algoritmo (Gupta et al., 2013). Así mismo, ToxinPred indica que ciertos residuos como Cys, His, Asn y Pro están presentes en gran proporción en péptidos tóxicos en comparación con péptidos no tóxicos. Por otro lado, Val, Thr, Arg, Gln, Met, Leu, Lys, Ile, Phe y Ala están presentes en péptidos no tóxicos. De manera similar a la composición de aminoácidos, la Cys aparece en casi todas las posiciones tanto en el extremo C como en el N-terminal de los péptidos tóxicos, y la Leu es recurrente en los extremos C y N terminal de péptidos no tóxicos. Si se tienen en cuenta esas consideraciones para el péptido Pb53a en relación a la composición de aminoácidos en su secuencia (ESNFKIGMAIR) y a las posiciones de dichos aminoácidos se observa que es congruente con la predicción para péptidos no tóxicos con un valor de predicción SVM de -1.12 (Figura 4).

Original Peptide								
Peptide Sequence ↕	Mutation Position ↕	SVM score ↕	Prediction	Hydrophobicity ↕	Hydropathicity ↕	Hydrophilicity ↕	Charge ↕	Mol wt ↕
ESNFKIGMAIR	No Mutation	-1.12	Non-Toxin	-0.15	-0.10	0.15	1.00	1265.65

Figura 4. Predicción de citotoxicidad para la secuencia peptídica ESNFKIGMAIR en el programa ToxinPred usando el algoritmo SVM. Valores negativos en el puntaje SVM (SVM Score) indica que el péptido no es tóxico.

Tomando en conjunto los resultados experimentales, la predicción *in silico* y lo que reportan otros estudios sobre el efecto de péptidos tóxicos de origen animal sobre la viabilidad celular y citotoxicidad en líneas celulares (Setayesh-Mehr y Asoodeh., 2018; Kheirandish *et al.*, 2019) se puede sugerir que el péptido Pb53a en las concentraciones probadas no tiene un

efecto significativo sobre la viabilidad celular de la línea HEK-293. En todos los casos el porcentaje de viabilidad celular fue superior al 50% (Figura 5), por lo que el efecto del péptido Pb53a no es considerado crítico.

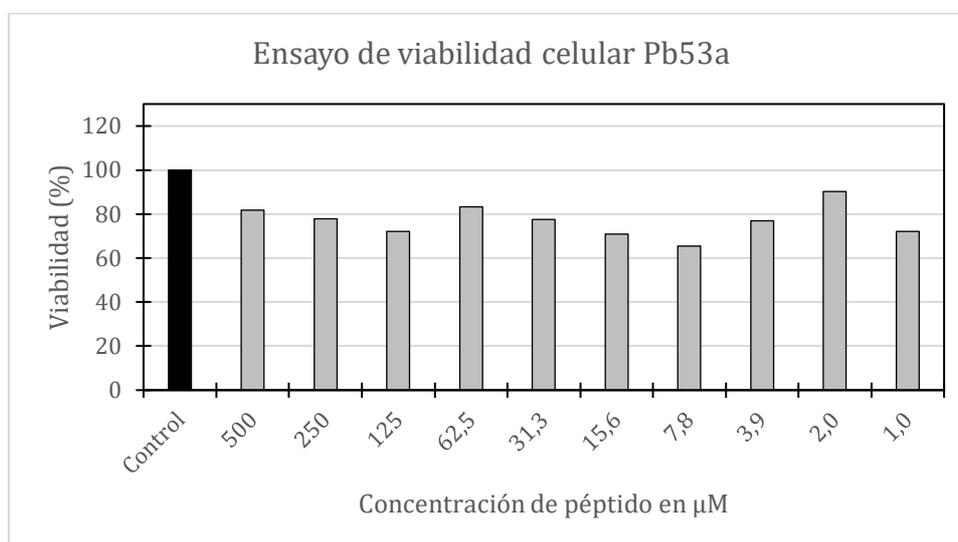


Figura 5. Porcentaje de viabilidad celular para las células HEK-293. Los valores de absorbancia fueron normalizados teniendo en cuenta al control como el 100% de viabilidad celular. En ninguna de las concentraciones se observó porcentajes de viabilidad que estuvieran por debajo del 50%.

El uso de un péptido con un efecto tóxico puede ser potencial en estudios sobre el tratamiento de varios tipos de cancer, dónde se busca un efecto citotóxico, antioxidante o antitumoral dirigido a células específicas (Attarde y Pandit., 2017). Para el caso del péptido Pb53a, se espera lo contrario, los resultados preliminares indican que al no ser un péptido tóxico, puede usarse en ensayos funcionales en los que esté presente el receptor NMDA como blanco de este péptido sin que se afecte la viabilidad celular y sin que se genere un impacto sobre las mediciones en torno a la actividad eléctrica de las células.

3. Conclusiones

- Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones del péptido Pb53a sobre la viabilidad celular de la línea HEK-293.
- Los resultados indican que el péptido Pb53a en un rango de concentraciones entre 1 y 500 μM no tiene un efecto significativo sobre la viabilidad celular. Aunque se observaron algunos cambios en el efecto citotóxico que ejercen las concentraciones empleadas del péptido Pb53a, cuando se comparan con el grupo control éstas no generan un efecto adverso sobre la viabilidad celular mayor al 50% para ser consideradas tóxicas.
- Los resultados no muestran una correlación negativa clara entre las concentraciones del péptido Pb53a y los resultados de viabilidad celular. Es decir que al aumentar la concentración hubiera disminuido la viabilidad celular y viceversa.
- En general, el péptido Pb53a no presenta un impacto significativo sobre la viabilidad celular de la línea HEK-293, en un periodo de 24 horas de incubación.
- Se puede sugerir que los resultados experimentales corresponden con los resultados observados en los estudios *in silico* en cuanto a que el péptido Pb53a no es citotóxico.
- Si bien no se puede reportar una concentración óptima del péptido Pb53a para pruebas funcionales, si se recomienda usar el péptido en ensayos *in vitro* que permitan evaluar su efecto sobre la función/actividad del receptor NMDA y, específicamente, durante los ensayos de transfección usando la línea celular HEK-293.

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a mi mamá Maryluz Urrego, a mi papá Nylton Bermudez y a mi hermana Ximena Bermudez, por el apoyo incondicional que me brindaron durante todo este proceso alentandome a seguir adelante cuando pensé que ya no podría lograrlo.

A toda la “gran familia” quienes son prueba de que en ocasiones no es necesario tener un un vínculo sanguíneo para apoyarnos como tal.

Al Dr. Edwin Alfredo Reyes, a la Dra. Maria Elisa Forero Vivas, y a la Dra. Ana Luisa Muñoz Ramirez por su asesoría, guía y apoyo en todo este proceso.

Al grupo de Investigación en Biología Celular y Funcional e Ingeniería de Biomoléculas de la Universidad Antonio Nariño por brindarme los medios para llevar a cabo este proyecto.

Al proyecto “Diseño, síntesis y evaluación de péptidos moduladores de la actividad del receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA)”, código 57069, financiado por Minciencias, por los recursos aportados para el desarrollo de este trabajo de grado.

Al Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS) por la donación de la línea celular HEK-293.

A todos los profesores que a partir de los conocimientos impartidos me brindaron las herramientas necesarias para soportar con argumentos este trabajo.

A mis amigos que conocí a lo largo de este proceso quienes también fueron un apoyo incondicional tanto académicamente como moralmente y en último lugar pero no menos importante a mis amigos de la infancia que de una u otra manera estuvieron involucrados en todo mi proceso de formación.

Referencias

- Alfonso, C. G., Reyes, A. E. M., García, V., Fajardo, A. R., Torres, I., & Casas, J. C. (2019). Actualización en diagnóstico y tratamiento del ataque cerebrovascular isquémico agudo. *Universitas Medica*, 60(3), 1-17. doi:10.11144/Javeriana.umed60-3.actu.
- Aristizábal, L. C. Á., Franco, Á. L. L., & Carreño, J. G. P. (2011). Factores de riesgo relacionados con la mortalidad por enfermedad cerebrovascular, Armenia, Colombia, 2008. *Iatreia*, 24(1), 26-33.
- Attarde SS, Pandit SV. Cytotoxic activity of NN-32 toxin from Indian spectacled cobra venom on human breast cancer cell lines. (2017) *BMC Complement Altern Med*. Nov 28;17(1):503. doi: 10.1186/s12906-017-2018-3. PMID: 29183371; PMCID: PMC5704554.
- Auerbach, P. S. (2005). The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. *Wilderness & Environmental Medicine*, 16(3), e13., doi: 10.1016/j.trstmh.2004.12.001.
- Bácskay et al., "Role of Cytotoxicity Experiments in Pharmaceutical Development Provisional chapter Role of Cytotoxicity Experiments in Pharmaceutical Development," 2018, doi: 10.5772/intechopen.72539.
- C. F. Bigge, "Ionotropic glutamate receptors," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 3, no. 4, pp. 441–447, Aug. 1999, doi: 10.1016/S1367-5931(99)80065-9.
- Carvajal J and Reyes-Guzman EA. (2020). Tesis de pregrado. In silico analysis of the interacción of peptides derived from the Ctenitoxin-Pb48 and Ctenitoxin-Pb53 toxins of the Colombian spider *Phoneutria boliviensis* with the NMDA receptor.
- Denson, K. W. E. (1969). Coagulant and anticoagulant action of snake venoms. *Toxicon*, 7(1), 5-11.,doi: 10.1016/0041-0101(69)90154-8.
- Estrada-Gomez S, Muñoz LJV, Lanchero P, Latorre CS. (2015) Partial characterization of venom from the Colombian spider *Phoneutria boliviensis* (Aranae:Ctenidae). *Toxins (Basel)*. 7:2872–87, doi: 10.3390/toxins7082872.
- Fentem, J. H. (1994). The Use of human tissues in in vitro toxicology, *stirling*, 28/29 april 1993 summary of general discussions. *Human & experimental toxicology*, 13(6), 445-449.
- Gupta et. al.: In silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *PLoS ONE* 8(9):e73957. doi:10.1371/journal.pone.0073957
- Jiménez, J. A. P., & Muñoz, L. J. V. (2009). Toxinas de serpientes con alto potencial terapéutico y su uso en la biomedicina. *Iatreia*, 22(4), 382-391.
- Kheirandish Zarandi P, Zare Mirakabadi A, Sotoodehnejadnematalahi F. (2019) Cytotoxic and Anticancer Effects of ICD-85 (Venom Derived Peptides) in Human Breast Adenocarcinoma and Normal Human Dermal Fibroblasts. *Iran J Pharm Res*. Winter;18(1):232-240. PMID: 31089358; PMCID: PMC6487428.
- Kotpal R.L. "Modern Text Book of Zoology: Invertebrates - Prof. - Google Libros." [Online].

Lucas, DR y Newhouse, JP (1957). El efecto tóxico del L-glutamato de sodio en las capas internas de la retina. Archivos de oftalmología de la AMA , 58 (2), 193-201.

Ortiz Prado, E., Molina, C., Ramírez, D., Espín, E., & Fierro, D. (2015). Perspectivas actuales sobre el uso terapéutico del veneno de serpientes. VozAndes, 47-52.

Otero, R., Osorio, R. G., Valderrama, R., & Giraldo, C. A. (1992). Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Chocó (Colombia). Toxicon, 30(5-6), 611-620., doi: 10.1016/0041-0101(92)90855-Y.

Puentes Madera, I. C. (2014). Epidemiología de las enfermedades cerebrovasculares de origen extracraneal. Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vascul, 15(2), 66-74.

Rabelo Padua, G., & Díaz Piñera, W. J. (2012). Enfermedades no transmisibles. Tendencias actuales. Revista Cubana de Salud y Trabajo, 13(2), 50-54.

Rajendra W, Armugam A, Jeyaseelan K. Neuroprotection and peptide toxins. Brain Res Rev. 2004;45:125–41.

Rash LD, Hodgson WC. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. Toxicon. 2002;40:225–54.

Repetto, M. (2002). Métodos alternativos, Toxicidad in vitro. *Toxicología Fundamental*, 303-305.

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. (2013) May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.

Russell, F. E. (1988). Snake venom immunology: historical and practical considerations. Journal of Toxicology: Toxin Reviews, 7(1), 1-82, doi: 10.3109/15569548809059725.

Setayesh-Mehr, Z., Asoodeh, A. (2018). Biochemical Characterization of HL-7 and HL-10 Peptides Identified from Scorpion Venom of Hemiscorpius lepturus. Int J Pept Res Ther 24, 421–430. <https://doi.org/10.1007/s10989-017-9625-1>.

Watkins JC, Jane DE. The glutamate story. Br J Pharmacol. 2006;147 SUPPL. 1:100–8.
Whittington, C., & Belov, K. (2007). Platypus venom: a review. Australian Mammalogy, 29(1), 57-62., doi: 10.1071/AM07006.

World Health Organization. (2015, 13 octubre). ¿Qué son las enfermedades cardiovasculares? Organización Mundial de la Salud. https://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/ [Accessed: 21-abr-2021].